

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
Федеральное бюджетное учреждение науки
«Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»

На правах рукописи

Фурсов Михаил Васильевич

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГИПЕРВИРУЛЕНТНЫХ
ШТАММОВ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Специальности: 1.5.11. Микробиология

1.5.4. Биохимия

Диссертация

на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Научные руководители:

доктор биологических наук
Потапов Василий Дмитриевич,

академик РАН, доктор медицинских наук,
профессор Дятлов Иван Алексеевич

Оболенск – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1 Туберкулез – социально значимая инфекция.....	10
1.2 Возбудитель туберкулеза <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	17
1.3 Моделирование туберкулезной инфекции и покоящегося состояния туберкулезного микроба.....	46
1.4 Противотуберкулезные профилактические и терапевтические вакцины.....	55
Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	57
2.1 Микробиологические методы.....	57
2.2 Биохимические методы.....	60
2.3 Молекулярно-генетические методы.....	62
2.4 Биоинформатические методы.....	65
2.5 Биологические методы.....	66
2.6 Гистологические методы.....	68
2.7 Статистические методы.....	69
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	
Глава 3 Молекулярно-генетическая и фенотипическая характеристика гипервирулентного штамма <i>M. tuberculosis</i> Ростов.....	70
3.1 Культурально-морфологические и биохимические свойства.....	70
3.2 Чувствительность к противотуберкулезным препаратам.....	71
3.3 Генотипирование штамма Ростов.....	72
3.4 Вирулентность штамма Ростов для мышей линии C57BL/6.....	74
3.5 Заключение по Главе 3.....	78
Глава 4 Сравнительная характеристика гипервирулентных штаммов <i>M. tuberculosis</i> 267/47 и 120/26, принадлежащих к сублиниям В0/W148 и САО генотипа Beijing.....	80
4.1 Клинические данные.....	80
4.2 Культурально-морфологические свойства.....	81
4.3 Фенотипы и генотипы чувствительности штаммов <i>M. tuberculosis</i> 267/47 и 120/26 к антитуберкулезным препаратам.....	81

4.4	Генотипирование штаммов <i>M. tuberculosis</i> 267/47 и 120/26.....	82
4.5	Вирулентность штаммов <i>M. tuberculosis</i> 267/47 и 120/26 для мышей...	85
4.6	Анализ ответа иммунной системы мышей на туберкулезную инфекцию на основании оценки изменения цитокинового профиля....	91
4.7	Заключение по Главе 4.....	94
Глава 5	«Ранний» ответ экспрессии генов малых некодирующих РНК <i>M. tuberculosis</i> на изменение окружающей среды культивирования <i>in vitro</i>	98
5.1	Дизайн праймеров, специфичных для генов мнРНК <i>M. tuberculosis</i>	98
5.2	Анализ структуры и возможных мишеней мнРНК <i>in silico</i>	98
5.3	Транскрипционный ответ генов мнРНК <i>M. tuberculosis</i> на стрессы, моделирующие условия в фагосомах макрофагов.....	101
5.4	Заключение по Главе 5.....	105
Глава 6	Оценка профилактической и терапевтической эффективности препарата «Полиантигенная вакцина для профилактики и вспомогательного лечения туберкулеза ЛТБвак» на животных моделях.....	107
6.1	Профилактическая эффективность на модели острой туберкулезной инфекции у мышей линии С57ВL/6.....	106
6.2	Профилактическая эффективность на модели туберкулезной инфекции у морских свинок альбиносов.....	116
6.3	Терапевтическая эффективность на модели хронической туберкулезной инфекции у мышей линии С57ВL/6.....	122
6.4	Заключение по Главе 6.....	128
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	130
	ВЫВОДЫ.....	133
	РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ.....	134
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	135
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	137
	СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....	173
	ПРИЛОЖЕНИЯ.....	176

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Туберкулез (ТБ) – инфекционное заболевание, которое является одной из основных причин смертности во всем мире. До пандемии коронавирусной инфекции COVID-19 туберкулез был основной причиной смертей, вызванных одним инфекционным агентом. В последнее десятилетие в мире в целом отмечается постепенное снижение заболеваемости ТБ. 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. [116, 119].

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 % [119].

Возбудителем ТБ является *M. tuberculosis*, который подразделяется на разные генетические линии, циркулирующие в различных регионах мира. На территории Российской Федерации (РФ) преобладают изоляты сполиготипов Beijing, Ural и LAM, среди которых доля генотипа Beijing достигает 47-72 % в разных регионах страны [94]. 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 [7, 12, 193]. Методами полногеномного секвенирования и биоинформатического анализа выявлены точечные мутации и внутригеномные перестройки, ассоциированные с повышением вирулентных и антибиотикорезистентных

свойств современных штаммов *M. tuberculosis* [193, 128].

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 дефициту железа, недостатку питательных веществ, окислительному стрессу, низкому уровню pH и осмотическому шоку [276]. Установлено, что микобактерии приспосабливаются к такого рода стрессам посредством транскрипционных и посттранскрипционных механизмов, регулируемых в том числе с помощью малых некодирующих РНК [86].

Основным способом профилактики ТБ является вакцинация. В настоящее время вакциной БЦЖ привиты около 90 % населения мира, но несмотря на это каждый день от ТБ умирает ~ 3500 человек [88]. Эффективность вакцины БЦЖ варьирует от 0 до 80 % защиты от легочного ТБ, данная вакцина предотвращает только 5 % смертей, которые можно было бы предотвратить с помощью вакцинации [69]. Вакцина БЦЖ наименее эффективна именно в регионах мира с высоким уровнем заболеваемости ТБ и не рекомендована для профилактики ТБ у ВИЧ-позитивных пациентов [49]. 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 туберкулезом как глобальной угрозой здравоохранения разработаны несколько вариантов новых рекомбинантных противотуберкулезных вакцин на основе новых и модифицированных штаммов микобактерий, комбинаций антигенов туберкулезного микроба и адьювантов, которые находятся на стадии доклинических испытаний (Prime-boost вакцины, H64+CAF01, rBCGΔais1/zmp1) и на разных стадиях клинических испытаний (MVA85A, MTBVAC, ChAdOx1.85A/MVA85A, Ad5 Ag85A, TB/FLU-04L, RUTI, H1/H56:IC31, H4:IC31, ID93+GLA-SE, VPM 1002 (rBCGΔureC:Hly), M72+AS01E, *M. vaccae*) [154].

Цели и задачи исследования

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 мнРНК (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 препарата «Полиантигенная вакцина

для профилактики и вспомогательного лечения туберкулеза ЛТБвак» на моделях острой туберкулезной инфекции у мышей линии C57BL/6 и морских свинок альбиносов, а также терапевтическая эффективность 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 клон *M. tuberculosis* B0/W148 и SAO 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* B-9343, B-9344 и B-9351; 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]; 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*; зарегистрирована в Госреестре База данных «Гены вирулентности *Mycobacterium tuberculosis*». Свидетельство № от ; 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 гипервирулентных штаммов *M. tuberculosis*. Анализ научной литературы, посвященной тематике исследования,

проведен формально-логическими методами. Исследования, направленные на решение поставленных задач, осуществляли общенаучными и специфическими методами. В работе использованы микробиологические, биологические, биохимические, молекулярно-генетические, биоинформационные и статистические методы исследований.

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 мнРНК (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 апробация 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.

Личное участие автора заключалось в анализе научной литературы, планировании экспериментов, в 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. Гуциным В.А.

Материалы диссертации доложены и обсуждены на 8 международных и российских конференциях и симпозиумах: 18 Международной школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пущино, 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», Пущино, 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.

Публикации

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

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Туберкулез – социально значимая инфекция

Туберкулезная инфекция (ТБИ) — это социально-значимое инфекционное заболевание, входящие в перечень 10 основных причин смерти во всем мире и ведущая причина смерти для ВИЧ-инфицированных людей. В 2019 г. около 10 млн чел. заболели туберкулезом и 1,4 млн умерли. Заболевание обычно поражает легкие (легочная ТБИ), но также может поражать другие органы (внелегочная ТБИ) [118]. Исторически ТБИ была зафиксирована у человека с давних времен. В работах по изучению останков скелетов человека было показано, что ТБИ поражала людей еще во времена раннего Неолита [126, 205].

Распространенность туберкулеза в мире и в Российской Федерации

По оценке Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в 2019 г. заболеваемость туберкулезом составила около 10 млн чел., умерли 1,2 млн чел. ВИЧ-негативных и 208 тыс. ВИЧ-позитивных. Наиболее высокий уровень заболеваемости ТБИ отмечен среди взрослого мужского населения (56 %), по сравнению с 32 % взрослого женского населения и 12 % детского населения.

Большинство диагностированных случаев туберкулезной инфекции в мире было зафиксировано на территории регионов Юго-Восточной Азии (44 %), в Африке (25 %), Западной части Тихого океана (18 %), в Восточном Средиземноморье (8,2 %), в Северной и Южной Америках (2,9 %) и Европе (2,5 %). Две трети от общего числа зараженных приходится на восемь стран: Индию (26 %), Индонезию (8,5 %), Китай (8,4 %), Филиппины (6 %), Пакистан (5,7 %), Нигерию (4,4 %), Бангладеш (3,6 %) и Южную Африку (3,6 %) (рисунок 1.1). В период с 2015 по 2019 гг. было отмечено снижение уровня заболеваемости, впервые диагностированной ТБИ на 9 % (с 142 до 130 случаев на 100 тыс. населения). Наиболее выражена эта позитивная тенденция была в Европе (19 %) и Африке (16 %). Всего в 78 странах было отмечено снижение заболеваемости ТБИ на 20 %, среди которых находятся 7 стран из группы стран с высоким уровнем заболеваемости (Камбоджа, Эфиопия, Кения, Намибия, Российская Федерация, Южная Африка и Танзания). В Российской Федерации заболеваемость ТБИ в 2000 г. составила 133 229 чел., а в 2019 г. - 60 531 чел. При этом от ТБИ умерло в 2000 г. 29 966 чел., а в

2019 г. - 7 264 чел. Несмотря на отмеченное снижение заболеваемости и смертности, ТБИ остается среди самых актуальных социально-значимых инфекций как в РФ, так и во всем мире [8].

