

*На правах рукописи*

Фурсов Михаил Васильевич

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГИПЕРВИРУЛЕНТНЫХ  
ШТАММОВ *Mycobacterium tuberculosis*

Специальности: 1.5.11. Микробиология  
1.5.4. Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Оболенск – 2022

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

**Научные руководители:**

**Потапов Василий Дмитриевич**, доктор биологических наук, Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, отдел подготовки и усовершенствования специалистов, главный научный сотрудник;

**Дятлов Иван Алексеевич**, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, директор.

**Официальные оппоненты:**

**Черноусова Лариса Николаевна**, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, лаборатория молекулярно-генетических методов исследования отдела микробиологии, заведующая лабораторией, г. Москва;

**Владимирский Михаил Александрович**, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория иммунопатологии и иммунодиагностики туберкулезной инфекции, заведующий лабораторией, г. Москва.

**Ведущая организация:**

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы».

Защита состоится «09» сентября 2022 г. в 14:00 часов на заседании диссертационного совета 64.1.002.01 на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 142279, Московская область, г. о. Серпухов, п. Оболенск, территория «Квартал А», д. 24.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

**Автореферат разослан** « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2022 г.

**Ученый секретарь**

диссертационного совета 64.1.002.01  
доктор биологических наук, доцент

**Хохлова Ольга Евгеньевна**

## Общая характеристика работы

**Актуальность и степень разработанности темы исследования.** Туберкулез (ТБ) – одна из основных причин смертности во всем мире. Около 95 % смертей от туберкулеза зафиксировано в слабо- и среднеразвитых странах. Количество случаев впервые диагностированного туберкулеза в 2016 г. составило 10,4 млн, в 2019 г. – 7,1 млн, в 2020 г. – 5,8 млн. При этом в 2016 г. умерло 1,7 млн человек, в 2019 г. – 1,2 млн человек, в 2020 г. – 1,3 млн человек среди ВИЧ-негативных пациентов. Кроме того, в эти годы от ТБ умерло 0,30, 0,21 и 0,23 млн ВИЧ-позитивных пациентов, соответственно. Однако, по мнению экспертов Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), из-за пандемии COVID-19 показатели заболеваемости ТБ возрастут в 2021-2022 гг. (WHO, 2017; WHO, 2021). Наибольшую проблему для здравоохранения представляет собой лекарственно-устойчивый ТБ, устойчивый к изониазиду и/или к рифампицину, а также множественно лекарственно-устойчивый (МЛУ), ТБ с пред-широкой лекарственной устойчивостью (пред-ШЛУ) и с широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ). Доля лекарственно-устойчивого ТБ в последние годы возрастает: в 2018 г. она составила 50 %, в 2019 г. – 61 %, в 2020 г. 71 % (WHO, 2021).

Возбудителем ТБ является *Mycobacterium tuberculosis*, который подразделяется на генетические линии, циркулирующие в различных регионах мира. На территории Российской Федерации (РФ) преобладают изоляты генотипов Beijing, Ural и LAM, среди которых доля Beijing достигает 47-72% в разных регионах страны (Dymova *et al.*, 2011). Штаммы данного генотипа характеризуются повышенной вирулентностью, способностью быстро адаптироваться к иммунной системе макроорганизма, выживать и размножаться в макрофагах (МФ), высоким уровнем лекарственной устойчивости и трансмиссивности (Нарвская и др., 2002; Черноусова и др., 2008; Mokrousov, 2013). Методами полногеномного секвенирования и биоинформатического анализа выявлены точечные мутации и внутригеномные перестройки, ассоциированные с повышением вирулентных и антибиотикорезистентных свойств современных штаммов *M. tuberculosis* (Mokrousov, 2013; Hanekom *et al.*, 2011).

Способность клеток *M. tuberculosis* выживать в МФ связана с наличием у них специфических механизмов изменения клеточного метаболизма. В МФ микобактерии подвергаются воздействию множества стрессов, в том числе недостатку питательных веществ, окислительному стрессу, низкому уровню pH и осмотическому шоку (Srivastava *et al.*, 2021). Установлено, что микобактерии приспосабливаются к такого рода стрессам посредством транскрипционных и посттранскрипционных механизмов (DeJesus *et al.*, 2017).

Основным способом профилактики ТБ является вакцинация. В настоящее время вакциной БЦЖ привиты около 90 % населения мира (Divangahi, 2018). Эффективность вакцины БЦЖ варьирует от 0 до 80 % в разных регионах мира (Colditz *et al.*, 1994). Эта вакцина наименее эффективна именно в регионах мира с высоким уровнем заболеваемости ТБ и не рекомендована для профилактики ТБ у ВИЧ-позитивных пациентов (Brazier, McShane, 2020). Вышесказанное указывает на необходимость разработки новых вакцинных препаратов в отношении ТБ, в том числе - бустерных вакцин, направленных на усиление защитных свойств БЦЖ. Для борьбы с ТБ разработаны новые профилактические и терапевтические противотуберкулезных вакцины на основе новых и модифицированных штаммов микобактерий, комбинаций антигенов туберкулезного микроба и адъювантов, которые находятся на разных стадиях доклинических и клинических испытаний (Khoshnood *et al.*, 2018).

**Целью** данного исследования была молекулярно-генетическая, фенотипическая и биологическая характеристика гипервирулентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis*.

Для достижения данной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Охарактеризовать культурально-морфологические и молекулярно-генетические свойства клинических штаммов *M. tuberculosis* Ростов, 267/47 и 120/26, выделенных от больных людей с тяжелыми формами туберкулезной инфекции, проанализировать их геномы, определить их принадлежность к генетическим линиям туберкулезного микроба, идентифицировать фенотипы и генотипы устойчивости к противотуберкулезным препаратам, а также вирулентность на животных моделях.

2. Оценить транскрипционный ответ генов цитокинов мышей линии C57BL/6 на заражение клиническими штаммами *M. tuberculosis* 267/47 и 120/26.

3. Изучить изменение транскрипционной активности генов малых некодирующих РНК MTS0997/Mcr11, MTS1338/Drrs, MTS2823/Ms1, B11/C6, Mpr5, Mcr3, Mcr15, Mcr7, Mpr11 и Mpr18 *M. tuberculosis* в ответ на воздействие стрессов, моделирующих *in vitro* условия окружения клеток туберкулезного микроба в фагосомах макрофагов организма-хозяина.

4. Оценить профилактическую и терапевтическую эффективность препарата «Полиантигенная вакцина для профилактики и вспомогательного лечения туберкулеза ЛТБвак» на животных моделях острой и хронической туберкулезной инфекции.

**Научная новизна.** Клинические гипервирулентные штаммы *M. tuberculosis* 120/26, Ростов и 267/47, выделенные от людей с тяжелыми формами туберкулеза, отнесены к широко распространенным в РФ генетическим кладам CAO и B0/W148 возбудителя туберкулеза генотипа Beijing. Фенотипы резистентности этих штаммов идентифицированы как МЛУ, пред-ШЛУ и ШЛУ, соответственно. В геномах штаммов выявлены мутации, ассоциированные с резистентностью к противотуберкулезным препаратам. Показано, что уровень вирулентности изучаемых штаммов для мышей линии C57BL/6 превышал таковой референс-штамма H37Rv.

Описаны изменения транскрипции 26 генов цитокинов (*Ifn-γ*, *Tnf-α*, *Il-1α*, *Il-1β*, *Il-6*, *Il-7*, *Il-10*, *Il-12(p35)*, *Il-12(p40)*, *Il-13*, *Il-15*, *Il-17*, *Mx1*, *IFI44*, *Cxcl2*, *Cxcl5*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Ccl2*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Ccl11*, *Csf1*, *Csf2* и *Vegf*) в тканях легких мышей линии C57BL/6, зараженных клиническими штаммами *M. tuberculosis* 120/26 и 267/47, принадлежащими к генетическим кладам CAO и B0/W148, по сравнению с интактными мышами.

Выявлен «ранний» ответ экспрессии 10 генов мРНК (MTS0997/Mcr11, MTS1338/Drrs, MTS2823/Ms1, B11/C6, Mpr5, Mcr3, Mcr15, Mcr7, Mpr11 и Mpr18) *in vitro* на стрессы («осмотический», «голодание», гипоксический, «кислотный», оксидативный), моделирующие условия окружения клеток *M. tuberculosis* в фагосомах макрофагов организма-хозяина.

Показана профилактическая эффективность кандидатной БЦЖ-бустерной рекомбинантной субъединичной вакцины «ЛТБвак» на моделях острой туберкулезной инфекции у мышей линии C57BL/6 и морских свинок альбиносов и терапевтическая эффективность препарата «ЛТБвак» на модели хронического туберкулеза у мышей линии C57BL/6.

**Теоретическая и практическая значимость.** Полученные данные вносят вклад в понимание молекулярно-генетических механизмов гипервирулентности и широкой лекарственной устойчивости к противотуберкулезным препаратам у штаммов современных генетических кладов *M. tuberculosis* B0/W148 и CAO генотипа Beijing, преобладающих на территории Российской Федерации; влияния туберкулезной инфекции на экспрессию генов цитокинов в тканях организма-хозяина на мышинной модели; механизмов адаптации патогена к стрессовым условиям окружающей среды внутри фагосом макрофагов, за счет изменения

уровней экспрессии мРНК; возможности эффективного использования БЦЖ-бустерных рекомбинантных вакцин для совершенствования схем профилактики и терапии туберкулеза.

В Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск» депонированы 3 штамма *M. tuberculosis* В-9343, В-9344 и В-9351 – федеральный уровень внедрения.

Геномы штаммов *M. tuberculosis* Ростов, 267/47 и 120/26 размещены в базе данных GenBank [JAAMPG000000000.1, NZ\_CP071128.1 и NZ\_CP071127.1, соответственно] – международный уровень внедрения.

Разработан набор праймеров для детекции и определения уровней представленности транскриптов 26 генов цитокинов мышей (*Ifn-γ*, *Tnf-α*, *Il-1α*, *Il-1β*, *Il-6*, *Il-7*, *Il-10*, *Il-12(p35)*, *Il-12(p40)*, *Il-13*, *Il-15*, *Il-17*, *Mx1*, *IFI44*, *Cxcl2*, *Cxcl5*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Ccl2*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Ccl11*, *Csf1*, *Csf2* и *Vegf*).

Создан набор специфичных праймеров для детекции и определения уровней представленности транскриптов 10 малых некодирующих РНК *M. tuberculosis* – лабораторный уровень внедрения.

Зарегистрирована в Госреестре База данных «Гены вирулентности *Mycobacterium tuberculosis*». Свидетельство № от – федеральный уровень внедрения.

Доказана профилактическая и терапевтическая эффективность препарата «Полиантигенная вакцина для профилактики и вспомогательного лечения туберкулеза ЛТБвак», разработанного НИЦ эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи.

**Методология и методы исследования.** Методология диссертационной работы заключалась в комплексном подходе к изучению молекулярно-генетических характеристик вирулентных штаммов *M. tuberculosis* и оценке эффективности прототипа новой бустерной рекомбинантной субъединичной противотуберкулезной вакцины.

Микробиологические методы. Клинические штаммы *M. tuberculosis* получены из ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Дагестан» Роспотребнадзора (штамм Ростов) и ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Минздрава РФ (штаммы 120/26 и 267/47). Референс-штамм *M. tuberculosis* H37Rv получен из «ГКПМ-Оболенск». Культивирование микобактерий осуществляли на плотных питательных средах Middlebrook 7H10 и 7H11, Левенштейна–Йенсена, Финна 2 и на жидкой питательной среде Middlebrook 7H9. Индекс роста культуры определяли по формуле  $\log_{10}A/\log_{10}B$ , где  $\log_{10}A$  – десятичный логарифм показателя КОЕ в оцениваемый момент времени,  $\log_{10}B$  – в начальный момент времени. Оценивали значение  $C_{\max}$  – максимальное значение индекса роста одного штамма (Sarkar *et al.*, 2012). Минимальные подавляющие концентрации (МПК) противотуберкулезных препаратов определяли с помощью системы ВАСТЕС MGIT 960 и ТБ тест-набора (Домотенко и др., 2021). Моделировали стрессовые условия (осмотический стресс, голодание, гипоксия, пониженное значение рН, оксидативный стресс).