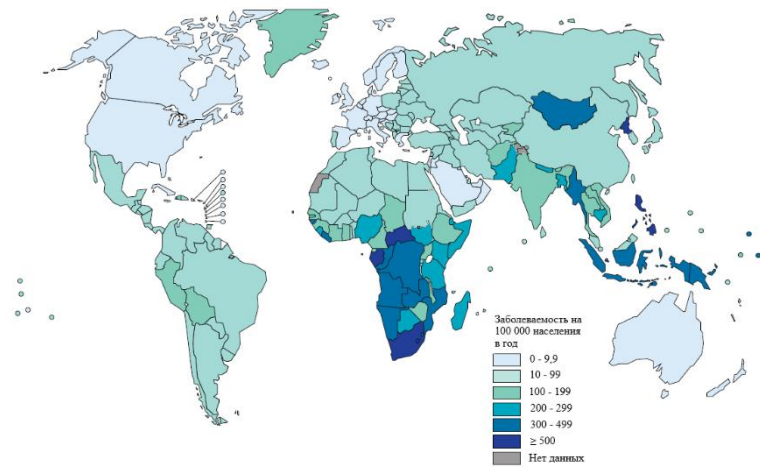


Рисунок 1.1 – Заболеваемость туберкулезом в мире в 2019 г. [118]

На представленном рисунке видно, что максимальные показатели заболеваемости на 100 тыс. населения (≥ 500 случаев) отмечаются в Северной Корее, Филиппинах, Центральноафриканской республике, Габоне и Южно-Африканской республике. В Российской Федерации этот показатель составил в 2019 г. 50 случаев [118].

Наиболее высокие показатели смертности от туберкулеза среди ВИЧ-негативных пациентов (≥ 40 случаев на 100 тыс. населения) в 2019 г. были зафиксированы в Папуа-Новой Гвинее, Непале, Мадагаскаре и ряде африканских стран. В Российской Федерации показатель смертности составил 5,8 случаев (рисунок 1.2).

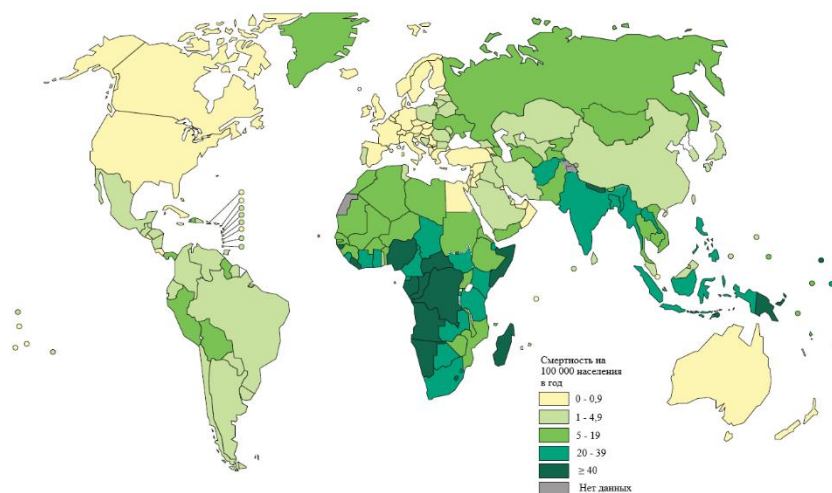


Рисунок 1.2 – Смертность от туберкулеза в мире в 2019 г. среди ВИЧ-негативного населения [118]

Активная и латентная форма туберкулезной инфекции

На основании клинических и эпидемиологических данных, ТБИ у человека может развиваться в двух формах: в виде активного туберкулезного процесса или в виде латентной туберкулезной инфекции (ЛТБИ). Активная форма ТБИ развивается только у 10 % людей, инфицированных клетками *M. tuberculosis*, причем у 5 % инфицированных болезнь развивается в течение 1-2 лет после заражения, а у остальных 5 % - в последующие годы. При латентной форме туберкулеза у людей, инфицированных клетками *M. tuberculosis*, не проявляется каких-либо клинических симптомов, не выявляются рентгенологически изменения в легких и отсутствуют высевы возбудителя из клинических образцов на стандартных питательных средах [106]. По данным ВОЗ, около ¼ человеческой популяции являются носителями ЛТБИ [117], уровень распространенности ЛТБИ в странах с низким и средним уровнем дохода оценивается в 51,5 %, в то время как в странах с высоким доходом - 28,1 % (рисунок 1.3).

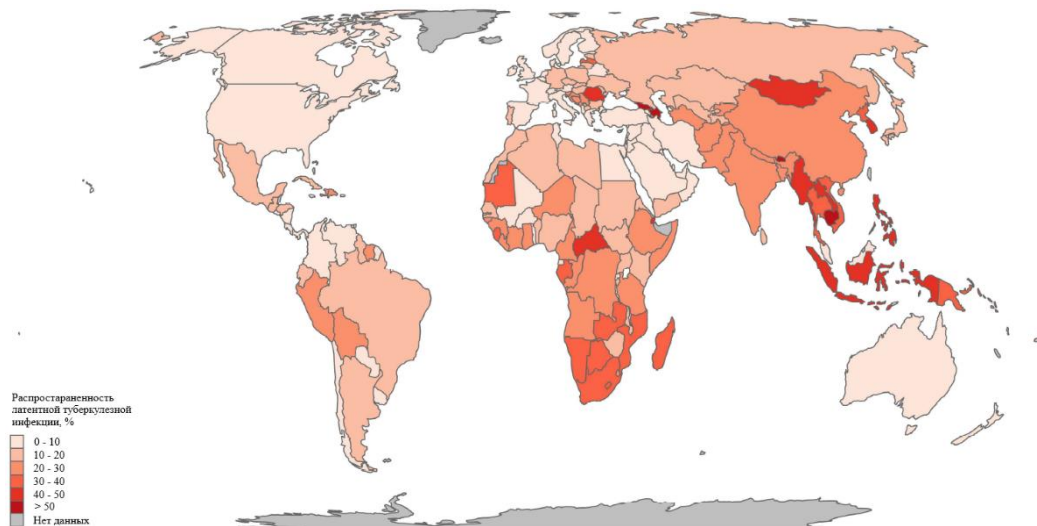


Рисунок 1.3 – Распространенность ЛТБИ среди населения по странам в 2014 г. [129]

Данные, представленные на рисунке 1.3, показывают, что в регионах Тихого океана и Африки уровень распространения ЛТБИ среди населения в 2014 г. составлял около 20 %, в то время как Восточно-Средиземноморском регионе, Европе и Америках – ниже 17 %. Около 80% людей с ЛТБИ проживают в регионах Южной-Восточной Азии, Западной части Тихого океана и Африки. Наибольший уровень распространения ЛТБИ приходится на Китай и Индию (350 млн чел.), а также и Индонезию (120 млн чел.) [129].

Лекарственно-устойчивый туберкулез

ТБИ, вызванная устойчивыми к антитуберкулезным препаратам микобактериями,

является проблемой здравоохранения, поскольку не поддается лечению обычными стандартными противотуберкулезными препаратами. Туберкулез с множественной лекарственной-устойчивостью (МЛУ) — это форма ТБИ, вызванная микобактериями, устойчивыми, по меньшей мере, к сочетанию изониазида и рифампицина. Пред-широкая лекарственная устойчивость (пред-ШЛУ) – устойчивость к изониазиду и рифампицину в сочетании с устойчивостью к фторхинолону или аминогликозиду/полипептиду (канамицин и/или амикацин и/или капреомицин). Туберкулез с широкой лекарственной-устойчивостью (ШЛУ) - форма туберкулеза, вызванная возбудителем, устойчивым не только к изониазиду и рифампицину, но также к одному из фторхинолонов (левофлоксацин или моксифлоксацин) и по меньшей мере к одному из трех инъекционных препаратов второй линии (амикацин, капреомицин или канамицин), а также, как минимум, к бедаквилину и/или линезолиду (<https://www.who.int/tb/areas-of-work/drug-resistant-tb/xdr-tb-faq/ru/>).

Лекарственно-устойчивый туберкулез является серьезной угрозой здоровью населения, потому что процесс его лечения связан с удорожанием и увеличением продолжительности лечения инфекции. В 2018 г. туберкулезом, устойчивым к рифампицину, заболело примерно 0,5 млн чел., из которых 78 % заболели МЛУ туберкулезом [117]. В последние годы наиболее проблемными странами по заболеваемости лекарственно-устойчивым туберкулезом являются Индия (27 %), Китай (14 %) и РФ (8 %). В 2019 г. МЛУ туберкулез составил 3,3 % среди впервые диагностированной и 18 % - среди леченой ТБИ (рисунок 1.4 и 1.5).

Данные, представленные на рисунке 1.4 указывают на то, что в Российской Федерации и странах бывшего СНГ доля МЛУ туберкулеза среди вновь диагностированных случаев ТБИ очень высока (> 20 %). При этом наиболее высокие значения этого параметра приходятся на Беларусь (38 %) и Российскую Федерацию (35 %) [118].

В 2019 г. МЛУ туберкулез у людей, которые ранее уже получали противотуберкулезную терапию, достаточно широко диагностируется в большинстве регионов мира. Наиболее высокие показатели отмечаются в Сомали (88 %), Российской Федерации (71 %), Беларуси (60 %), Киргизстане (60 %) и Республике Молдова (60 %) [118].

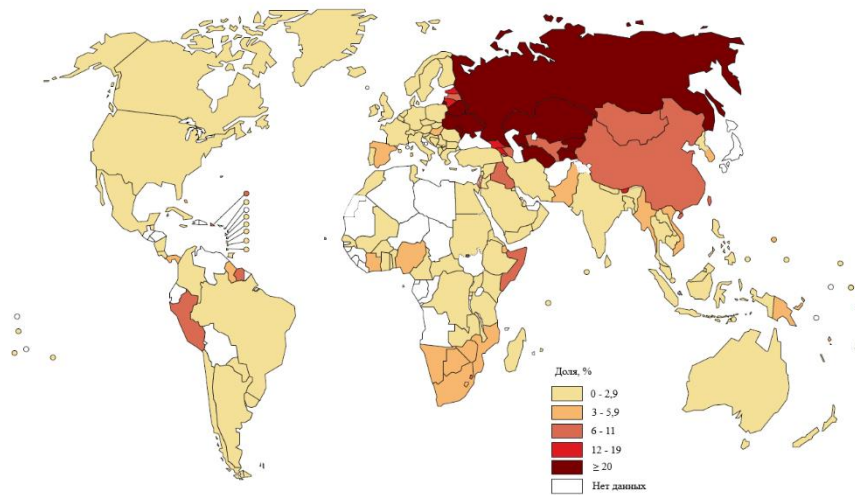


Рисунок 1.4 – Доля МЛУ туберкулеза среди впервые диагностированной ТБИ в мире в 2005-2020 гг. [118]