Биохимические методы. Выделение геномной ДНК осуществляли как описано в работе Belise, Sonnenberg, 1998, выделение ДНК для полногеномного секвенирования - СТАВ-методом (Дятлов и др., 2017); выделение тотальной РНК - хлороформ-фенольной экстракцией; выделение тотальной РНК из тканей легких мышей - погружая фрагменты легких в жидкий азот с последующей обработкой смесью фенола и гуанидинтиоцианата.

Молекулярно-генетические методы. Для синтеза кДНК использовали набор RevertAid RT Reverse Transcription Kit. Полимеразную цепную реакцию проводили с помощью амплификатора MasterCycler Gradient Thermal Cycler; ПЦР в реальном времени - на приборе



CFX96 Real-Time PCR. Сполиготипирование выполняли как описано в работе Kamerbeek *et al.*, 1997; MIRU-VNTR-типирование - как описано ранее (Supply *et al.*, 2006). Полногеномное секвенирование штаммов *M. tuberculosis* осуществляли на приборах Ion Torrent PGM и MGISEQ-200RS.

Биоинформатические методы. Дизайн и анализ специфичных праймеров проводили с помощью программ Vector NTI Advance 11.0, Gene Runner 6.5.52 и веб-ресурсов NCBI primer design, Insilico. Оценку качества полученных ридов при полногеномном секвенировании проводили с помощью программы FastQC v.0.11.9. Качество данных секвенирования проверяли с помощью QualiMap v.2.2.2. SNPs выявляли с помощью ресурса Snippy pipeline v.4.6.0. Филогенетический анализ проводили с использованием базы данных VNTRPLUS, а также баз данных ФБУН ГНЦ ПМБ и ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА.

Биологические методы. Эксперименты на животных проводили в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета о защите животных от 22.09.2010, СП 1.3.2322-08 и Ветпротоколов: ВП-2016/8, ВП-2018/6, ВП-2018/7, ВП-2018/8 и ВП-2020/10. Лабораторные животные. В работе использовали мышей линии C57BL/6 и морских свинок линии альбиносы (НЦБТ ФМБА, Андреевка), заражали внутривенно ( $\sim 5 \times 10^6$  КОЕ/мл), аэрозольно (50-100 КОЕ/животное) и внутрибрюшинно ( $1 \times 10^4$  КОЕ/мышь). Иммунизацию животных вакциной «БЦЖ» осуществляли однократно подкожно в дозе  $10^5$  КОЕ/животное. Бустерную иммунизацию мышей и морских свинок препаратом «ЛТБвак» - подкожно и интраназально с двухнедельным интервалом. Терапевтическую эффективность «ЛТБвак» определяли на модели хронического туберкулеза у мышей линии C57BL/6.

Гистологические методы. Срезы паренхиматозных органов окрашивали гематоксилином/эозином, документировали при помощи микроскопа Nikon Eclipse 80i и цифровой камеры Nikon DS-U2. Полуколичественную оценку гистологических срезов проводили, используя шкалу опубликованную ранее (Fursov *et al.* 2021)

Статистические методы. Все эксперименты повторяли не менее 3 раз. Анализ экспериментальных данных проводили с использованием программы GraphPad Prism версии 8.0.1: критерий Гехана-Бреслоу-Уилкоксона (выживаемость), непарный t-критерий Стьюдента (индекс роста и  $C_{max}$ ), непарметрический критерий Манна-Уитни или дисперсионный анализ ANOVA (бактериальная обсемененность органов), непарный t-критерий Уэлча (полуколичественная гистологическая оценка). Относительные уровни транскрипции рассчитывали методом  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak, Schmittgen, 2001); представленность транскриптов - методом математического моделирования (Pfaffl, 2001). Статистически достоверной считали разницу между группами при  $p < 0,05$ .

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Клинические штаммы *M. tuberculosis* 120/26, Ростов и 267/47, вызвавшие тяжелые формы туберкулеза у людей, отнесены к генетическим кладам B0/W148 и SAO генотипа Beijing и к категориям резистентности МЛУ, пред-ШЛУ и ШЛУ, охарактеризованы как гипервирулентные для мышей линии C57BL/6 и вызывающие специфический ответ иммунной системы на уровне транскрипции генов цитокинов.

2. Экспрессия генов мРНК (MTS0997/Mcr11, MTS1338/Drrs, MTS2823/Ms1, B11/C6, Mpr5, Mcr3, Mcr15, Mcr7, Mpr11 и Mpr18) *M. tuberculosis* дифференциально изменяется в ответ на стрессы («осмотический», «голодание», гипоксический, «кислотный», оксидативный), моделирующие *in vitro* условия в фагосомах макрофагов организма-хозяина.

3. Препарат «Полиантигенная вакцина для профилактики и вспомогательного лечения туберкулеза ЛТБвак» проявляет профилактический эффект на моделях острой туберкулезной инфекции у мышей и морских свинок, а также терапевтический эффект на модели хронической туберкулезной инфекции у мышей.

**Степень достоверности и апробации результатов.** Работа была выполнена в отделе подготовки и усовершенствования специалистов Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» в рамках НИР 069 (2018 – 2020) и 073 (2021-2022 гг.) отраслевой программы Роспотребнадзора (Регистрационные номера: АААА-Б21-221011890081-1 и 222020400117-7) и договора с Национальным исследовательским центром эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи №372-н/2018 от 17.05.18 г.

Материалы диссертации доложены и обсуждены на 8 международных и российских конференциях и симпозиумах: 18 Международной школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пушкино, 21-25 апреля 2014 г.; Международная научно-практическая конференция «Молекулярная диагностика 2018», Минск, 27-28 сентября 2018 г.; Всероссийской научно-практической конференции молодых учёных и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены», Лужки, Московская область 24-26 октября 2018 г.; Международной конференции «Молекулярные основы эпидемиологии, диагностики, профилактики и лечения актуальных инфекций», Санкт-Петербург, 4-6 декабря 2018 г.; XI Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням с международным участием «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы», г. Москва, 1-3 апреля 2019 г.; 24 Международной школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пушкино, 2020 г.; Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию академика И.Н. Блохиной «Эпидемиологический надзор за актуальными инфекциями: новые угрозы и вызовы», Нижний Новгород, 26–27 апреля 2021 г.; XIV Ежегодном Всероссийском конгрессе по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы», Москва, 28-30 марта 2022 г.

**Личное участие автора** заключалось в анализе научной литературы, планировании экспериментов, выполнении микробиологических, молекулярно-генетических, биохимических, биологических экспериментов и анализе полученных результатов, в подготовке материалов для публикаций, в представлении устных и постерных докладов на конференциях. Отдельные разделы работы выполнены совместно с сотр. ФБУН ГНЦ ПМБ д.б.н. Потаповым В.Д., к.б.н. Комбаровою Т.И., к.б.н. Ганиной Е.А., к.х.н. Домотенко Л.В., к.б.н. Богуном А.Г., н.с. Грищенко Н.С., н.с. Рудницкой Т.И. и м.н.с. Колупаевой Н.В.; сотр. ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА к.б.н. Шитиковым Е.А.; сотр. НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи к.б.н. Васиной Д.В., к.б.н. Ткачуком А.П., к.б.н. Гушиным В.А.

**Публикации.** Основные результаты по теме диссертации изложены в 16 печатных публикациях, из которых 5 статей в изданиях, рекомендованных ВАК, 1 База данных, 2 статьи в прочих изданиях, 8 тезисов докладов в сборниках трудов конференций.

**Объем и структура работы.** Диссертация состоит из введения, 6 глав, заключения, выводов и 2 приложений. Объем диссертации составляет 177 страниц текста с 61 рисунком и 21 таблицей. Список литературы содержит 323 наименования.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Молекулярно-генетическая и фенотипическая характеристика гипервирулентного штамма *M. tuberculosis* Ростов

Штамм *M. tuberculosis* Ростов получен из «ГКПМ-Оболенск» (В-7601), выделен в ноябре 2013 г. из образца мокроты 35-летнего мужчины в Южном федеральном округе России. Показано, что этот штамм характеризовался более быстрым размножением клеток, по сравнению с референс-штаммом *M. tuberculosis* H37Rv (рис. 1).

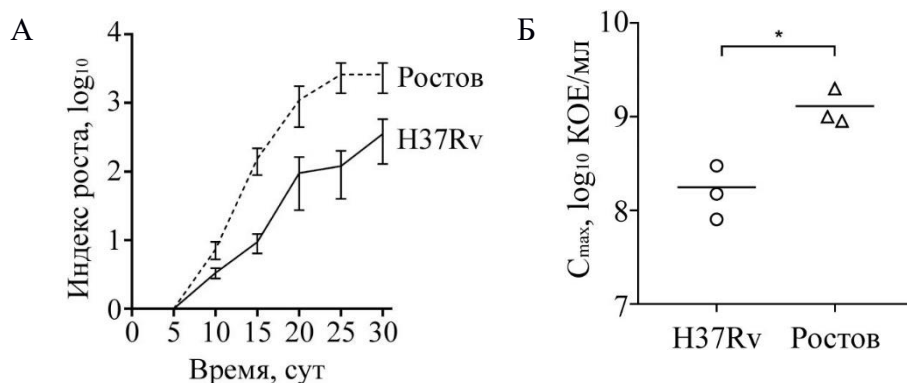


Рис. 1 – Индекс роста (А) и  $C_{max}$  (Б) штаммов *M. tuberculosis* Ростов и H37Rv в бульоне Middlebrook 7H9; \* -  $p < 0,05$

Штамм характеризовался устойчивостью к 7-ми противотуберкулезным препаратам: 1-го ряда (изониазиду, рифампицину, стрептомицину и этамбутолу) и 2-го ряда (амикацину, канамицину, капреомицину) и отнесен к категории резистентности пред-ШЛУ. В геноме штамма идентифицированы 5 значимых мутаций, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду *katG* (C944G, Ser315Thr), рифампицину *rpoB* (C1349T, Ser450Leu), стрептомицину *rpsL* (A128G, Lys43Arg), этамбутолу *embB* (A916G, Met306Val), амикацину, канамицину и капреомицину *rrs* (A1401G), а также компенсаторная мутация в гене *rpoC*, кодирующем  $\beta$ -субъединицу РНК-полимеразы (G764363A, Gly332Ser).

Клинический штамм *M. tuberculosis* Ростов идентифицирован как представитель современной клады возбудителя туберкулеза CAO генотипа Beijing, на основании наличия в его геноме 46 специфичных SNPs. Анализ SNPs, специфичных для кластера, выявил одну значимую точечную мутацию (A2321369G; Asn105Asp) в гене Rv2063a (MazF7), относящегося к факторам вирулентности, детоксикации и адаптации. Ранее сообщалось, что система токсин-антитоксин MazEF очень важна для адаптации к стрессу, лекарственной устойчивости и вирулентности *M. tuberculosis*, а также необходима для персистенции *in vitro* (Tiwari *et al.*, 2015). Согласно генотипированию методом MIRU-VNTR по 24-локусам, штамм *M. tuberculosis* Ростов отнесен к типу 9358-25 и кластеру M2, специфичному для популяции возбудителя туберкулеза в Центральной Азии.

Показано, что изучаемый клинический штамм Ростов характеризовался более высоким уровнем вирулентности, по сравнению со штаммом H37Rv, на основании анализа гибели мышей к 90-му дню после заражения (п.з.) (100 % против 56 %, соответственно, рис. 2А), внешнего вида животных и морфологии внутренних органов, а также показателей обсемененности паренхиматозных органов мышей микобактериями (рис. 2Б) и гистологической картиной срезов органов (рис. 3).



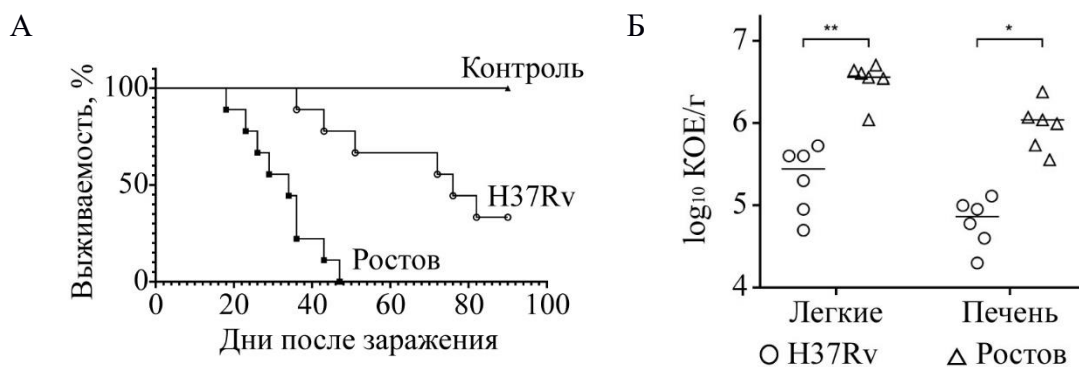


Рис. 2 – Динамика выживаемости (А) и бактериальная обсемененность паренхиматозных органов на 30 сут п.з. (Б) мышей линии С57ВL/6, зараженных внутривенно штаммами *M. tuberculosis* Ростов и H37Rv в дозе  $5 \times 10^6$  КОЕ/животное; контроль – группа животных, которым введен ЗФР; \* - значения  $p \leq 0,05$ ; \*\* - значения  $p \leq 0,01$

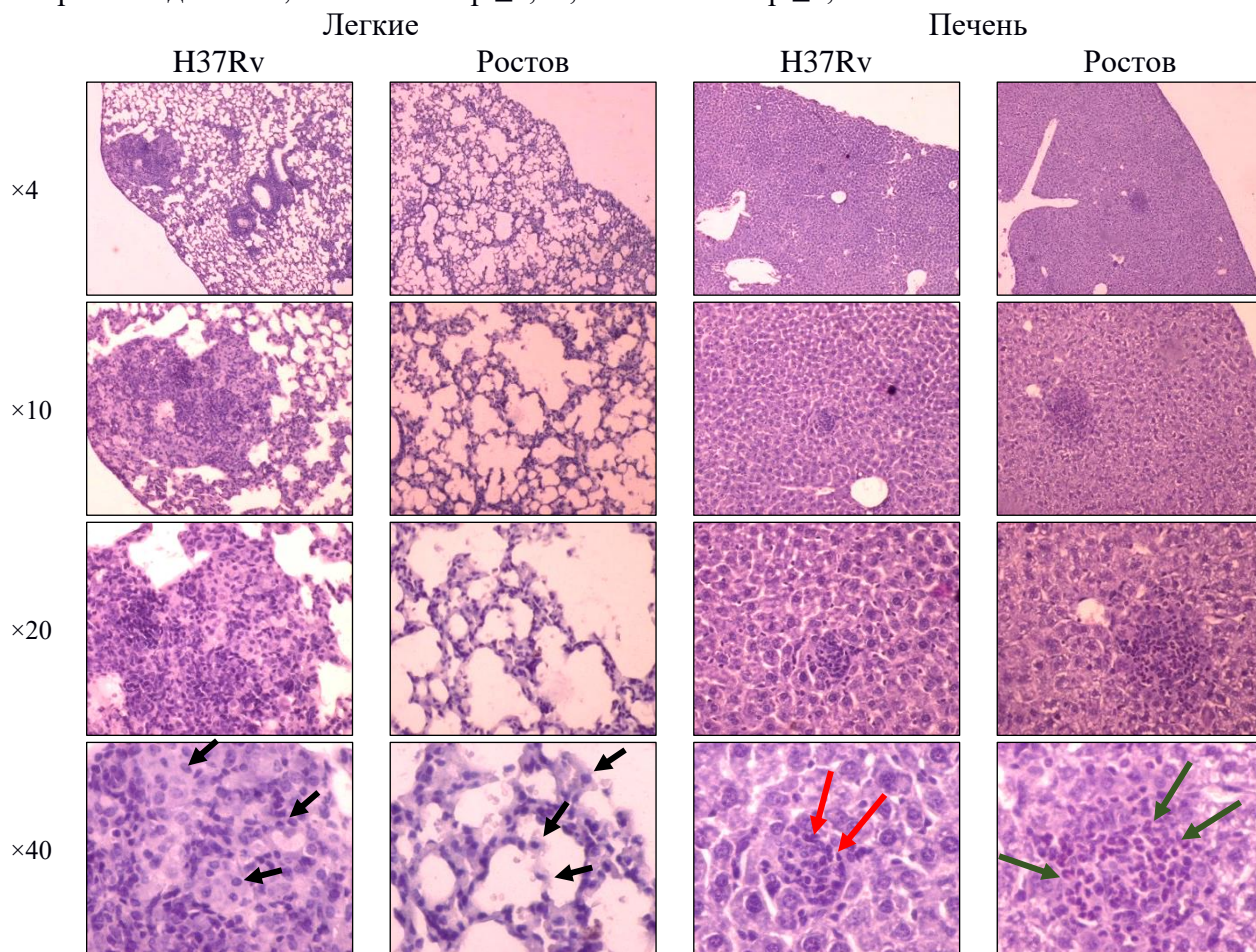


Рис. 3 – Гистологические срезы легких и печени мышей линии С57ВL/6 на 30 сут после внутривенного введения клеток штаммов *M. tuberculosis* Ростов или H37Rv в дозе  $5 \times 10^6$  КОЕ/животное. Стрелками указаны МФ (черный цвет), лимфоциты (красный цвет) и полиморфноядерные лейкоциты (зеленый цвет)

Характер патологических изменений в легких и печени мышей, вызванных штаммами Ростов и H37Rv различался. Отсутствие легочных инфильтратов у мышей, инфицированных штаммом Ростов, может свидетельствовать о том, что этот штамм не активировал механизмы защиты организма хозяина, по сравнению с реакцией на инфекцию, вызванную штаммом H37Rv.

Таким образом, показано, что штамм *M. tuberculosis* Ростов, отнесенный к категории резистентности пред-ШЛУ и к кладе CAO генотипа Beijing, характеризуется высокой степенью вирулентности для мышей линии C57BL/6, по сравнению со штаммом *M. tuberculosis* H37Rv. Это позволяет предположить, что наличие специфических свойств и детерминант, характерных для клады CAO, может давать эволюционное преимущество штаммам *M. tuberculosis*, аналогичных клиническому штамму Ростов.

### Сравнительная характеристика гипервирулентных штаммов *M. tuberculosis* 267/47 и 120/26, принадлежащих к сублиниям B0/W148 и CAO генотипа Beijing

Клинические штаммы *M. tuberculosis* 267/47 и 120/26, выделенные от пациентов с туберкулезом легких в г. Москва в 2018 г. и депонированные в «ГКПМ-Оболенск» (В-9344 и В-9343), по результатам полногеномного секвенирования и филогенетического анализа отнесены к генотипу Beijing, кладам B0/W148 (43 специфических SNPs) и CAO (46 специфических SNPs), соответственно.

Оба клинических штамма характеризовались меньшей скоростью роста на питательных средах по сравнению со штаммом *M. tuberculosis* H37Rv (рис. 4).

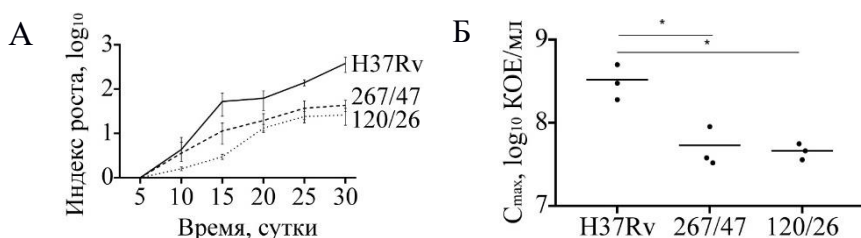


Рис. 4 – Индекс роста (А) и  $C_{\max}$  (Б) штаммов *M. tuberculosis* H37Rv, 267/47 и 120/26 при выращивании в бульоне Middlebrook 7H9; \* -  $p < 0,05$

Штамм *M. tuberculosis* 267/47 отнесен к категории резистентности ШЛУ на основании его устойчивости к пяти противотуберкулезным препаратам 1-го ряда (изониазиду, рифампицину, стрептомицину, этамбутолу и пиперазину) и четырем противотуберкулезным препаратам 2-го ряда (амикацину, канамицину, капреомицину и офлоксацину). Данный фенотип ассоциирован с наличием 6 точечных мутаций в генах антибиотикорезистентности (*katG*, *rpoB*, *rpsL*, *embB*, *rrs* и *gyrA*) и 2 точечных мутаций в промоторных областях генов (*inhA* и *pncA*). Штамм *M. tuberculosis* 120/26 характеризовался устойчивостью к четырем противотуберкулезным препаратам 1-го ряда (изониазиду, рифампицину, стрептомицину и этамбутолу), на основании чего он отнесен к категории резистентности МЛУ. В геноме данного штамма идентифицированы 4 точечные мутации в генах антибиотикорезистентности (*katG*, *rpoB*, *rpsL*, *embB*).

Показано, что клинические штаммы *M. tuberculosis* 267/47 и 120/26 более вирулентны для мышей линии C57BL/6, чем контрольный вирулентный штамм H37Rv, с выживаемостью 10, 40 и 70 % на 150 сут п.з. в дозе  $5 \times 10^6$  КОЕ/животное, соответственно (рис. 5). Динамика бактериальной обсемененности паренхиматозных органов у мышей, генерируемая штаммом 267/47, указывала на более вирулентный потенциал этого штамма, принадлежащего к кладе B0/W148, по сравнению с таковым штаммов 120/26 и H37Rv (рис. 6).