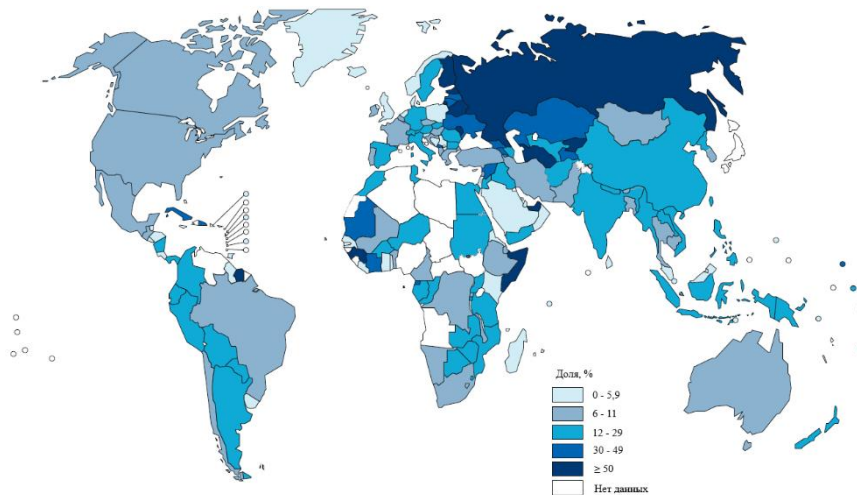


Рисунок 1.5 – Доля МЛУ туберкулеза среди случаев ранее леченого туберкулеза в мире в 2005-2020 гг. [118]

Диагностика туберкулезной инфекции

По оценкам ВОЗ, существует большое несоответствие между оценочным количеством случаев заболевания ТБИ (~10 млн в 2019 г.) и количеством людей с впервые диагностированным туберкулезом (7,1 млн в 2019 г.) из-за отсутствия информирования о детектируемых случаях и не установления диагноза (если люди с ТБИ не могут обратиться в лечебное учреждение или диагноз не установлен). Более половины от объема этого несоответствия связана с пятью странами: Индия (17 %), Нигерия (11 %), Индонезия (10 %), Пакистан (8 %) и Филиппины (7 %). Как правило, уровни бактериологического подтверждения ТБИ ниже в странах с низким уровнем дохода и наоборот в странах с высоким уровнем дохода (рисунок 1.6).

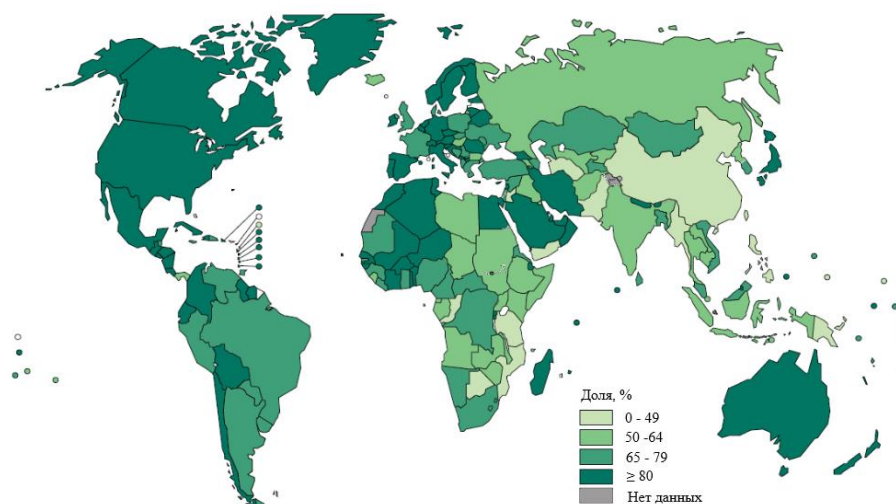


Рисунок 1.6 – Доля новых и рецидивных случаев туберкулеза легких с бактериологическим подтверждением в 2019 г. [118]

В 2018 г. на встрече Организации Объединенных Наций, посвященной туберкулезу, было поставлена цель в пятилетний период 2018-2022 гг. диагностировать ТБИ у 40 млн пациентов, в том числе у 1,5 млн детей, и МЛУ туберкулез у 1,5 млн пациентов, в том числе у 115 тыс. детей. При этом, ежегодное выявление ТБИ в 2018 г. оценивалось в 7 млн чел., а в последующие года по 8 млн чел. в год. Данная задача к 2020 г. была выполнена на 35 %.

Прирост мировой заболеваемости туберкулезом обуславливается тенденциями, отмечаемыми в Индии и Индонезии – странах, занимающих два первых места в мире по количеству новых ТБИ случаев в год. В Индии в 2019 г. выявлено впервые диагностируемой ТБИ на 74 % больше, чем в 2013 г., а в Индонезии - на 69 %. В 2020 г. пандемия COVID-19 негативно повлияла на показатель впервые диагностированного туберкулеза; количество людей с выявленной ТБИ снизилось на 25-50 % за 3 месяца. Таким образом, из-за пандемии возникла угроза обращения вспять достигнутого прогресса в достижении целей по борьбе с туберкулезом [66].

Золотым стандартом диагностики ТБИ является микробиологическое выявление туберкулезного микроба, поскольку это имеет решающее значение для характеристики возбудителя и выбора метода его иллюминации. Методы диагностики на основании клинических проявлений, гистологии легочных тканей, иммунологических реакций и результатов рентгенографии грудной клетки не позволяют с достаточной уверенностью установить диагноз ТБИ. Среди 7,1 млн чел. с впервые диагностированной и леченой ТБИ бактериологическое подтверждение инфекции было проведено у 57 %.

В Российской Федерации опубликованы методические документы, описывающие алгоритм диагностики ТБИ с помощью микробиологических исследований (люминесцентная микроскопия, посев на плотные или жидкие питательные среды, определение лекарственной чувствительности к противотуберкулезным и антибактериальным препаратам) и молекулярно-генетических методов (ПЦР в реальном времени, детекция генетических детерминант устойчивости) [11, 6].

На протяжении длительного времени единственным иммунологическим методом для диагностики ТБИ была реакция Манту [10]. Недостатком этого подхода является возможность ложно-положительной реакции для лиц предварительно вакцинированных БЦЖ [277]. Альтернативным методом туберкулиновому тесту явился метод анализа высвобождения гамма-интерферона (IGRA), который основан на обнаружении секреции интерферона-гамма (IFN- γ) Т-лимфоцитами в ответ на появление специфических антигенов *M. tuberculosis* ESAT-6 и CFP10 [283]. Кроме того, тесты IGRA позволяют диагностировать не только активную ТБИ, но и ЛТБИ [277].

Антибактериальная терапия туберкулеза

В 2019 г. охват лечения ТБИ в мире (отношение количества пациентов, получивших лечение, к показателю заболеваемости) составил 71 %, что выше данного показателя в 2018 г. (69 %) и 2015 г. (59 %). Четыре региона ВОЗ по охвату лечения ТБИ превысили уровень 75 % - Америки, Европа, Юго-Восточная Азия и Западная часть Тихого океана. Из 30 стран с высокими показателями заболеваемости в 2019 г. наибольшего охвата лечения ТБИ (> 80 %) достигли Бразилия, Китай, Российская Федерация и Таиланд, а самые низкие показатели охвата лечения ТБИ (\leq 50 %) были зафиксированы в Центральноафриканской Республике и Нигерии [118].

Стандартная схема лечения ТБИ включает в себя терапию 4 препаратами первого ряда (изониазид, рифампицин, этамбутол и пиразинамид) в течение 2 месяцев с последующим лечением двумя препаратами (изониазид и рифампицин) в течение 4 месяцев. Однако МЛУ и ШЛУ туберкулез не поддается лечению по стандартной схеме. Продолжительность лечения МЛУ составляет от 18 месяцев до двух и более лет, при этом пациенты получали до 7 лекарств [207]. Антибактериальная терапия ШЛУ туберкулеза в большинстве случаев требовала подключения препаратов нового поколения, таких как бедаквилин, линезолид и претоманид [74].

Для лечения ЛТБИ у взрослых и детей старше 2 лет, в том числе ВИЧ-

инфицированных, разработаны несколько вариантов схем антибиотикотерапии: (i) - прием изониазида и рифапентина в течение 3 месяцев 1 раз в неделю; (ii) - ежедневный прием изониазида в течение 6 или 9 месяцев; (iii) – ежедневный прием рифампина в течение 4 месяцев; (iv) – прием изониазида и рифампина в течение 3 месяцев ежедневно [279].

1.2 Возбудитель туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis*

Этиологический агент ТБИ у человека был открыт и идентифицирован в 1882 г. Робертом Кохом, который присвоил ему название *Mycobacterium tuberculosis* [246]. *M. tuberculosis* — это вид патогенных микроорганизмов рода *Mycobacterium*, семейства *Mycobacteriaceae*, подкласса *Actinomycetales*, класса *Actinobacteria*, типа *Actinobacteria*, царства *Bacteria* [233].

Культурально-морфологические и биохимические свойства

Бактерии *M. tuberculosis* - тонкие, прямые или слегка изогнутые палочки со слегка закругленными концами, размеры которых варьируют от $4,3 \times 0,4$ до $1,0 \times 0,2$ мкм, неподвижные спор не образуют [299]. Для идентификации *M. tuberculosis* чаще используется окраска кислотоустойчивыми красителями, как при окрашивании по Цилю-Нильсену, а также флуоресцентными красителями. *M. tuberculosis* относятся к аэробным бактериям, но способны расти в факультативно анаэробных условиях, при температуре 37-38 °С в интервале рН 4,5-8,0, при оптимуме 7,0-7,2. При делении бактерий одна генерация занимает примерно 14-18 ч.

Клетки *M. tuberculosis* имеют необычный для бактерий восковой налет на поверхности за счет миколовых кислот. *De facto* микобактерии являются грамположительными бактериями, но зачастую окрашиваются как грамотрицательные, за счет структуры клеточной стенки, в которой первый слой после пептидогликана состоит из гетерополисахарида арабиногалактана связанного с длинными цепями миколовых кислот [108]. Большинство прокариот синтезируют жирные кислоты длиной C₁₄-C₁₈, а микобактерии – гораздо длиннее, до C₈₆-C₉₅ [32]. Система синтеза жирных кислот (FAS) *M. tuberculosis* состоит из двух компонентов - FASI и FASII, которые отличаются локализацией каталитических доменов на одном или нескольких полипептидах, соответственно [70]. Полипептиды ферментного комплекса FASII являются мишенью для ряда противотуберкулезных препаратов (изониазид, этионамид, изоксил и тиацетазон).

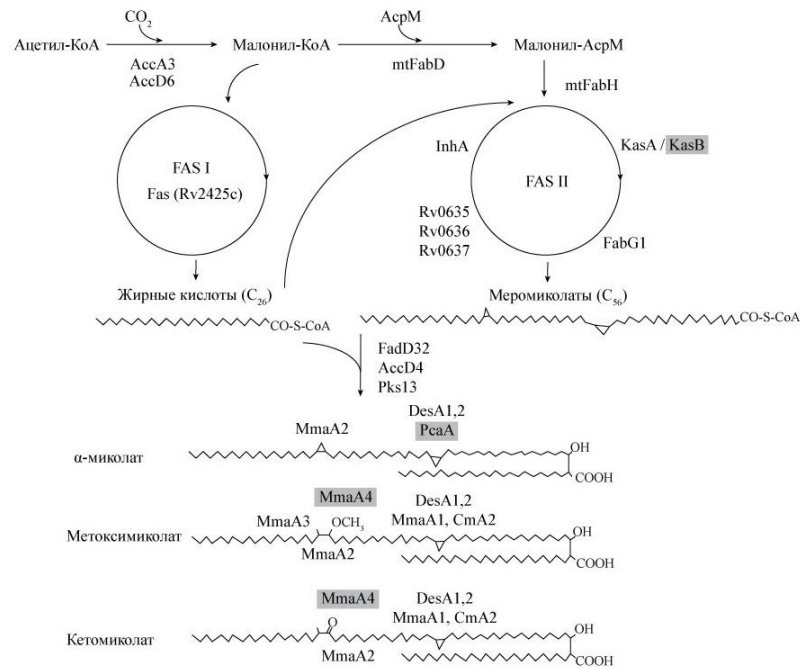
В лабораторных условиях *M. tuberculosis* культивируют на плотных и жидких питательных средах. На плотных питательных средах микобактерии образуют мелкие шероховатые R-колонии кремового цвета, в жидких питательных средах в стационарных условиях образуют пленку на поверхности бульона и рыхлый осадок. Это связано со свойством клеток *M. tuberculosis* образовывать агрегаты и клампы. Жидкие питательные среды обеспечивают более быстрое, по сравнению с плотными питательными средами, размножение микобактерий. Совершенствование селективных жидких сред позволило создать коммерчески доступные системы для клинического выявления возбудителя туберкулеза: BACTEC 460, BBL Septi-Chek AFB, BBL MGIT и BACTEC MGIT 960 (BD, США), MB/BacT (Organon Teknika, США) и BacT/Alert 3D (BioMerieux, Франция), VersaTREK® Mycobacteria Detection (Thermo Fisher Scientific, США) [9].

Факторы патогенности возбудителя туберкулеза

M. tuberculosis обладает большим количеством факторов патогенности, которые подразделяются на 9 категорий: (1) метаболизм липидов и жирных кислот, в том числе катаболизм холестерина; (2) белки клеточной стенки, липопротеины и системы секреции; (3) белки ингибирующие защитные свойства макроорганизма, включая окислительный и нитратный стресс в макрофагах, фагоцитоз и апоптоз; (4) протеинкиназы; (5) протеазы, включая металлопротеазы; (6) белки-транспортеры металлов; (7) регуляторы транскрипции, включая двухкомпонентные системы токсинов-антитоксинов; (8) другие белки вирулентности [103].

Метаболизм липидов и жирных кислот

Важными факторами патогенности *M. tuberculosis* являются ферменты, участвующие в биосинтезе клеточной стенки FASI и FASII: β -кетоацилсинтетаза, синтаза миколовой кислоты (циклопропансинтаза) и синтаза метоксимиколовой кислоты (рисунок 1.7), что было доказано при изучении штаммов - делеционных мутантов по генам, названных ферментов, уровень вирулентности, которых был ниже по сравнению с исходным штаммом дикого типа [37, 91, 115, 232].



KasB - β -кетоацилсинтетаза, PcaA - синтаза миколовой кислоты (циклопропансинтаза),
MmaA4 - синтаза метоксимиколовой кислоты

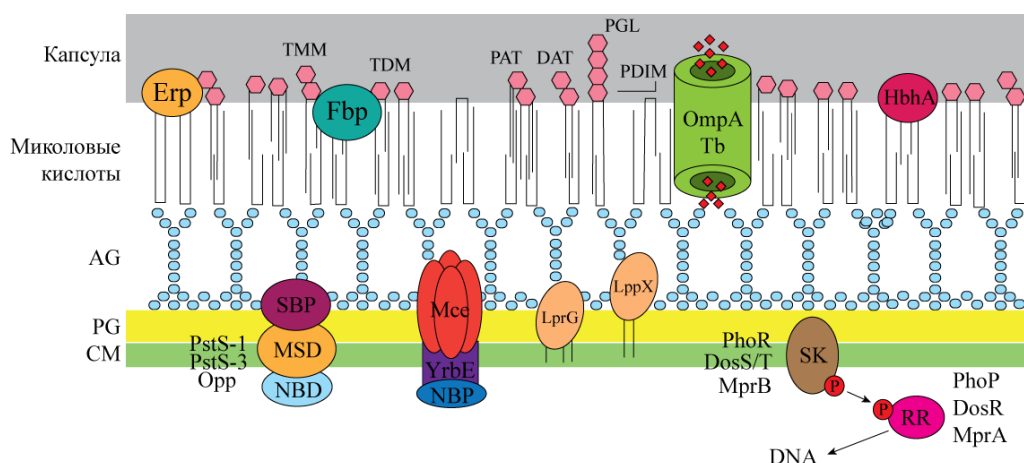
Рисунок 1.7 - Схема биосинтеза трех типов миколовых кислот *M. tuberculosis*. Серым цветом выделены белки, являющиеся факторами патогенности [103, с изменениями]

Холестерин является основным компонентом клеточных мембран человека, участвует в синтезе стероидных гормонов, в регуляции работы иммунной системы, поэтому способность *M. tuberculosis* метаболизировать холестерин представляет собой важный фактор вирулентности возбудителя туберкулеза. Было показано, что клетки *M. tuberculosis* используют холестерин в качестве источника энергии и для биосинтеза липида фтиоцерина димикоцерозата (PDIM), ассоциированного с вирулентностью этого патогена [212]. Кроме того, метаболизм холестерина в ходе инфекции способствовал выживанию *M. tuberculosis* в клетках макроорганизма [191]. Так, штаммы, несущие генетические детерминанты катаболизма холестерина - ген *hsaC* фермента эстрадиол диоксигеназы HsaC, оперон *igr*, содержащий гены гипотетического цитохрома P450 (*cup125*), двух ацил-КоА-дегидрогеназ (*fadE28/29*), двух консервативных гипотетических белков (Rv3541c, Rv3542c) и гипотетического белка-переносчика липида (*ltp2*) проявляют вирулентные свойства в полной мере [302, 143, 59].

Важность метаболизма липидов и жирных кислот как факторов патогенности для *M. tuberculosis* подтверждается тем, что большая доля генома этих бактерий (около 250 генов) участвуют в этом метаболизме, по сравнению с 50 генами у *Escherichia coli*, которые имеют приблизительно такой же размер генома [203].

Белки клеточной стенки, липопротеины и системы секреции

Отличительным признаком клеточной стенки *M. tuberculosis* является комплексная структура, состоящая из сложных липидов и белков. Внешний слой клеточной стенки образует капсулу, которая состоит из полисахаридов, незначительного количества липидов и встроенных белков, отвечающих за адгезию, транспорт и выживаемость микобактерий в клетках организма хозяина (рисунок 1.8).



Erp, Fbp, HbhA - поверхностные белки OmpATb – порин, Pst-1, Pst-3, Opp и Mce - ABC-транспортёры, состоящие из субстрат-связывающих белков (SBP), пермиаз (MSD) и нуклеотид-связывающих белков (NBD), PhoR-P, DosS/T-R и MprAB - двухкомпонентные системы, состоящие из сенсорной киназы (SK) и регулятора ответа (RR), LppX и LprG – липопротеины, AG – арабиногалактан, PG – пептидогликан, CM – цитоплазматическая мембрана, TMM – мономиколат трегалозы, TDM – димиколат трегалозы, DAT – диацил-трегалоза, PAT - полиацил-трегалоза, PDL - фенольный гликолипид, PDIM - димикоцерозат фтиоцерола, SL – сульфолипид

Рисунок 1.8 – Схема строения клеточной оболочки *M. tuberculosis* [103, с изменениями]

Методами протеомики идентифицировано более 500 белков, локализованных в клеточной стенке *M. tuberculosis*, включая липопротеины и секретируемые белки [317, 179]. Среди них 5 % отнесены к факторам патогенности. Белки внешней мембраны (OMP) играют роль в присоединении и инвазии в клетки организма хозяина и в разрушении их структур. Секретируемые белки важны для выживания бактерий и модуляции иммунного ответа хозяина.

Белок Erp (от англ. exported repetitive protein) обычно секретируется в окружающую среду, описан как Р36 белок с молекулярной массой 36 кДа. Предполагается, что этот белок участвует в биосинтезе клеточной стенки, так как его ген локализован между генами *glf* и *csp* биосинтеза липополисахаридов, доказан его вклад в вирулентность в экспериментах *in vivo* с помощью делеционных мутантов [82, 38].

Комплексный белок Fbp (от англ. fibronectin binding protein) образует комплекс с

фибронектином, известен как антиген Ag85, кодируется генами *fbpA* (Rv3804), *fbpB* (Rv1886c) и *fbpC2* (Rv0129c). Fbp является основным секретиремым белком *M. tuberculosis*, играет существенную роль в патогенезе туберкулеза, обеспечивая микобактериям адгезию на слизистой и проникновение в клетки хозяина [315, 252]. Белковый комплекс катализирует перенос миколатов на трегалозу с образованием TMM и TDM (рисунок 1.8).

Белки Mce (от англ. mammalian cell entry) - группа секретиремых или локализованных на поверхности клеток *M. tuberculosis* белков, обеспечивают микобактериям способность проникновения в клетки млекопитающих и выживания внутри макрофагов (МФ) [27]. Эти белки кодируются оперонами *mce1*, *mce2*, *mce3* и *mce4*, состоящими из 8 генов: *urbEA*, *urbEB*, *mce* (A, B, C, D, E и F) [70]. Интересно, что экспрессия оперона *mce1* была ассоциирована с пролиферацией микобактерий в клетках хозяина и с переходом инфекции в латентную форму [259].