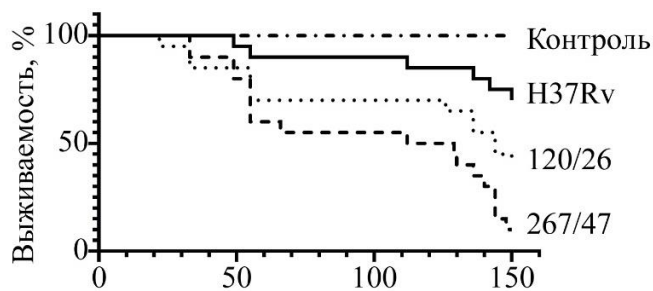


Рис. 5 – Динамика выживаемости мышей линии C57BL/6, зараженных внутривенно штаммами *M. tuberculosis* 267/47, 120/26 и H37Rv в дозе  $5 \times 10^6$  КОЕ/животное; контроль – группа животных, которым введен ЗФР

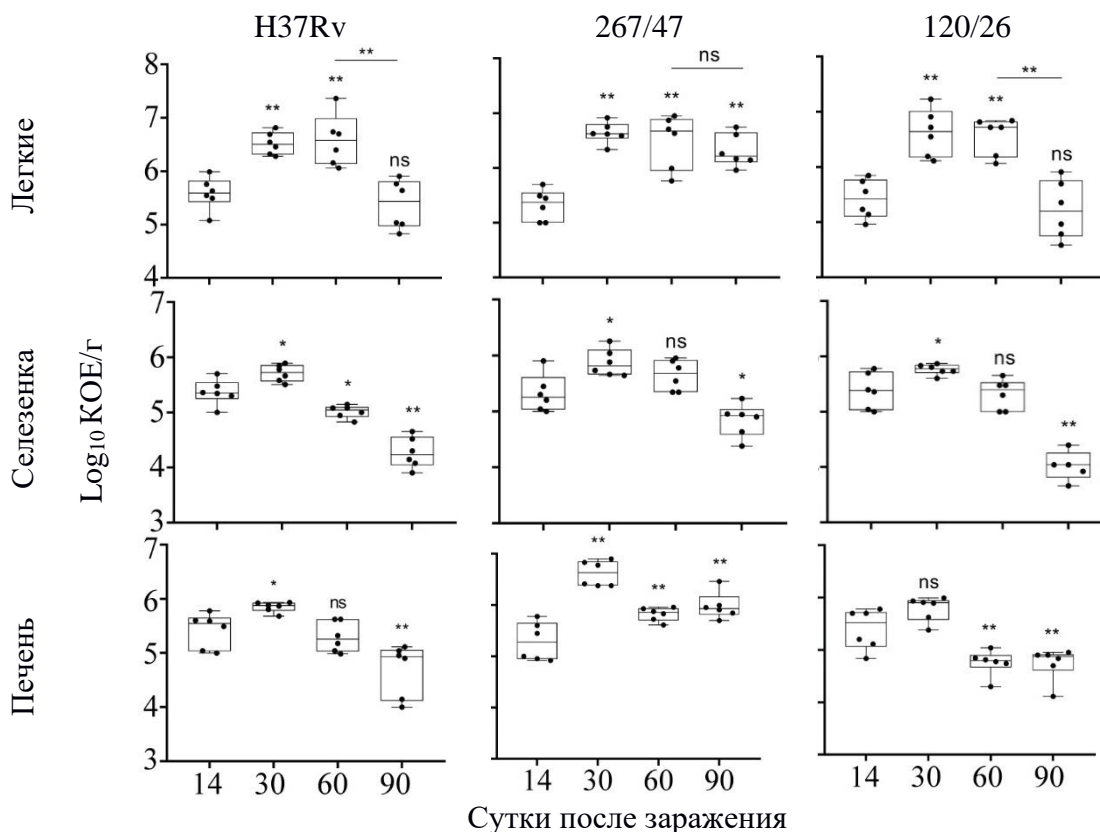


Рис. 6 - Динамика микобактериальной нагрузки в тканях паренхиматозных органов мышей линии C57BL/6, зараженных штаммами *M. tuberculosis* H37Rv, 267/47 и 120/26 в дозе  $5 \times 10^6$  КОЕ/животное; \* -  $p \leq 0,05$ ; \*\* -  $p \leq 0,01$ ; ns - незначимые различия

Гистологические исследования подтвердили более высокую вирулентность клинического штамма *M. tuberculosis* 267/47, который вызывал более тяжелые повреждения паренхиматозных органов, по сравнению с другим клиническим штаммом 120/26 и с контрольным штаммом H37Rv (рис. 7), на что указывают результаты полуколичественной гистологической оценки.

Для изучения ответа иммунной системы мышей линии C57BL/6 на инфекцию, вызванную гипервирулентными штаммами *M. tuberculosis* 267/47 и 120/26, создан набор праймеров для ПЦР в реальном времени, позволяющий оценить уровень экспрессии генов цитокинов мышей. Показано, что уровень экспрессии гена цитокина IL-1 $\alpha$ , участвующего во врожденных и адаптивных иммунных реакциях у мышей, снижался на 90 сут после заражения штаммом 267/47, в отличие от его экспрессии после заражения штаммами 120/26 и H37Rv. Это ассоциировано с более высокой вирулентностью штамма *M. tuberculosis* 267/47, так как дефицит IL-1 $\alpha$  и/или IL-1 $\beta$  может сопровождаться неконтролируемым ростом микобактерий *in vivo* и воспалением легких у мышей (Bourigault *et al.*, 2013).



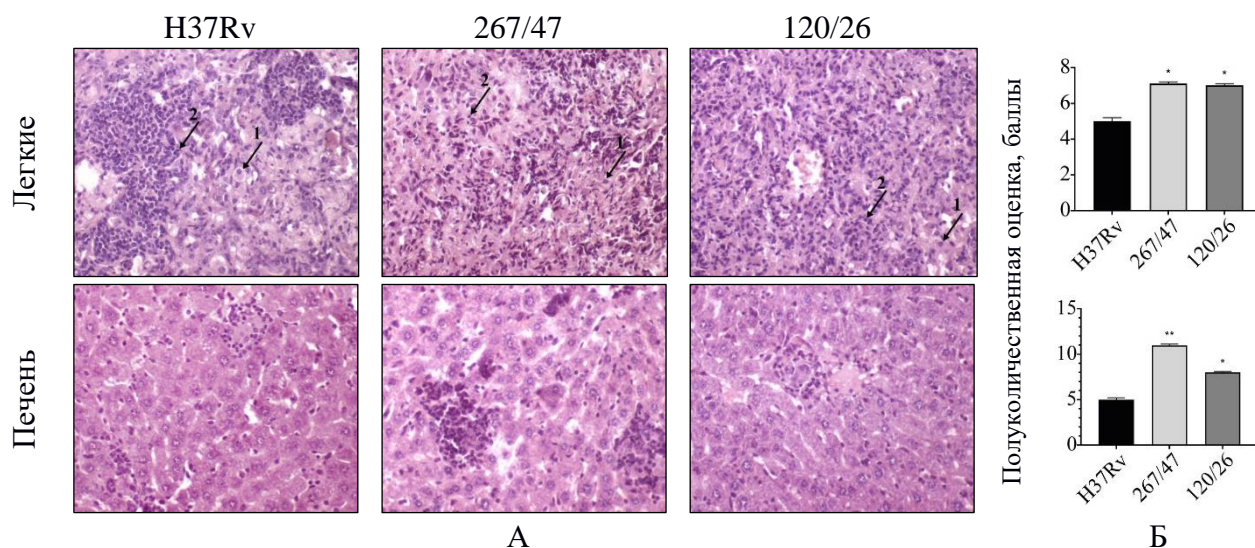


Рис. 7 – Гистологические срезы (А) и диаграмма полуколичественной оценки гистологических срезов (Б) тканей легких и печени мышей линии C57BL/6 к 90 сут после внутривенного введения клеток штаммов *M. tuberculosis* H37Rv, 267/47 и 120/26; \* -  $p \leq 0,05$ ; \*\* -  $p \leq 0,01$

Зафиксировано также снижение на 60 и 90 сут уровня экспрессии гена цитокина IL-7 после заражения высоковирулентным штаммом 267/47, в отличие от уровня его экспрессии после заражения штаммом 120/26, который повышался на 30 и 60 сут. Известно, что IL-7 участвует в увеличении выживаемости и снижении микобактериальной нагрузки в легких мышей (Maeger *et al.*, 2000). В нашем исследовании уровень транскрипции гена цитокина IL-17 по-разному индуцировался тремя штаммами *M. tuberculosis*: клинические штаммы 267/47 и 120/26 вызывали снижение на 90 сут и в период с 60 по 90 сут п.з., соответственно, в отличие от контрольного штамма H37Rv, который индуцировал снижение экспрессии этого гена на 30 сут п.з. и повышение на 60 и 90 сут п.з. Такая динамика свидетельствовала о различных механизмах вирулентности штаммов, поскольку IL-17 является важным провоспалительным цитокином не только для раннего рекрутирования нейтрофилов, но и для высвобождения цитотоксических медиаторов, усиливающих антибактериальную активность нейтрофилов (Hu *et al.*, 2017). Мы показали, что транскрипция гена цитокина IL-6 повышалась в легких мышей в течение всего периода исследования после внутривенного заражения штаммом H37Rv, в отличие от уровней транскрипции этого гена у мышей, зараженных клиническими штаммами: штамм *M. tuberculosis* 267/47 увеличивал экспрессию этого гена на 30 сут, а штамм *M. tuberculosis* 120/26 - на 90 сут п.з. Ранее сообщалось, что секреция IL-6 инфицированными *M. tuberculosis* МФ может быть связана с отсутствием способности IFN- $\gamma$  вызвать эрадикацию возбудителя (Nagabhushanam *et al.*, 2003). Уровень транскрипции гена интерлейкина IL-10 повышался на 60 сут п.з. у мышей, инфицированных штаммами H37Rv и 267/47, но не изменялся у мышей, инфицированных штаммом 120/26. Ранее сообщалось, что продукция IL-10 при фагоцитозе клеток *M. tuberculosis* МФ блокирует созревание фагосом (O'Leary *et al.*, 2011). Экспрессия гена цитокина IL-13 незначительно повышалась на 90 сут после заражения штаммом H37Rv, в то время как она подавлялась на 60-90 и 30 сут после заражения штаммами 267/47 и 120/26, соответственно. Ранее было показано, что роль IL-13 в МФ заключается в ингибировании аутофагии и подавления внутриклеточного выживания микобактерий (Freeman *et al.*, 2006). В нашем исследовании показано, что экспрессия гена хемокина CCL4 подавляется на 30 сут п.з. у мышей, инфицированных клиническими штаммами 267/47 и 120/26, в отличие мышей, зараженных контрольным штаммом H37Rv. Это отличается от ранее опубликованных данных об экспрессии CCL4, обнаруженной с помощью специфических

антител (Rangel-Santiago *et al.*, 2016). Только два гена хемокинов, CCL3 и CXCL2, подавлялись на протяжении всего эксперимента после инфицирования штаммом *M. tuberculosis* H37Rv. Хотя экспрессия гена хемокина CCL3 также подавлялась после заражения клиническими штаммами 267/47 и 120/26, она восстанавливалась до исходного уровня к 90 сут п.з.; аналогично, экспрессия гена хемокина CXCL2 восстанавливалась к 90 и 60–90 сут п.з, соответственно. На основании литературных данных, роль хемокина CCL3 при туберкулезе состоит в рекрутировании Т-клеток в легкие, а роль хемокина CXCL2 - в рекрутировании нейтрофилов и натуральных киллеров (Monin, Khader, 2014) (рис 8).