Порин *OmpATb* формирует поры с диаметром 1,4 и 1,8 нм, что обеспечивает проникновение в цитоплазму малых гидрофильных молекул таких, как арабиноза, глюкоза, сахароза и серин. Роль данного порина важна для обеспечения выживаемости в условиях кислотного стресса в фагосомах клеток макроорганизма [235]. Белок HbhA (от англ. heparin-binding hemagglutinin) – основной адгезин, расположенный на поверхности клетки. Этот белок связывает сульфатированные гликоконъюгаты, такие как гепарин, обеспечивая прикрепление микобактерий к эпителиальным клеткам и фибробластам, а также способствует агрегации микобактерий и образованию биопленок [184]. HbhA играет важную роль в патогенезе туберкулеза, так как он необходим для экстрапульмонарного распространения и взаимодействия с нефагоцитарными клетками [220]. PstA1 и PhoT – белки, участвующие в транспорте неорганических фосфатов. Три ABC фосфатных транспортера *M. tuberculosis* (PstS1, PstS2 и PstS3) вовлечены в импорт фосфатов в ходе голодания микобактерий внутри фагосомы. Белок CaeA (Rv2224c) - фермент карбоксилэстераза, локализованный на клеточной поверхности, относящийся к семейству гидролаз с сериновым активным центром. Этот белок необходим для проявления полной вирулентности на мышах [170]. Эффлюксная система KefB обеспечивает выброс калия из цитоплазмы *M. tuberculosis* и поглощение протонов из просвета фагосомы, что увеличивает значение pH внутри фагосомы, и позволяет избежать фагосомальной ацидификации в МФ [185]. ABC транспортер Opp-Dpp (от англ.

oligopeptide permease Rv1283c-Rv1280c и dipeptide permease, Rv3666c-Rv3663c) важен на начальной стадии инфекции у мышей и для хронической фазы инфекции [251, 280].

Липопротеины (Lpps) – основные компоненты клеточной стенки микобактерий, составляя 1,2-2,5 % протеома [288, 236]. Их основная функция - структурная, но они также могут участвовать в синтезе и/или транспортировке важных компонентов оболочки клетки. Помимо этого, Lpps играют роль как стимулирующие и ингибирующие лиганды Toll-like рецепторов (TLR), позволяя модулировать иммунный ответ макроорганизма на микобактерии [176, 223]. Среди липопротеинов *M. tuberculosis* выделяют LppX, LpqH, LprG, PstS-1, LpqY, ModA как факторы патогенности.

Белки системы секреции участвуют в процессах адаптации микобактерий к изменениям окружающей среды, они необходимы для экспорта токсинов/сигнальных белков в клетки макроорганизма, некоторые из них играют роль в патогенности *M. tuberculosis*.

Комплекс систем секреции T7SS (от англ. type seven secretion system) или ESX отвечает за транспортировку внеклеточных белков через клеточную стенку микобактерий, системы ESX-1 и ESX-5 участвуют в вирулентности [15]. Система секреции ESX-1 кодирует факторы патогенности ESAT6 и CFP10, необходимые для полной вирулентности *M. tuberculosis* [308]. Эти белки являются антигенами, распознаваемыми Т-клетками при туберкулезной инфекции человека, крупного рогатого скота и лабораторных животных [234, 14]. Белки ESAT6 и CFP10 способствуют транслокации клеток *M. tuberculosis* из фагосомы в цитоплазму клетки организма хозяина [297]. Высокая антигенная специфичность данных белков позволяет использовать ESAT6 и CFP10 для разработки кандидатных рекомбинантных вакцин против туберкулеза [190]. Система секреции ESX-5 содержит большое количество генов, кодирующих уникальные для *M. tuberculosis* семейства белков PE (~100 генов) и PPE (~70 генов), содержащих мотивы Pro-Glu и Pro-Pro-Glu на N-концах, соответственно [70]. Группа генов семейства PE, содержащих GC-богатые последовательности, названа PE_PGRS. Функции большинства белков семейств PE и PPE до сих пор остаются неизвестными. Эффекторный белки, секретируемые системой ESX-5, не требуются для транслокации клеток *M. tuberculosis* в цитоплазму клеток хозяина [15]. Делеция локуса ESX-5 в геноме *M. tuberculosis* штамма H37Rv приводила к существенному снижению вирулентности на мышинных моделях [46]. За экспорт липопротеинов отвечают система секреции II типа

(T2SS) и система экспорта Sec. Белок SecA2 необходим для полной вирулентности микобактерий туберкулеза, он отвечает за экспорт супероксиддисмутазы (SodA) и каталазы-пероксидазы-пероксинитриказы (KatG), ферментов детоксикации кислородных радикалов [165].

Белки-ингибиторы защитных свойств макроорганизма

Во время инфекции МФ поглощают и уничтожают патогенные бактерии, рекрутируют другие клетки иммунной системы и презентуют антигены патогена клеткам адаптивной иммунной системы. Однако клетки *M. tuberculosis* имеют механизмы, позволяющие противодействовать защитным функциям МФ: (1) устойчивость к токсическим веществам, (2) остановка развития фагосомы и (3) ингибирование апоптоза.

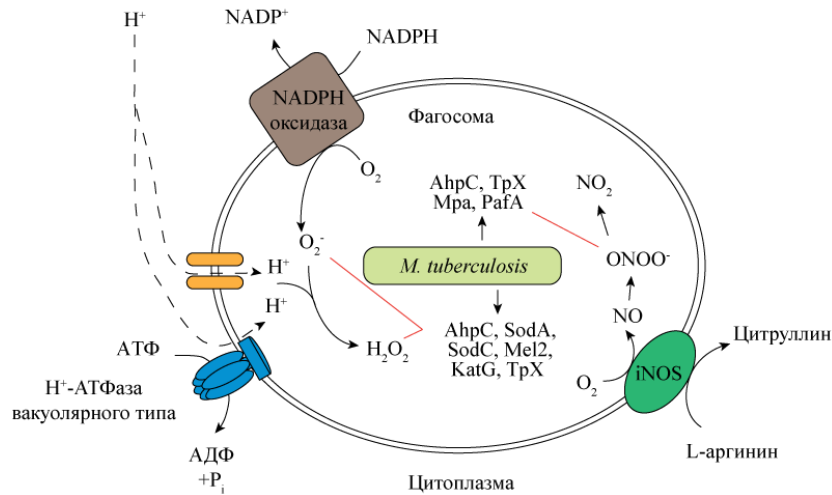
Устойчивость к токсическим веществам позволяет преодолевать окислительный и нитрозативный стрессы внутри фагосом, генерируемые активными формами кислорода (от англ. reactive oxygen species, ROS) и азота (от англ. reactive nitrogen species, RNS), обладающими бактерицидными свойствами [298]. Белок AhpC представляет собой алкил-гидропероксид редуктазу C, фермент, который восстанавливает органические перекиси и пероксинитриты. Сверхэкспрессия гена *ahpC* вызывала устойчивость *M. tuberculosis* к изониазиду *in vitro*, а делеция данного гена - снижение вирулентности микобактерий на модели морских свинок [266, 316]. Гены *sodA* и *sodC* кодируют ферменты Fe- и Cu-супероксиддисмутазы, соответственно, функция которых заключается в детоксикации ROS путем преобразования супероксида (O_2^-) в молекулярный кислород и перекись водорода [105]. Белки внешней мембраны SodA и SodC обеспечивают защиту клеток *M. tuberculosis* от O_2^- , который генерируется клетками макроорганизма. Транскрипция гена *sodC* индуцируется при макрофагальной инфекции [302]. Локус *mel2* (от англ. mycobacterial enhanced infection locus Rv1936-1941) высокоомологичен с локусом *lux* *Vibrio harveyi*, кодирующими монооксигеназу, которая обеспечивает устойчивость биолюминесцентных бактерий к ROS [67, 183]. KatG – каталаза-пероксидаза, расщепляющая H_2O_2 и органические перекиси. KatG превращает пролекарство изониазид в несколько активных молекул, которые ингибируют синтез миколовых кислот *M. tuberculosis*; мутации в гене *katG* приводят к устойчивости к изониазиду [292]. Trx – фермент тиолпероксидаза, который катализирует редукцию гидропероксидов и пероксинитрита [132]. Mpa и PafA необходимы для защиты микобактерий от вредоносного действия RNI и для вирулентности у мышей. Mpa – АТФаза, участвующая

в распознавании субстрата, расщеплении и транслокации в микобактериальную протеасому; PafA – гипотетический белок, который также связан с функциями протеасом [81, 80]. Данные белки разрушают NO-поврежденные белки, которые токсичны для клеток *M. tuberculosis* [53, 160] (рисунок 1.9).

Микобактерии имеют набор белков, позволяющих им выживать внутри фагосом эукариотических клеток и предотвращать слияние фагосом с лизосомами. Ген *ndk* кодирует нуклеозиддифосфаткиназу Ndk, которая фосфорилируется и секретируется из клеток *M. tuberculosis* в окружающую среду, что продемонстрировано в тесте цитотоксичности для МФ [65]. Ndk дефосфорилирует и инактивирует лизосомные белки Rab7-GTP и Rab5-GTP, а также ингибирует рекрутирование в мембрану фагосомы белков Rab5 и Rab7, а также эндосомального антигена 1 - EEA1. Таким образом, белок Ndk *M. tuberculosis* ингибирует созревание фагосом [285]. PtpA – низкомолекулярная тирозинфосфатаза, которая дефосфолирует VPS33B (белок макроорганизма, участвующий в регуляции слияния мембран внутри эндоцитарного пути), а также связывается с H⁺-АТФазой вакуолярного типа, уменьшая закисление среды внутри фагосомы [77, 318, 225]. PE_PGRS30 необходим для полной вирулентности *M. tuberculosis* на моделях мышей и МФ [138] (рисунок 1.10).

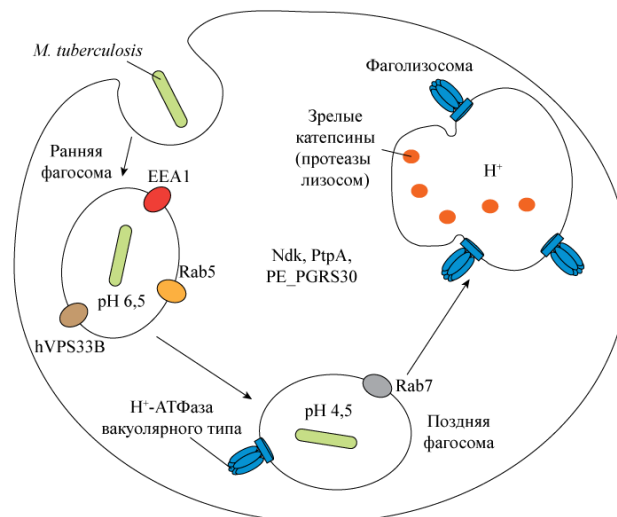
Ингибирование апоптоза, запрограммированной гибели клеток иммунной системы макроорганизма в ответ на проникновение патогенных бактерий, обусловлено наличием у *M. tuberculosis* анти-апоптотических генов: *nuoG*, *secA2/sodA*, *pknE* и *Rv3654c/Rv3655c*. NuoG – одна из 14 субъединиц NADH-дегидрогеназы 1 типа, участвующая в ингибировании внешнего TNF- α -зависимого пути апоптоза и супрессии апоптоза нейтрофилов [188, 43].