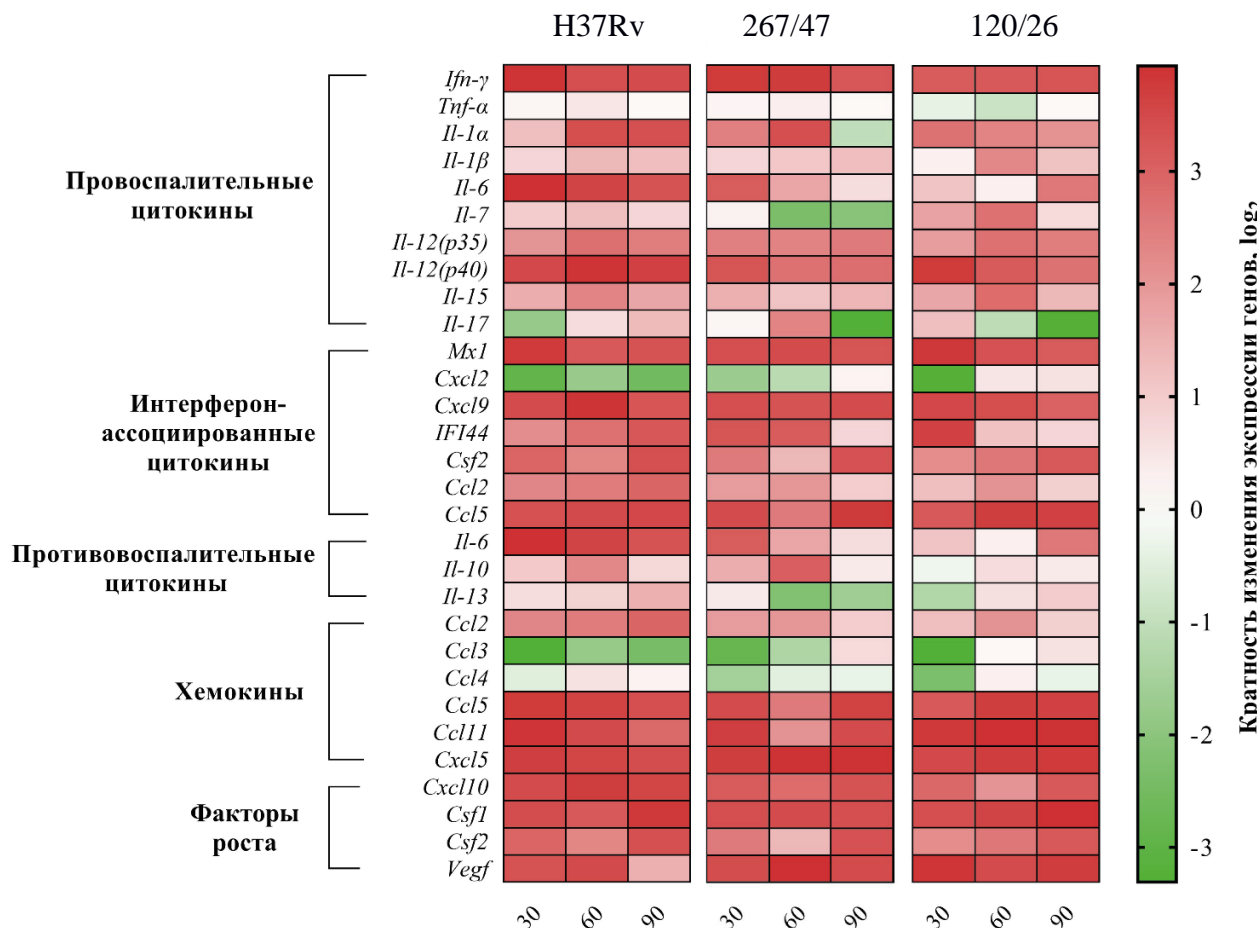


Рис. 8 – Тепловая карта изменений уровней экспрессии генов цитокинов, хемокинов и факторов роста в легких мышей линии C57BL/6 на 30, 60 и 90 сут после заражения штаммами *M. tuberculosis* H37Rv, 267/47 и 120/26. Значения каждой клетки представляют собой  $\log_2$  значений кратных изменений экспрессии генов, по сравнению, с таковыми у неинфицированных мышей (значения кратных изменений экспрессии генов от -1 до +1 являются статистически незначимыми)

Таким образом показано, что штаммы *M. tuberculosis* генотипа Beijing, относящиеся к кладам B0/W148 и CAO, имеют разные характеристики вирулентности. Штамм *M. tuberculosis* 267/47, принадлежащий к кладе B0/W148, проявлял более высокий уровень вирулентности на модели мышей линии C57BL/6, по сравнению со штаммом *M. tuberculosis* 120/26, относящимся к кладе CAO. Получение сведений о разном вирулентном потенциале возбудителя туберкулеза различных генетических линий важно для микробиологов, фтизиатров и эпидемиологов.



## «Ранний» ответ экспрессии малых некодирующих РНК *M. tuberculosis* на изменение окружающей среды культивирования *in vitro*

Разработан набор праймеров для детекции 10 мнРНК и определения уровней их представленности в клетках *M. tuberculosis*, с помощью которого оценивали «ранний» ответ экспрессии мнРНК при культивировании в стрессовых условиях, моделирующих окружение в фагосомах макрофагов: «осмотический» стресс, «голодание», гипоксический стресс, «кислотный» стресс и оксидативный стресс (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> или NO). Перечень изучаемых мнРНК выбран на основании литературных данных транскриптомного анализа штамма *M. tuberculosis* H37Rv в разных физиологических состояниях (Ignatov *et al.*, 2015).

Выявлены различия в характере экспрессионного ответа генов мнРНК: 3 гена (Mcr7, Mpr11 и Mpr18) реагировали на все 6 изучаемых стрессов; 3 гена (MTS1338/Drrs, Mpr5 и Mcr15) – на 5 стрессов; 2 гена (MTS0997/Mcr11 и B11/6C) – на 4 стресса; 2 гена (MTS2823/Ms1 и Mcr3) – на 3 стресса. Зафиксирован ответ всех 10 изучаемых генов мнРНК на «осмотический», «голодание» и гипоксический стрессы, причем первый и второй из них вызывали преимущественно индукцию экспрессии (8 и 7 из 10 генов, соответственно), а третий – преимущественно подавление экспрессии генов мнРНК (6 из 10 генов). Напротив, экспрессия не всех генов мнРНК изменялась при воздействии «кислотного» и оксидативного (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и NO) стрессов. Причем, в условиях стресса «голодание» экспрессия активировалась у 2 генов (Mpr5 и Mcr7) и подавлялась у 2 генов (Mpr11 и Mpr18); в условиях оксидативного H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> стресса – активировалась у 6 генов (MTS0997/Mcr11, MTS1338/Drrs, B11/6C, Mcr15, Mpr11 и Mpr18) и понижалась у одного гена (Mcr7); в условиях оксидативного NO стресса отмечена индукция экспрессии только одного гена (MTS1338/Drrs), а подавление - 5 генов (Mpr5, Mcr15, Mcr7, Mpr11 и Mpr18) (табл. 1).

Табл. 1 – Локализация генов мнРНК в геноме штамма *M. tuberculosis* H37Rv и экспрессионный ответ на стрессовые воздействия окружающей среды *in vitro*

мнРНК	Координаты в геноме	Прилегающие гены	«Ранний» ответ на стрессы					
			1	2	3	4	5	6
MTS0997/Mcr11	1413094-1413224 (-)	Rv1264-Rv1265	■	■	■		■	
MTS1338/Drrs	1960667-1960783 (+)	Rv1733c-Rv1735c		■	■		■	■
MTS2823/Ms1	4100669-4100968 (+)	Rv3661-Rv3662c	■	■	■			
B11/6C	4099386-4099478 (-)	Rv3660c-Rv3661	■	■	■		■	
Mpr5	1175225-1175315 (+)	Rv1051c-Rv1052	■	■	■	■		■
Mcr3	1471619-1471742 (+)	<i>murA-rrs</i>	■	■	■			
Mcr15	1535417-1535716 (-)	Rv1363c-1364c	■	■	■		■	■
Mcr7	2692172-2692521 (+)	Rv2395-PE_PGRS41	■	■	■	■	■	■
Mpr11	2881252-2881320 (+)	Rv2560-Rv2561	■	■	■	■	■	■
Mpr18	4093468-4093522 (+)	Rv3651-PE_PGRS60	■	■	■	■	■	■

Примечание: (+) – 5'-3' цепь ДНК; (-) – 3'-5' цепь ДНК; 1 – «осмотический» стресс; 2 – «голодание»; 3 – гипоксический стресс; 4 – «кислотный» стресс; 5,6 – оксидативный стресс, вызванный H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и NO, соответственно; красный цвет – индукция экспрессии гена; зеленый цвет – подавление экспрессии гена

Таким образом, показано, что каждый из 10 исследуемых генов мнРНК обладал уникальным спектром ответа на воздействие стрессов окружающей среды *in vitro*. Полученные данные согласуются с опубликованными ранее сведениями о том, что биологическая роль мнРНК (MTS0997/Mcr11, MTS1338/Drrs, MTS2823/Ms1 и B11/6C) связана с их специфической активностью на разных стадиях роста *M. tuberculosis* и в экстремальных условиях окружающей среды внутри фагосом МФ (Coskun *et al.*, 2021). Новизной данной работы является исследование «раннего» ответа экспрессии 6 генов мнРНК: Mpr5, Mcr3,

Mcr15, Mcr7, Mpr11 и Mpr18. Показано, что экспрессия гена Mpr5 индуцировалась в условиях «осмотического», «голодания» и кислотного стрессов и подавлялась при гипоксии и оксидативном NO стрессе. Экспрессия гена Mcr3 увеличивалась в условиях «голодания» и гипоксии, но уменьшалась в условиях «осмотического» стресса. Уровень представленности транскриптов Mcr15 был выше в условиях «осмотического», «голодания», гипоксии и оксидативного H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> стрессов, но ниже - в условиях оксидативного NO стресса, по сравнению с контролем. Экспрессия гена Mcr7 увеличивалась при влиянии «осмотического», «голодания», гипоксии и кислотного стрессов, а уменьшалась – при воздействии оксидативных H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и NO стрессов. Представленность транскриптов Mpr11 увеличивалась в условиях «осмотического» и оксидативного H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> стрессов, а транскриптов Mpr18 - в условиях «голодания» и оксидативного H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> стресса, в условиях остальных стрессов эти мнРНК транскрибировались на пониженном уровне, чем в контроле. Полученные данные позволяют высказать предположение о важности перечисленных выше мнРНК в обеспечении адаптационных возможностей туберкулезного микроба в стрессовых условиях.

### Оценка профилактической и терапевтической эффективности препарата «Полиантигенная вакцина для профилактики и вспомогательного лечения туберкулеза ЛТБвак» на животных моделях

**Профилактическую эффективность** препарата «Полиантигенная вакцина для профилактики и вспомогательного лечения туберкулеза ЛТБвак» (далее «ЛТБвак») оценивали на модели острой туберкулезной инфекции у мышей линии C57BL/6 и морских свинок альбиносов, вызванной аэрозольным заражением штаммом *M. tuberculosis* H37Rv в дозе 50-100 КОЕ/животное. Схема эксперимента включала следующие этапы: (1) - подкожная иммунизация животных вакциной «БЦЖ» в дозе 5×10<sup>6</sup> КОЕ/животное; (2) – первая (подкожная) иммунизация препаратом «ЛТБвак» на 3 неделе эксперимента; (3) – вторая (интраназальная для мышей, подкожная для морских свинок) иммунизация препаратом «ЛТБвак» на 5 неделе эксперимента; (4) – аэрозольное заражение вирулентным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv на 10-11 неделе эксперимента; (5) – эвтаназия на 11, 15, 19 и 35 неделях для мышей, на 19 и 38 неделях – для морских свинок (рис. 9).

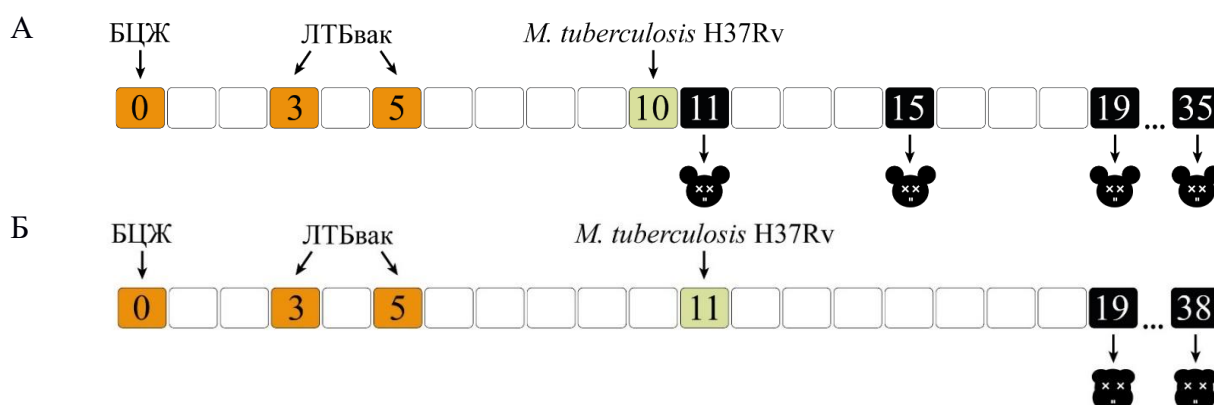


Рис. 9 – Схема экспериментов по оценке протективности препарата «ЛТБвак» на модели острой туберкулезной инфекции у мышей линии C57BL/6 (А) и у морских свинок альбиносов (Б). Арабскими цифрами обозначены недели после начала эксперимента; оранжевый цвет – иммунизация; фисташковый цвет – заражение; черный цвет – эвтаназия

Данные экспериментов по оценке выживаемости животных показали наличие протективного эффекта препарата «ЛТБвак» против туберкулезной инфекции у мышей линии C57BL/6 и морских свинок альбиносов (рис. 10).