SecA2 – препропротеинтрансфераза, которая транслоцирует SodA и некоторые другие белки в окружающую среду. PknE – серин/треонин киназа E связан с продукцией провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-6, ингибирует апоптоз элиминацией RNS [142]. Белки *Rv3654c/Rv3655c* ингибируют внешний путь апоптоза, за счет подавления активации каспазы-8 [79].



AhpC - алкил-гидропероксид редуктаза, TrpX - тиолпероксидаза, Mpa - АТФаза, PafA - гипотетический белок, SodA - Fe-супероксиддисмутаза, SodC - Cu-супероксиддисмутаза, Mel2 - *mycobacterial enhanced infection locus*, KatG - каталаза-пероксидаза

Рисунок 1.9 – Схема противодействия *M. tuberculosis* окислительному и нитрозативному стрессам внутри фагосомы эукариотической клетки [103, с изменениями]



EEA1 - эндосомальный антигена 1, Rab5, Rab7, hVPS33B – вакуолярные белки, Ndk - нуклеозиддифосфаткиназу, PtpA - тирозинфосфатаза, PE_PGRS30 – белок семейства PG-PGRS

Рисунок 1.10 – Схема противодействия *M. tuberculosis* созреванию фагосом и слиянию с лизосомами в эукариотической клетке [103, с изменениями]

Протеинкиназы

Обратимое фосфорилирование белков является одним из основных путей передачи сигналов регуляции обмена веществ в ответ на внешние раздражители как у эукариотических, так и у прокариотических клеток. У бактерий передача сигналов осуществляется двухкомпонентными регуляторными системами, специфическими протеинкиназами и протеинфосфатазами. В геноме *M. tuberculosis* закодировано 11

серинтреонин протеинкиназ, подобных эукариотическим (PknA-L, кроме C), модулирующих процессы адаптации к окружающей среде, дифференциации и клеточного деления. PknA и PknB играют важную роль в изменении клеточной формы, морфологии и делении в ответ на воздействие окружающей среды, регулируют биосинтез пептидогликана и миколовых кислот [124, 153, 291, 301]. PknF участвует в регуляции клеточного роста и формировании перегородок, транспорта глюкозы и биосинтеза миколовых кислот через фосфорилирование β -кетоацил-ацильного носителя протеин синтазы III (FabH) [87]. PknI и PknK играют роль в регуляции роста *M. tuberculosis* внутри МФ и проявлении гипервирулентного фенотипа у иммунодефицитных мышей [173]. PknH фосфорилирует InhA (ключевой фермент биосинтеза жирных кислот), DosR (регулятор транскрипции дормантности при гипоксии и NO-стрессе) [61]. Таким образом, некоторые протеинкиназы обеспечивают замедление роста *M. tuberculosis* внутри хозяйских клеток, поскольку патогену не выгодна быстрая гибель макроорганизма [213]. PknJ и PknL фосфорилируют гликолитические ферменты пируват киназу A (mtPycA) и ДНК-связывающий белок Rv2175c, что адаптирует микобактерии к условиям внутри эукариотической клетки [25, 68]. PknD, PknE и PknG так же необходимы для выживания и персистенции внутри хозяйских клеток: PknD фосфорилирует MmpL7 (транспортер семейства RND, существенный для вирулентности *M. tuberculosis*) и Rv0516c (антагонист анти-сигма фактора SigF) [219, 214]. Показано, что PknD является ключевым фактором необходимым для инфекции центральной нервной системы у мышей BALB/c [33]. PknE требуется для персистенции в клетках МФ человека [142]. PknG участвует в метаболизме глутамина [253].

Протеазы

Протеазы играют важную роль в клеточном гомеостазе, контролируют белки, участвующие в транскрипции, регуляции, метаболизме и вирулентности. В геноме *M. tuberculosis* присутствует около 100 генов, кодирующие протеазы. Сериновые протеазы – семейство ферментов, расщепляющих пептидную связь в белках с серином в активном центре. MucP1 - субтилизин-подобная сериновая протеаза, которая конститутивно экспрессируется и регулирует секреторную систему ESX-1, необходимую для полной вирулентности *M. tuberculosis*, путем разрезания EspB [124, 209]. Семейство олигомерных сериновых протеаз HtrA (от англ. high-temperature requirement A) обнаруживаемое не только у прокариот, но и у человека, играют роль

шаперонов и/или протеаз [155]. У бактерий они участвуют в процессах ответа на стрессы через сигма факторы и двухкомпонентные системы [313]. Rv3671c - мембранно-ассоциированная сериновая протеаза, защищающая *M. tuberculosis* от кислотного и окислительного стрессов, благодаря способности разрушать белки, утратившие структуру в этих условиях, и восстанавливать ионные каналы, протонные помпы и мембранные липиды, поддерживая значение внутреннего pH [42]. АТФ-зависимые протеазы активно экспрессируются в стрессовых условиях, таких как температурный шок или инфекция МФ. Описано 4 протеазных системы (ClpP1/C, ClpP2/C, PtrB и Rv1043c) и три шаперона (Acr2, ClpB и Rv3269), регулируемых общим транскрипционным регулятором ClgR, который важен для репликации *M. tuberculosis* в мышцах [254]. Металлопротеазы подсемейство протеаз, которые используют металлы, преимущественно Zn, для каталитической активности, вовлеченные в реализацию вирулентности и клеточного метаболизма. Zmp1 необходима для полной вирулентности *M. tuberculosis*, предотвращения активации инфламмасом (специализированных белковых комплексов, компонентов врожденной иммунной системы эукариот, активирующих воспалительные каспазы и IL-1 β) [177]. Rip1 - основная детерминанта вирулентности *M. tuberculosis*, регулирующая структуру клеточной оболочки микобактерий и персистенцию *in vivo*, участвует в передаче сигнала через клеточную оболочку за счет протеолиза трех субстратов анти-сигма факторов RskA, RslA и RsmA [172, 272].

Белки-транспортеры металлов

Металлы - часть простетических групп или коферментов многих ферментов, в том числе факторов вирулентности. Во время нахождения клеток *M. tuberculosis* в МФ они подвергаются стрессу, связанному с недостатком железа и магния, а также с избытком цинка и меди. Эволюционно микобактерии выработали стратегии импорта металлов в цитоплазму и экспорта с помощью эффлюксных насосов. MbtB, IrtAB и IdeR – белки-импортеры железа, важного кофактора гема цитохрома и других гемопротеинов, участвующих в цикле Кребса и в синтезе ДНК. MbtB – салицил-АМФ липаза, хелатирующая железо как компонент сидерофоров микобактина и карбоксимикобактина, необходимых для выживания *M. tuberculosis* в эукариотических клетках [84]. IrtA и IrtB – домены АВС-транспортера [83]. IrtA отличается от обычных АВС-транспортеров тем, что он имеет трансмембранный домен, слитый с субстрат-связывающим доменом (SBD)

цитоплазмы, который необходим для аккумуляции железа. IrtB содержит домены пермеазы и АТФазы [99]. IrbAB транспортирует Fe^{3+} -сидерофор комплекс в цитоплазму *M. tuberculosis*, где домен SBD, выполняющий функцию редуктазы белка IrbA, восстанавливает и высвобождает из комплекса железо для его ассимиляции в металлопротеинах [244]. IdeR – железозависимый регуляторный белок, необходимый для жизнедеятельности *M. tuberculosis*, который при избытке железа в среде образует комплекс с Fe^{3+} и связывается с промоторной областью генов *mbtB* и *irtAB*, тем самым подавляя их транскрипцию [241]. Магний - кофактор ферментов, связывающихся с фосфатом, также он необходим для синтеза РНК и ДНК. MgtC – трансмембранная АТФаза Р-типа, участвующая в аккумуляции Mg^{2+} в клетках *M. tuberculosis*. Делеция гена *mgtC* вызывала ослабленную вирулентность на культуре клеток МФ человека и у мышей линии BALB/c. CtpC – АТФаза Р-типа, которая за счет АТФ-гидролитической активности выполняет функцию экспортера Zn^{2+} из цитоплазмы *M. tuberculosis*, снижая токсический эффект избытка Zn^{2+} [45]. Белок CtpV является также АТФазой Р-типа, экспортирующей избыток Cu^{2+} из цитоплазмы микобактерий. Показано, что CtpV необходим для полной вирулентности микобактерий на морских свинках [307].

Регуляторы транскрипции

Адаптация клеток *M. tuberculosis* к стрессам (недостаток кислорода, низкая концентрация питательных веществ, активные формы кислорода и азота, изменение уровня рН, токсичные липидные фрагменты, повреждение клеточной стенки микобактерий и другие) обуславливается изменением уровней транскрипции генов. Для выживания в этих условиях *M. tuberculosis* экспрессирует множество регуляторных факторов: 12 двухкомпонентных систем (от англ. two-component systems, TCSs), 5 из которых считаются факторами патогенности, 13 сигма факторов и других регуляторов транскрипции. Двухкомпонентные системы, в основном, состоят из мембраносвязанной гистидинкиназы, которая воспринимает специфический стимул окружающей среды, и соответствующего регулятора ответа, фосфорилируемого сенсорной киназой (рисунок 1.8). Оперон *phoP-phoR* кодирует белки PhoR (гистидиновую протеинкиназу) и PhoP (регулятор транскрипции), фосфорилируемый PhoR и регулирующий экспрессию более 110 генов [120, 125]. PhoP-PhoR регулирует транскрипцию генов липидного метаболизма: *pks3* (поликетид β-кетоацилсинтазы), *pks5* (поликетидсинтазы), *papA3* (ассоциированного с поликетидсинтазой), *fadD26* (коэнзим А-лигазы), *lipF* (эстеразы/липазы), *fbpA* (антигена