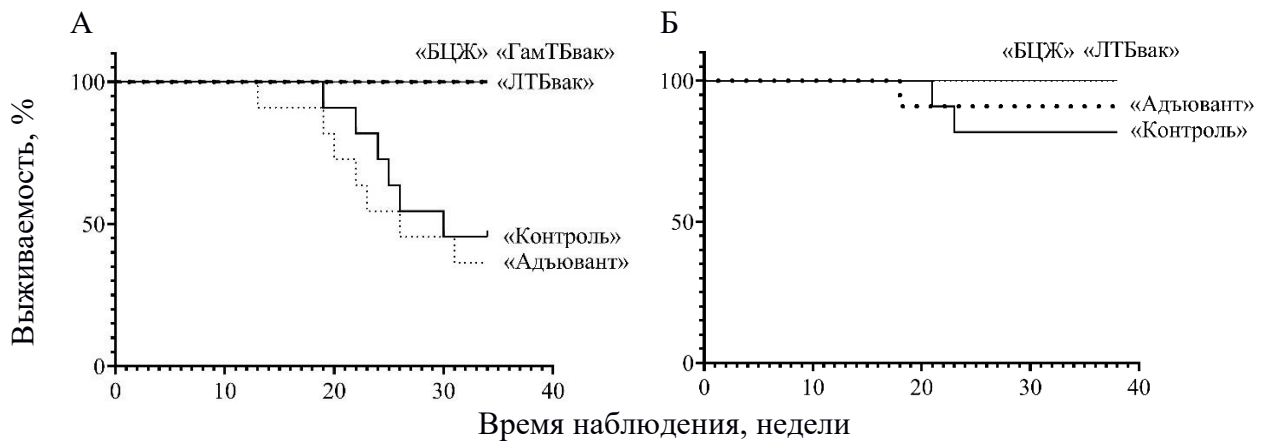


Рис. 10 – Динамика выживаемости мышей линии C57BL/6 (А) и морских свинок альбиносов (Б) после заражения штаммом *M. tuberculosis* H37Rv в дозе 50-100 КОЕ/животное в эксперименте по оценке протективной активности препарата «ЛТБвак»

Микобактериальная нагрузка легких мышей статистически достоверно снижалась на 35 неделе на 2 порядка, по сравнению с аналогичным показателем в группе «Контроль», и в 4 раза – в группе «БЦЖ», а также в селезенке на 2 порядка, по сравнению с этим показателем в группе «Контроль», и в 5 раз - в группе «БЦЖ». Отмечено также статистически достоверное снижение микобактериальной нагрузки в легких морских свинок на 38 неделе на 3 порядка, по сравнению с аналогичным показателем в группе «Контроль», и на 1 порядок - в группе «БЦЖ», а также в селезенке на 4 порядка, по сравнению с этим показателем в группе «Контроль», и на 1 порядок - в группе «БЦЖ» (рис. 11).

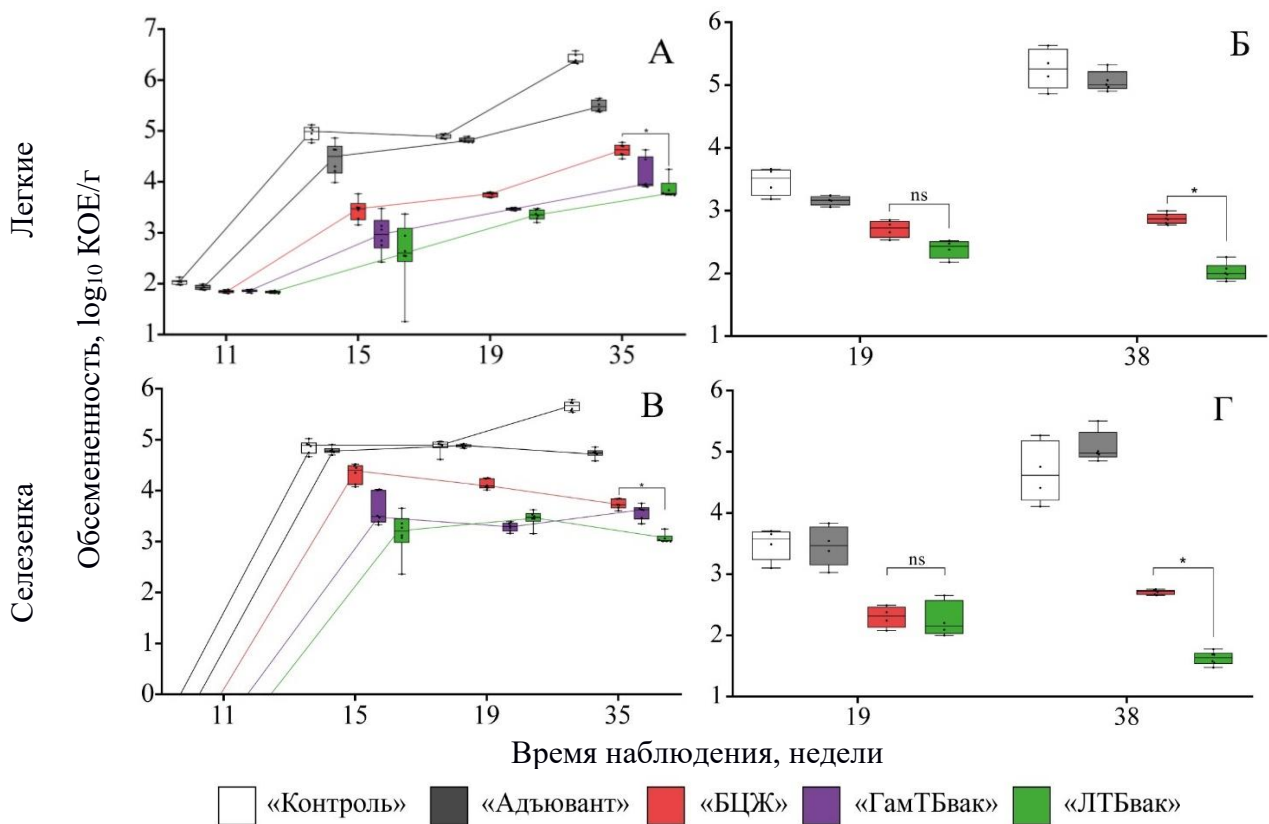


Рис. 11 – Динамика микобактериальной нагрузки в тканях легких и селезенке мышей линии C57BL/6 (А, В) и морских свинок альбиносов (Б, Г) после аэрозольного заражения штаммом *M. tuberculosis* H37Rv в дозе 50-100 КОЕ/животное в эксперименте по определению протективности препарата «ЛТБвак»; ns –  $p > 0,05$ ; \* -  $p \leq 0,05$

На модели туберкулёзной инфекции у мышей к 35 неделе после начала эксперимента по определению протективности препарата «ЛТБвак» выявлены патогистологические изменения в легких животных: в группе «Контроль» - множественные обширные гранулемы, которые соединяются между собой, образуя сплошной клеточный инфильтрат, нарушающий альвеолярное строение респираторного отдела легких; в группе «Адьювант» - гранулемы, занимающие большие участки легких; в группе «БЦЖ» наблюдали МФ в гранулемах, которые разделялись на участки многоклеточными скоплениями лимфоцитов или плазматических клеток; в группе «ГамТБвак» - инфильтрацию легочной паренхимы МФ, которая диффузно распространялась по всему легкому, не ограничиваясь локальными гранулемами; в группе «ЛТБвак» - четко ограниченные от окружающей паренхимы гранулемы, межальвеолярные перегородки имели нормальное строение, на них не распространялась МФ инфильтрация (рис. 12).

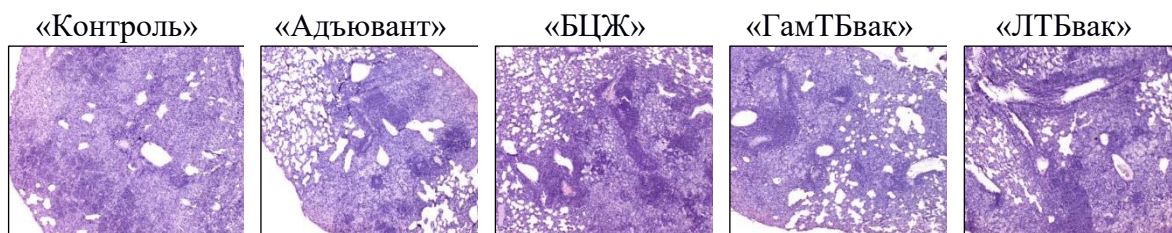


Рис. 12 – Гистологические срезы тканей легких мышей линии C57BL/6 через 35 недель после иммунизации вакциной БЦЖ, с последующей двукратной бустерной иммунизацией препаратом «ЛТБвак» и аэрозольным заражением штаммом *M. tuberculosis* H37Rv

На модели туберкулёзной инфекции у морских свинок в легких через 38 недель после начала эксперимента наблюдали следующие патогистологические изменения: в группе «Контроль» - образование обширных, сливающихся между собой плотных клеточных инфильтратов, а также частичную утрату альвеолярного строения респираторного отдела легких; в группе «Адьювант» - множественные обширные гранулемы, состоящие из нескольких соединенных между собой участков, внутренняя часть которых подвергалась некрозу; в группе «БЦЖ» - крупные гранулемы с некрозом клеток внутри; в группе «ЛТБвак» - небольшой величины гранулемы, нормальное строение паренхимы не было нарушено (рис. 13).

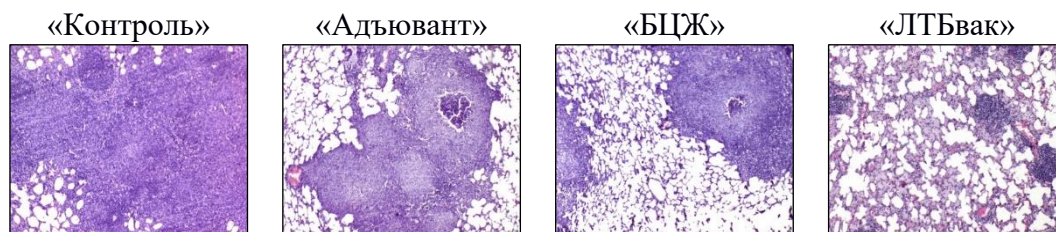


Рис. 13 – Гистологические срезы тканей легких морских свинок альбиносов через 38 недель после иммунизации вакциной БЦЖ, с последующей двукратной бустерной иммунизацией препаратом «ЛТБвак» и аэрозольным заражением штаммом *M. tuberculosis* H37Rv

**Терапевтический эффект** препарата «ЛТБвак» изучали на модели хронической туберкулёзной инфекции у мышей линии C57BL/6 в эксперименте, включающем следующие этапы: (1) - внутрибрюшинное заражение мышей линии C57BL/6 в дозе  $1 \times 10^4$  КОЕ/мышь; (2) – первая эвтаназия для контроля обсемененности внутренних органов на 12 неделю после заражения; (3) – первая (подкожная) инъекция препарата «ЛТБвак» в дозе 5 на 16 неделе эксперимента; (4) – вторая (подкожная) инъекция препарата «ЛТБвак» в дозе 5 на 19 неделе эксперимента; (5) – третья (подкожная) инъекция препарата «ЛТБвак» в дозе 5 на 22 неделе эксперимента; (6) – вторая и третья эвтаназия на 25 и 29 неделе, соответственно (рис. 14).