85A), *mmpL10* и *mmpL8* (транспортных белков семейства RND); *espB* и *espR* генов системы секреции ESX-1, необходимой для проявления вирулентности и секреции ESAT6; оперона *aprABC*, обеспечивающего выживание микобактерий в кислых условиях [120, 163, 18]. PhoP-PhoR необходима для проявления полной вирулентности *M. tuberculosis* [243]. SenX3-RegX3 - двухкомпонентная система, чувствительная к фосфатам. RegX3 регулирует более 100 генов, некоторые из которых кодируют гипотетические белки, участвует в энергетическом метаболизме, поддержании синтеза клеточной стенки [216]. RegX3 является активатором гена *phoA*, кодирующего щелочную фосфатазу PhoA, активирующую экспрессию гена *ptsS*, принадлежащего транспортной системе PtsSCAB фосфатов, а также гены *ald*, (аланиндегидрогеназы), *cyd* (субъединицы убухинооксидазы цитохрома D) и *gltA1* (цитратсинтазы) [238]. На участке между генами *senX3* и *regX3* располагаются повторяющиеся повторы (от англ. mycobacterial interspersed repetitive units, MIRU), детекция которых используется для типирования микобактерий [287, 182]. Гены *senX3* и *regX3* необходимы для проявления полной вирулентности *M. tuberculosis* [215]. Двухкомпонентная система DosR/S/T (DevR/S/T) состоит из одного регулятора ответа на гипоксию и оксид азота (DosR) и одной из гистидиновых киназ (DosS или DosT). DosR относится к регуляторам «дормантности» [44]. DosS и DosT фосфорилируют DosR, обладают доменами GAF, рецептором циклического ГМФ и гемом β -типа, чувствительным к CO и NO, которые являются клеточным сигналом гипоксии и маркером бактерицидной активности МФ [63]. DosT деактивируется при связывании с O₂, однако при гипоксии O₂ заменяется на CO или NO, восстанавливая активную форму DosT. O₂ окисляет гем и ингибирует DosS [98]. Двухкомпонентная система MprA/MprB (от англ. mycobacterial persistence regulator) состоит из сенсорной киназы MprB и регулятора ответа MprA, регулирует около 200 генов. Данная система является частью очень сложной регуляторной сети и необходима для проявления полной вирулентности *M. tuberculosis* [322]. Двухкомпонентная система PrrA-PrrB необходима для проявления вирулентности и метаболической адаптации к стрессам окружающей среды. PrrA является одним из членов семейства OmpR и содержит ДНК-связывающий домен, который присутствует в «закрытой» или «открытой» форме для контроля связывания PrrA с промоторными областями ДНК. В присутствии Mg²⁺ или Mn²⁺ домен PrrB может фосфорилировать PrrA для активации, при этом происходит повышение аффинности связывания с регуляторными участками ДНК [217].

Сигма факторы – субъединицы РНК-полимеразы, позволяющие изменять специфичность холофермента за счет распознавания различных промоторных областей. В геноме *M. tuberculosis* идентифицировано 13 сигма факторов: σ A, σ B, σ C, σ D, σ E, σ F, σ G, σ H, σ I, σ J, σ K, σ L и σ M, среди которых σ A – основной сигма фактор, а остальные альтернативные. Десять альтернативных сигма факторов (σ C, σ D, σ E, σ G, σ H, σ I, σ J, σ K, σ L и σ M) относятся к подсемейству ECF, ответственному за ответ на сигналы окружающей среды [245]. Основной сигма фактор σ A (SigA), также известный как RpoV, регулирует гены домашнего хозяйства и гены, кодирующие факторы патогенности [52]. SigB (σ B) регулирует транскрипцию гена, кодирующего фактор патогенности KatG [135]. SigC (σ C) важен для патогенеза и выживания *M. tuberculosis* в гранулемах, влияет на уровень провоспалительных цитокинов, модулирует экспрессию генов ключевых факторов вирулентности *hspX* и *senX3* [149]. SigD (σ D) контролирует экспрессию генов ассоциированных с рибосомой и требуется для проявления полной вирулентности [55]. SigE (σ E) один из основных регуляторов ответа на стрессы, в том числе в ходе инфекции МФ, его экспрессию регулирует двухкомпонентная система MprAB [137]. Большинство генов, которые регулирует SigE, вовлечены в организацию клеточной оболочки и липидного метаболизма *M. tuberculosis*, а также регулирует провоспалительный ответ макроорганизма [31]. При недостатке питательных веществ для микобактерий в МФ человека значительно увеличивается экспрессия генов *sigF* (σ F) и *sigG* (σ G) [162, 273]. SigH (σ H) – ключевой регулятор других сигма факторов и факторов патогенности *M. tuberculosis*, а также хемокинов и маркеров апоптоза во время инфекции в МФ, что продемонстрировано на модели обезьян [92]. Показано, что сигма факторы σ J и σ M регулируют транскрипцию ESAT-6 и альтернативные пути устойчивости *M. tuberculosis* к негативному влиянию H₂O₂ [19, 136]. SigK (σ K) реагирует на изменение окислительно-восстановительного потенциала клеток и индуцирует транскрипцию генов, участвующих в регуляции окислительно-восстановительного гомеостаза [272]. Сигма фактор SigL (σ L) участвует в регуляции липидного метаболизма [78].

Семейства генов транскрипционных регуляторов классифицируют по наличию консервативных доменов и функциям кодируемых ими белков (репрессор и/или активатор). Rv0485. Кодирован транскрипционный регулятор семейства репрессоров NagC/XylR, контролирующего гены, участвующие в патогенезе [229]. Ген Rv1931c кодирует транскрипционный регулятор семейства AraC, который участвует в контроле

вирулентности *M. tuberculosis* [107]. Ген *hspR* (от англ. heat shock protein repressor) кодирует транскрипционный репрессор HspR семейства MerR, который репрессирует транскрипцию шаперонов *dnaK* и *clpB* [141]. WhiB3 связывается с SigA и обеспечивает согласованность транскрипционной регуляции этими двумя белками [281]. MosR (от англ. mycobacterial operons of survival regulator) прямо или косвенно регулирует транскрипцию 163 генов, в том числе во время проникновения в клетки млекопитающих *mce1* (от англ. mammalian cell entry), гипоксии *tgs1* и голодания [259]. VirS контролирует транскрипцию *tumA* оперона, участвующего в контроле размножения *M. tuberculosis* в клетках макроорганизма и персистенции [62]. PhoY2 – транскрипционный регулятор системы транспорта фосфатов, участвующий в формировании устойчивости к рифампицину и пиперазину, а также в персистенции *M. tuberculosis* [258].

Другие белки вирулентности

Экспериментально продемонстрирована важность для проявления вирулентности возбудителя туберкулеза участков генома штамма *M. tuberculosis* H37Rv, отсутствующих в геноме вакцинного штамма *M. bovis* BCG – RD1 и RD2 (от англ. regions of differences). На участке генома RD1 локализованы гены, кодирующие факторы вирулентности ESAT-6 и CFP10, описанные выше. Большая часть участка генома RD2 включает гены, кодирующие антигены *M. tuberculosis* в том числе доминантный антиген MPT64 [197]. Aсg – представитель суперсемейства классических нитроредуктаз, транскрипция гена которого контролируется двухкомпонентной системой DosR-DosS в ответ на условия гипоксии и NO-стресс внутри макроорганизма [224]. PckA – фосфоенолпируваткарбоксикиназа катализирующая обратимое декарбоксилирование и фосфорилирование оксалоацетата в фосфоенолпируват, обеспечивая ответ на изменяющиеся условия внутри МФ [167]. PtpB – тирозинфосфатаза, участвующая в основном механизме сигнальной трансдукции, регулирующей клеточные процессы, важная для проявления вирулентности *M. tuberculosis* [267]. Hsp22.5 – белок теплового шока, ген которого высоко экспрессируется во время инфекции мышей [17].

Покоящееся состояние *M. tuberculosis*

Переход в покоящееся состояние клеток *M. tuberculosis* - эволюционная стратегия патогена, позволяющая замедлять клеточный метаболизм в неблагоприятных условиях окружающей среды, с возможностью возвращения к нормальному метаболизму [146]. Репликация *M. tuberculosis* существенно замедляется в стрессовых условиях вплоть до

полной остановки клеточного деления. Такое состояние бактерий описывается как покоящееся (дормантное) состояние [275]. Микобактерии в покоящемся состоянии связывают с переходом туберкулезной инфекции в латентную форму [290]. Понимание механизмов дормантности критически важно для разработки эффективной терапии туберкулеза. Фенотип дормантности *M. tuberculosis* характеризуется набором существенных признаков: (1) неспособность к репликации; (2) изменение транскриптома; (3) изменение метаболизма; (4) изменение клеточной морфологии; (5) устойчивость к антибактериальным препаратам.

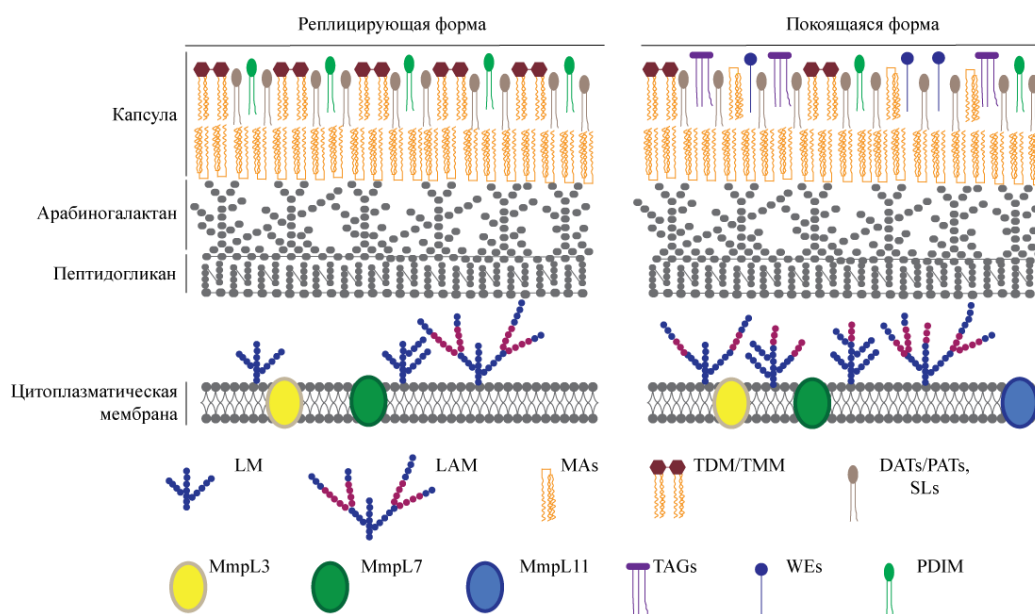
Неспособность к репликации покоящихся форм микобактерий продемонстрировано с помощью функциональных флуоресцентных красителей и ПЦР в экспериментальных условиях на питательных средах, этим клетками было присвоено название «живых, но некультивируемых», (от англ. viable but nonculturable, VBNC) или не растущих, но метаболически активных (от англ. nongrowing but metabolically active, NGMA) [164, 175].

Переход клеток *M. tuberculosis* в покоящееся состояние связан с изменениями в их транскриптом: у несколько сотен генов, кодирующих белки, участвующие в процессах адаптации, репарации, детоксикации, патогенеза и регуляции транскрипции, а также десятков генов малых некодирующих РНК [139, 20]. Регулон DosR (от англ. dormancy survival regulator) известен как основной регулятор, участвующий в формировании и поддержании покоящегося состояния [159].