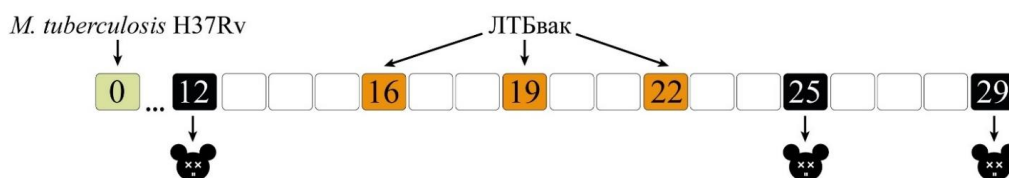


Рис. 14 – Схема эксперимента по оценке терапевтической эффективности препарата «ЛТБBак» на модели хронической туберкулезной инфекции у мышей линии C57BL/6

Показано, что трехкратное введение препарата «ЛТБBак» мышам, больным хроническим туберкулезом, на 16, 19 и 22 неделях после заражения обеспечивало статистически достоверное снижение микобактериальной обсемененности легких и селезенке мышей, по сравнению с аналогичным показателем в контрольных группах (рис. 15).

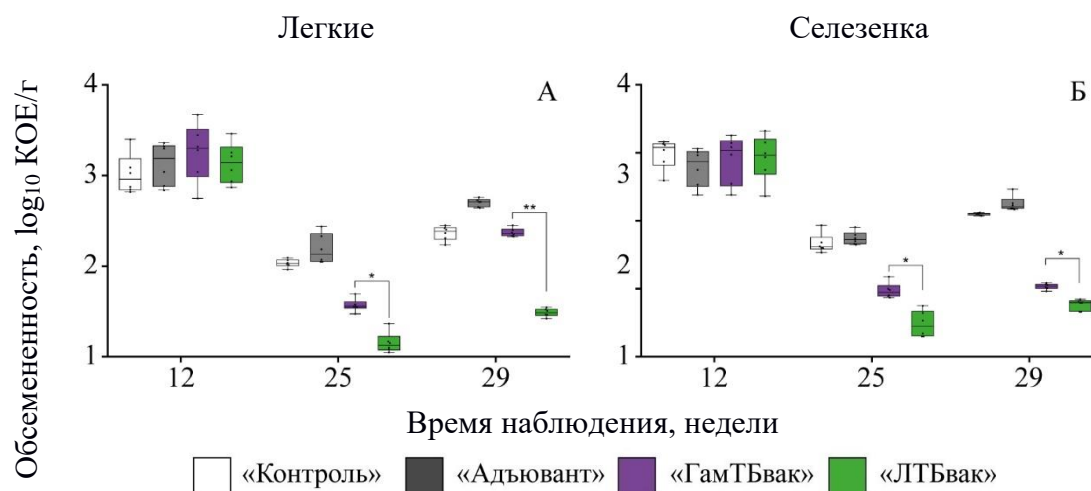


Рис. 15 – Динамика микобактериальной нагрузки в тканях легких (А) и селезенки (Б) мышей линии C57BL/6 после внутрибрюшинного заражения штаммом *M. tuberculosis* H37Rv в дозе  $1 \times 10^4$  КОЕ/животное в эксперименте по определению терапевтической эффективности препарата «ЛТБBак». \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$

На модели хронической туберкулёзной инфекции у мышей к 29 неделе после заражения штаммом *M. tuberculosis* в эксперименте по определению терапевтической активности препарата «ЛТБBак» выявлены патогистологические изменения в легких животных: в группе «Контроль» - широкие периваскулярные скопления из лимфоцитов и плазматических клеток, паренхима между которыми была плотно инфильтрирована МФ, сохранялись небольшие участки паренхимы, имеющей альвеолярное строение; в группе «Адьювант» - альвеолярное строение было полностью разрушено, бронхи не выявлялись; в группе «ГамТBак» - несколько крупных гранул, паренхима, окружающая гранулемы, сохраняла альвеолярное строение; в группе «ЛТБBак» - диффузное утолщение межальвеолярных перегородок и единичные периваскулярные и перибронхиальные скопления лимфоцитов (рис. 16).

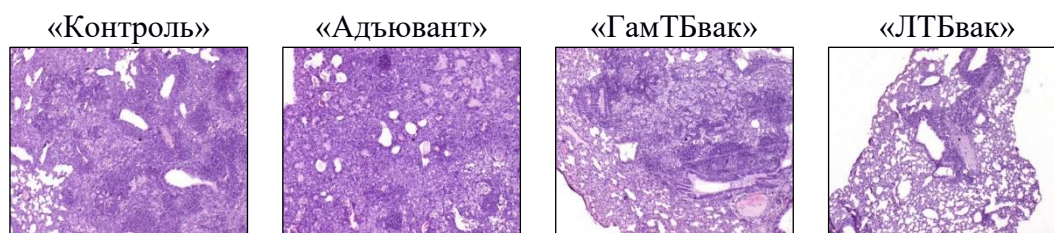


Рис. 16 – Гистологические срезы тканей легких мышей линии C57BL/6 через 29 недель после внутрибрюшинного заражения штаммом *M. tuberculosis* H37Rv и трехкратной терапии препаратом «ЛТБBак»



## Заключение

Объектом данного исследования являлись штаммы возбудителя туберкулеза *M. tuberculosis*, представители наиболее часто встречающихся генетических клад генотипа Beijing в Российской Федерации - B0/W148 и CAO. **Распространение штаммов, принадлежащих к этим генетическим линиям, является проблемой здравоохранения РФ, поскольку повышает напряженность эпидемиологической ситуации по ТБ, увеличивает риск роста заболеваемости и смертности в популяции населения.**

Показано, что охарактеризованные нами штаммы *M. tuberculosis* несли в своих геномах специфичные SNPs, характерные для генетических клад: 43 SNPs для B0/W148 у штамма 267/47 и 46 SNPs – для CAO у штаммов Ростов и 120/26. Большинство специфичных для этих генетических клад SNPs локализованы в генах, связанных с формированием клеточной стенки, с метаболизмом и дыханием и гипотетическими белками. В генетической кладе CAO, кроме того, специфичные SNPs обнаружены в 8 участках межгенных пространств.

Штамм *M. tuberculosis* Ростов отнесен к фенотипу резистентности пред-ШЛУ, характеризующемуся устойчивостью к семи противотуберкулезным препаратам: 1 ряда (изониазиду, рифампицину, стрептомицину и этамбутолу) и 2 ряда (амикацину, канамицину, капреомицину). В геноме этого штамма идентифицированы 5 значимых мутаций, ассоциированных с устойчивостью к противотуберкулезным препаратам (*katG*, *rpoB*, *rpsL*, *embB* и *rrs*), а также компенсаторная мутация в гене *rpoC*, кодирующем  $\beta$ -субъединицу РНК-полимеразы. Штаммы *M. tuberculosis* 267/47 и 120/26 охарактеризованы как ШЛУ и МЛУ, соответственно. Штамм *M. tuberculosis* 267/47 проявлял устойчивость к пяти противотуберкулезным препаратам 1 ряда (изониазиду, рифампицину, стрептомицину, этамбутолу и пипразинамиду) и четырем противотуберкулезным препаратам 2 ряда (амикацину, канамицину, капреомицину и офлоксацину). Данный фенотип ассоциирован с наличием 6 точечных мутаций в генах, ассоциированных с антибиотикорезистентностью (*katG*, *rpoB*, *rpsL*, *embB*, *rrs* и *gyrA*) и 2 точечных мутаций в промоторных областях генов (*inhA* и *pncA*). Штамм *M. tuberculosis* 120/26 характеризовался устойчивостью к 4 противотуберкулезным препаратам 1 ряда (изониазиду, рифампицину, стрептомицину и этамбутолу). В геноме данного штамма идентифицированы 4 точечные мутации в генах, ассоциированных с антибиотикорезистентностью (*katG*, *rpoB*, *rpsL* и *embB*).

Клинические штаммы *M. tuberculosis* Ростов, 267/47 и 120/26 характеризовались более высоким уровнем вирулентности, по сравнению с референс-штаммом *M. tuberculosis* H37Rv, на основании анализа гибели мышей, внешнего вида животных и морфологии внутренних органов, а также показателей обсемененности паренхиматозных органов мышей микобактериями и гистологической картины срезов внутренних органов. Коэффициенты полуколичественной оценки гистологических срезов органов мышей, зараженных клиническими штаммами, составили: в легких 7 баллов, в печени - 8-11 баллов, а зараженных штаммом H37Rv – 5 баллов в обоих органах. **Полученные данные позволили предположить, что наличие специфических свойств и детерминант, характерных для клад B0/W148 и CAO, может давать им эволюционное преимущество в популяциях возбудителя туберкулеза.**

Разработан набор праймеров для детекции и определения уровней транскрипции генов цитокинов, хемокинов и факторов роста мышей. Показан эффект влияния туберкулезной инфекции у мышей, вызванной штаммами *M. tuberculosis* генетических клад B0/W148 и CAO, на иммунную систему животных, который выразался в изменении уровней транскрипции 26 генов цитокинов (*Ifn- $\gamma$* , *Tnf- $\alpha$* , *Il-1 $\alpha$* , *Il-1 $\beta$* , *Il-6*, *Il-7*, *Il-10*, *Il-12(p35)*, *Il-12(p40)*, *Il-13*, *Il-15*, *Il-17*, *Mx1*, *IFI44*, *Cxcl2*, *Cxcl5*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Ccl2*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Ccl11*, *Csf1*, *Csf2* и *Vegf*) в тканях легких. Различия в динамике изменений уровней транскрипции этих генов, по-видимому, свидетельствовали о различиях в механизмах вирулентности как клинических штаммов генетических клад B0/W148 и CAO между собой, так и в сравнении с таковыми референсного вирулентного штамма *M. tuberculosis* H37Rv. **Данный набор праймеров может быть использован для оценки иммунного ответа лабораторных мышей не только на**

***M. tuberculosis*, но и на другие патогены, а также для определения степени модуляции иммунной системы при испытании новых профилактических и терапевтических препаратов.**

Объектом данного исследования являлись также 10 мнРНК и изучение их представленности в клетках *M. tuberculosis* в стрессовых условиях культивирования *in vitro*, моделирующих основные стрессовые факторы («осмотический», «голодание», гипоксический, «кислотный», оксидативный), воздействующие на микобактерии в фагосомах макрофагов организма-хозяина. Показано, что в ответ на воздействие каждого из перечисленных стрессов уникальным образом изменялась представленность 10 выбранных для исследования мнРНК. **Полученные данные позволяют высказать предположение о важности перечисленных выше мнРНК в обеспечении адаптационных возможностей туберкулезного микроба в стрессовых условиях.**

В ходе исследования изучена профилактическая и терапевтическая противотуберкулезная активность препарата «Полиантигенная вакцина для профилактики и вспомогательного лечения туберкулеза ЛТБвак», разработанного в Национальном исследовательском центре эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи, на основе слитых белков четырех антигенов *M. tuberculosis*. Показано, что **испытуемый препарат «ЛТБвак» усиливал защитное действие живой вакцины «БЦЖ» на моделях острой туберкулезной инфекции у мышей линии С57BL/6 и у морских свинок альбиносов.** Это проявлялось в статистически достоверном снижении микобактериальной нагрузки в легких и селезенке животных в результате двукратной иммунизации бустерным препаратом на 3 и 5 неделях после иммунизации вакциной «БЦЖ», по сравнению с аналогичными показателями в контрольных группах. Протективные свойства препарата «ЛТБвак» подтверждены результатами экспериментов по оценке выживаемости животных, морфологии внутренних органов и гистологических срезов паренхиматозных органов. **Терапевтический эффект препарата «ЛТБвак» продемонстрирован на модели хронической туберкулезной инфекции у мышей линии С57BL/6.** Трехкратное введение данного препарата мышам, больным хроническим туберкулезом, на 16, 19 и 22 неделях после заражения обеспечивало статистически достоверное снижение микобактериальной обсемененности легких и селезенки мышей, по сравнению с аналогичным показателем в контрольных группах, что подтверждено изучением морфологии внутренних органов и гистологических срезов паренхиматозных органов животных.