В процессе формирования покоящегося состояния *M. tuberculosis* происходит замедление основных путей метаболизма, приводящее к торможению клеточного роста и деления [59]. Анализ протеома микобактерий, находящихся в покоящемся состоянии, показал снижение представленности более 1500 белков, кроме того, было показано, что эти клетки синтезируют белки, в том числе ферменты, которые не экспрессируются во время активной репликации клеток *M. tuberculosis* [121, 255]. В клетках *M. tuberculosis*, находящихся в покоящемся состоянии, активируется глиоксилатный шунт, изменяется энергетический обмен (снижается уровень внутриклеточного АТФ и увеличивается соотношение NADH/NAD), изменяются липидный и нитратный метаболизмы [30, 59].

Анализ липидного состава клеточных стенок *M. tuberculosis*, находящихся в покоящемся состоянии, по сравнению с таковым в реплицирующихся клетках, выявил то, что уровни ди- и пентаацил-трегалоз (DAT/PAT), а также сульфоллипидов (SL) не

изменялись; концентрация фтиоцерол димикоцерозата (PDIM), мономиколата трегалозы (TMM), димиколата трегалозы (TDM) снижалась; за счет гидролиза TMM и TDM содержание миколовых кислот (MA) увеличивалось; увеличивалось так же соотношение липоарабиноманнана (LAM) к липоманнану (LM) и, помимо этого, обнаружена аккумуляция триацилглицеринов (TAGs) и восковых эфиров (WEs), необходимых впоследствии для реактивации клеток *M. tuberculosis*. У реплицирующихся форм микобактерий в цитоплазматической мембране содержатся белки транспорта липидов MmpL3 и MmpL7, осуществляющие экспорт TMM и PDIM, а у покоящихся форм помимо этих белков дополнительно обнаружен транспортер MmpL11, осуществляющий экспорт TAGs и WEs (рисунок 1.11) [282].



LM - липоманнан, LAM - липоарабиноманнан, MAs - миколовые кислоты, TDM/TMM – соотношение ди- и мономиколата трегалозы, DATs/PATs, SIs - ди- и пентаацил-трегалозы, сульфолипиды, MmpL3,7,11 – транспортные белки, TAGs - триацилглицерины, WEs - восковые эфиры, PDIM - фтиоцерол димикоцерозат

Рисунок 1.11 – Сравнение строения клеточной стенки реплицирующихся форм и покоящихся форм *M. tuberculosis* [282, с изменениями]

Показано, что покоящиеся формы *M. tuberculosis* при заражении культуры клеток МФ мышей вызывали менее выраженный иммунный ответ, чем реплицирующиеся клетки [97]. Описано изменение размера клеток *M. tuberculosis* с характерного для реплицирующихся клеток ($4,3 \times 0,4$ до $1,0 \times 0,2$ мкм) на существенно меньший размер для покоящихся клеток (0,1 - 0,3 мкм), а также изменение формы клеток с палочковидной на овоидную [262, 300].

У покоящихся форм *M. tuberculosis* описана устойчивость к антитуберкулезным препаратам, которая не связана с наличием мутаций в генах мишеней антибактериальных препаратов, что объясняется неактивностью данных мишеней в покоящихся клетках. Например, пролекарство изониазид активируется в клетках микобактерий каталаза-пероксидазой KatG, активность которой снижена в покоящихся клетках [148].

Устойчивость к антитуберкулезным препаратам

У туберкулёзного микроба описаны несколько уровней резистентности к противотуберкулезным препаратам: устойчивые к рифампицину штаммы или РУ (от англ. rifampicin resistance, RR), множественно лекарственно устойчивые или МЛУ (от англ. multi drug resistance, MDR) и широко лекарственно устойчивые или ШЛУ (от англ. extensive drug resistance, XDR). РУ *M. tuberculosis* устойчивы только к рифампицину, но не устойчивы к остальным противотуберкулезным препаратам, а МЛУ и ШЛУ к более широкому кругу препаратов (см. раздел 1.1.3). Лекарственная устойчивость может быть обусловлена как природными свойствами микроорганизма, так и внешними (приобретаемыми мутациями). Например, в геноме *M. tuberculosis* присутствуют гены бета-лактамаз, которые обеспечивают природную резистентность к бета-лактамам. Длительное лечение туберкулеза часто сопровождается нарушениями режима приема лекарств, из-за чего формируется резистентные клоны *M. tuberculosis* [204].

Описано несколько механизмов, способствующих эволюции лекарственной устойчивости у *M. tuberculosis*: компенсаторная эволюция, эпистаз, клональная интерференция, непроницаемость клеточной стенки, эффлюксные насосы, деградация или модификация молекул лекарства, мимикрия мишени и фенотипическая лекарственная толерантность [21, 242]. Лекарственная устойчивость у бактерии формируется либо в результате мутаций, либо при горизонтальном переносе генов на плазмидах, транспозабельных элементах или бактериофагах. У *M. tuberculosis* горизонтальный перенос генов является дискуссионным вопросом. Экспериментально показано, что антибиотикорезистентность этого патогена формируется за счет мутаций в хромосоме в генах, кодирующих мишени лекарств или ферменты, активирующие пролекарства [303] (таблица 1.1). В последние годы появились публикации, в которых, на основании биоинформатического анализа, высказаны доводы в пользу наличия горизонтального переноса генов у *M. tuberculosis*, в том числе генов, связанных с антибиотикорезистентностью и вирулентностью возбудителя туберкулеза [211, 113, 267].

Природные механизмы лекарственной устойчивости *M. tuberculosis*

Внутренняя (природная) резистентность *M. tuberculosis* связана с непроницаемостью клеточной стенки, эффлюксными насосами, инактивацией молекул противотуберкулезных препаратов, а также изменением и мимикрией мишеней лекарств. *M. tuberculosis* имеет чрезвычайно толстую и гидрофобную клеточную стенку, что препятствует диффузии молекул антибиотиков, таких как рифамицины, макролиды, фторхинолоны и тетрациклины [127]. Антиген Ag85 существенен для целостности клеточной стенки и обеспечения внутренней резистентности *M. tuberculosis*, поэтому инактивация этого антигена специфическими ингибиторами приводит к нарушению клеточной стенки и увеличению проницаемости для препаратов первого ряда и других антибиотиков широкого спектра. Природная устойчивость к бета-лактамам связана с наличием L,D-транспептидаз Ldt_{mt1}-Ldt_{mt5}, двух пенициллин-связывающих белков PonA1 и PonA2, а также поринов OmpA и Rv1698, непроницаемых для антибиотиков [199]. Эффлюксные насосы обеспечивают природную резистентность *M. tuberculosis* к фторхинолонам, тетрациклинам и аминогликозидам. У микобактерий описано 5 суперсемейств эффлюксных насосов: ABC, MFS, SMR, RND и MATE, экспрессия генов которых в условиях селективного давления антибиотиков существенно возрастает [306]. Расщепление и модификация молекул лекарства как механизм антибиотикорезистентности *M. tuberculosis* описан для аминогликозидов, бета-лактамов и макролидов. Ацетилатрансферазы и фосфотрансферазы – два основных класса ферментов микобактерий, модифицирующих аминогликозиды и циклические пептиды, которые способны инактивировать лекарства: неомицин, рибостамицин, канамицин, гентамицин, капреомицин и тобрамицин.

Таблица 1.1 - Противотуберкулезные препараты и их механизмы действия [270, с изменениями]

Класс препарата	Препарат	Механизм действия препарата	Мишень (ген)
Производные рифамицина	Рифампицин (RIF), рифабутин (RFB), рифапентин (RFP)	Блокировка синтеза белков путем ингибирования транскрипции	β -субъединица РНК полимеразы (<i>rpoB</i>), α -субъединица РНК полимеразы (<i>rpoA</i>), β' -субъединица РНК полимеразы (<i>rpoC</i>)
Гидразид никотиновой кислоты	Изониазид (INH)	Ингибирование синтеза миколовых кислот	каталаза-пероксидаза (<i>katG</i>), 2-транс-эноил-АСР (КоА) редуктаза (<i>inhA</i>), β -кетоацил АСР синтаза (<i>kasA</i>), NADH-дегидрогеназа II (<i>ndh</i>)
Производные никотинамида	Пиразинамид (PZA)	Пролекарство активируется PncA с образованием пиразиновой кислоты, которая ингибирует синтез жирных кислот и энергетический метаболизм	алкил-гидропероксидаза (<i>ahpC</i>), 3-оксоацил-АСР редуктаза (<i>fabG</i>), белок, индуцируемый изониазидом (<i>iniA</i>), ацил-КоА дегидрогеназа (<i>fadE24</i>), пиразинамидаза/никотинамидаза (<i>pncA</i>), 30S рибосомный белок S1 (<i>rpsA</i>), аспартат декарбоксилаза (<i>panD</i>), АТФ-связывающий домен АТФ-зависимая протеазы (<i>clpC1</i>), полирибонуклеотиднуклеотидилтрансфераза (<i>gpsL</i>)
Этилендиимино ди-1-бутанол	Этамбутол (EMB)	Влияние на синтез липидов и клеточной стенки	мембраносвязанные арабинозилтрансферазы (<i>embC-embA-embB</i>), регулятор транскрипции (<i>embR</i>), dTДФ-4-дегидрохамноза редуктаза (<i>rmlD</i>)
Фторхинолоны	Левифлоксацин (LVX), ципрофлоксацин (CIP), офлоксацин (OFX), моксифлоксацин (MXF), гatifлоксацин (GAT)	Нарушение процесса ДНК репликации	α -субъединица ДНК гиразы (<i>gyrA</i>)
Аминогликозиды	Стрептомицин (STR)	Ингибирование синтеза белков	рибосомальный белок (<i>rpsL</i>), 16S рРНК (<i>rrs</i>), 16S рРНК метилтрансфераза (<i>gidB</i>)
	Канамицин (KAN), амикацин (AMK)		16S рРНК (<i>rrs</i>), Регулятор транскрипции (<i>whiB7</i>)

Циклические пептиды	Капреомицин (CAP), виомицин (VIO)	Ингибирование синтеза белков	16S рРНК (<i>rrs</i>), метилтрансфераза 16S/23S рРНК (<i>tlyA</i>) аминогликозид ацетилтрансфераза (<i>eis</i>) регулятор транскрипции (<i>whiB7</i>)
Производные изоникотиновой кислоты/тиоамидные препараты	Этионамид (ЕТО), протионамид (РТО)	Ингибирование синтеза миколовых кислот	флавинодержащая монооксигеназа (<i>ethA</i>), 2-транс-эноил-АСР (КоА) редуктаза (<i>inhA</i>), NADH-дегидрогеназа II (<i>ndh</i>), гликозилтрансфераза (<i>mshA</i>), белок-