### **Выводы**

1. Штаммы *M. tuberculosis* Ростов, 267/47 и 120/26, выделенные от людей с тяжелыми формами туберкулеза, охарактеризованы как гипервирулентные, по сравнению с референсным вирулентным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv, на основании динамики гибели зараженных ими мышей линии С57BL/6, показателей обсемененности и гистологической картины срезов паренхиматозных органов. Определена их принадлежность к широко распространенным в РФ генетическим кладам SAO и B0/W148 генотипа Beijing. Штаммы депонированы в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболensk», геномы размещены в базе данных GenBank.

2. В геномах штаммов *M. tuberculosis* 120/26, Ростов и 267/47 идентифицированы мутации, ассоциированные с фенотипами множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), пред-широкой лекарственной устойчивости (пред-ШЛУ) и широкой лекарственной устойчивости (ШЛУ), соответственно.

3. Инфицирование мышей линии С57BL/6 гипервирулентными штаммами *M. tuberculosis* 267/47 и 120/26 индуцировало в легких животных дифференциальные изменения уровней транскрипции 26 генов цитокинов *Ifn-γ*, *Tnf-α*, *Il-1α*, *Il-1β*, *Il-6*, *Il-7*, *Il-10*, *Il-12(p35)*, *Il-12(p40)*, *Il-13*, *Il-15*, *Il-17*, *Mx1*, *IFI44*, *Cxcl2*, *Cxcl5*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Ccl2*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Ccl11*, *Csf1*, *Csf2* и *Vegf*.

4. Экспрессия генов 10 малых некодирующих РНК MTS0997/Mcr11, MTS1338/Drrs, MTS2823/Ms1, B11/C6, Mpr5, Mcr3, Mcr15, Mcr7, Mpr11, Mpr18 в клетках *M. tuberculosis*

изменялась под воздействием стрессовых факторов *in vitro*, моделирующих стрессы, существующие в фагосомах макрофагов.

5. Использование препарата «Полиантигенная вакцина для профилактики и вспомогательного лечения туберкулеза ЛТБвак» для БЦЖ-бустерной иммунизации мышей линии C57BL/6 и морских свинок альбиносов обеспечивало животным профилактическую противотуберкулезную защиту, что выражалось в снижении микобактериальной нагрузки в органах мышей в ~5 раз и морских свинок в ~10 раз, а также в уменьшении патологических изменений в легких животных.

6. Терапевтическая эффективность препарата «Полиантигенная вакцина для профилактики и вспомогательного лечения туберкулеза ЛТБвак» продемонстрирована на модели хронической туберкулезной инфекции у мышей линии C57BL/6, что выражалось в снижении микобактериальной обсемененности легких и селезенки мышей в ~10 раз и подтверждено гистологической картиной паренхиматозных органов.

#### **Рекомендации по использованию результатов диссертационного исследования**

1. Размещенные в базе данных геномы штаммов *M. tuberculosis* могут быть использованы для сравнительного анализа геномов возбудителя туберкулеза разных генетических линий.

2. Набор праймеров для детекции и количественного определения транскриптов генов цитокинов мышей с помощью ПЦР в реальном времени рекомендуется использовать для изучения ответа иммунной системы мышей на уровне изменения экспрессии генов цитокинов в ответ на разные типы воздействий, такие как инфекции микроорганизмов, токсины и др.

3. Результаты изменения экспрессии генов мРНК в клетках *M. tuberculosis* в стрессовых условиях могут быть использованы в дальнейших экспериментах по изучению роли мРНК в разных физиологических процессах возбудителя туберкулеза.

4. Результаты тестирования препарата «Полиантигенная вакцина для профилактики и вспомогательного лечения туберкулеза ЛТБвак» могут быть использованы на дальнейших этапах клинических испытаний препарата.

#### **Публикации автора по теме диссертации**

##### **Статьи в реферируемых научных журналах**

1. Azhikina, T.L. Role of small noncoding RNAs in bacterial metabolism / T.L. Azhikina, D.V. Ignatov, E.G. Salina, **M.V. Fursov**, A.S. Kaprelyants // *Biochemistry (Mosc)*. – 2015. – Vol. 80, No. 13. – P. 1633-1646. **WoS IF = 1,537. Цит. 6.**

2. Ignatov, D.V. Dormant non-culturable *Mycobacterium tuberculosis* retains stable low-abundant mRNA / D.V. Ignatov, T.L. Azhikina, E.G. Salina, **M.V. Fursov**, T.A. Skvortsov, A.S. Kaprelyants // *BMC Genomics*. – 2015. – Vol. 16, No. 1. – P. 954. **WoS IF = 4,257. Цит. 39.**

3. **Фурсов М.В.** Модели покоящегося состояния *Mycobacterium tuberculosis in vitro* и латентной туберкулезной инфекции *in vivo* / **М.В. Фурсов**, И.А. Дятлов, В.Д. Потапов // *Клин. Лаб. Диагн.* - 2019. - Т. 64, № 5. - С. 299-307. **Scopus IF = 0,544. Цит. 2.**

4. **Fursov, M.V.** Genotyping, assessment of virulence and antibacterial resistance of the Rostov strain of *Mycobacterium tuberculosis* attributed to the Central Asia Outbreak clade / **M.V. Fursov**, E.A. Shitikov, J.A. Bespyatykh, A.G. Bogun, A.A. Kislichkina, T.I. Kombarova, T.I. Rudnitskaya, N.S. Grishenko, E.A. Ganina, L.V. Domotenko, N.K. Fursova, V.D. Potapov, I.A. Dyatlov // *Pathogens*. - 2020. - Vol. 9, - N 5. – P. 335. **WoS IF = 3,725. Цит. 3.**

5. **Fursov, M.V.** MDR and pre-XDR clinical *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains: assessment of virulence and host cytokine response in mice infectious model / **M.V. Fursov**, E.A. Shitikov, D.A. Lagutkin, A.D. Fursova, E.A. Ganina, T.I. Kombarova, N.S. Grishenko, T.I. Rudnitskaya, D.A. Bespiatykh, N.V. Kolupaeva, V.V. Firstova, L.V. Domotenko, A.E. Panova, A.S. Vinokurov, V.A. Gushchin, A.P. Tkachuk, I.A. Vasilyeva, V.D. Potapov, I.A. Dyatlov //

## Базы данных

6. База данных «Гены вирулентности *Mycobacterium tuberculosis*»

## Статьи в других изданиях

7. Дятлов, И.А. Генотипирование и оценка вирулентности на мышинной модели штамма *Mycobacterium tuberculosis* с широкой лекарственной устойчивостью, выделенного в Российской Федерации. / И.А. Дятлов, В.Д. Потапов, Т.И. Комбарова, **М.В. Фурсов**, А.Г. Богун, Т.Н. Мухина, А.А. Кисличкина, Л.А. Кадникова, С.А. Благодатских, Е.А. Ганина, Т.П. Морозова, Л.В. Домотенко, К.В. Детушев, М.В. Храмов // Бактериология. - 2017. - Т. 2, № 1. - С. 35-45. IF = 0. Цит. 0.

8. Колупаева Н.В. Экспрессия малых некодирующих РНК *Mycobacterium tuberculosis* при культивировании в стрессовых условиях *in vitro* и моделировании туберкулеза у мышей / Н.В. Колупаева, М.В. Фурсов, Н.С. Грищенко, Т.И. Рудницкая, Т.И. Комбарова, Е.А. Ганина, В.Д. Потапов, И.А. Дятлов // Бактериология. - 2021. -Т. 6, № 4. - С. 9-15.

## Тезисы научных конференций

9. **Фурсов М.В.** Малые некодирующие РНК могут принимать участие в регуляции покоящегося состояния *Mycobacterium tuberculosis*. / **М.В. Фурсов**, Е.Г. Салина, Д.В. Игнатов, Т.А. Скворцов, Т.Л. Ажикина, А.С. Капрельянец // «Биология – наука XXI века» 18-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых, Пущино, 21-25 апреля 2014 г. - С. 285-286.

10. **Фурсов М.В.** Изменение уровней экспрессии малых некодирующих РНК *Mycobacterium tuberculosis* в ответ на стрессовые условия окружающей среды / **М.В. Фурсов**, И.А. Дятлов, В.Д. Потапов // Международная научно-практическая конференция «Молекулярная диагностика 2018», Минск, 27-28 сентября 2018 г. – С. 201.

11. **Фурсов М.В.** Малые некодирующие РНК *Mycobacterium tuberculosis* – новые перспективы в диагностике туберкулеза / **М.В. Фурсов** // Всероссийская научно-практическая конференция молодых учёных и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены», Лужки, Московская область 24-26 октября 2018 г.– устный доклад.

12. **Фурсов М.В.** Детекция внеклеточных малых РНК *Mycobacterium tuberculosis* / **М.В. Фурсов**, Т.И. Комбарова, И.А. Дятлов, В.Д. Потапов // Международная конференция «Молекулярные основы эпидемиологии, диагностики, профилактики и лечения актуальных инфекций», Санкт-Петербург, 4-6 декабря 2018 г. – Инф. Иммуно. - 2018. – Т. 8, №4. – С. 661.

13. **Фурсов М.В.** Микробиологическая и молекулярно-генетическая характеристика штамма *Mycobacterium tuberculosis* с широкой лекарственной устойчивостью / **М.В. Фурсов**, В.Д. Потапов, Т.И. Комбарова, А.Г. Богун, И.А. Дятлов // XI Ежегодный Всероссийский Конгресс по инфекционным болезням с международным участием «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы», г. Москва, 1-3 апреля 2019 г. – С. 244-245. - устный доклад.

14. Колупаева Н.В. Влияние изменения условий окружающей среды на уровни экспрессии малых некодирующих РНК в клетках *Mycobacterium tuberculosis* / Н.В. Колупаева, **М.В. Фурсов**, В.Д. Потапов // 24 Международная школа-конференция молодых ученых «Биология – наука 21 века», Пущино, 2020 г.

15. Колупаева Н.В. Оценка вирулентности клинических штаммов *Mycobacterium tuberculosis in vivo*/ Н.В. Колупаева, Т.И. Рудницкая, **М.В. Фурсов** // Всероссийский научно-практическая конференция с международным участием, посвященной 100-летию академика И.Н. Блохиной «Эпидемиологический надзор за актуальными инфекциями: новые угрозы и вызовы», Нижний Новгород, 26–27 апреля 2021 г.– С. 346-348.

16. **Фурсов М.В.** Оценка эффективности прототипа рекомбинантной бустерной вакцины ЛТБвак для лечения хронического туберкулеза на модели мышей / **М.В. Фурсов**, Д.В. Васина,

В.Д. Потапов, В.А. Гущин, А.П. Ткачук // XIV Ежегодный Всероссийский конгресс по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы», Москва, 28-30 марта 2022 г. – С. 172.

#### Список сокращений и условных обозначений

ТБ	туберкулез
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
МПК	Минимальные подавляющие концентрации
МЛУ	множественная лекарственная устойчивость
пред-ШЛУ	пред-широкая лекарственная устойчивость
ШЛУ	широкая лекарственная устойчивость
МФ	макрофаги
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК	Рибонуклеиновая кислота
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
SNP	Single Nucleotide Polymorphism, однонуклеотидный полиморфизм
CAO	Central Asia Outbreak, генетическая клада генотипа Beijing
B0/W148	генетическая клада генотипа Beijing
мнРНК	Малые некодирующие РНК
БЦЖ	Бацилла Кальмета-Герена, противотуберкулезная вакцина
«ЛТБвак»	Кандидатная БЦЖ-бустерная рекомбинантная субъединичная противотуберкулезная вакцина (НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи)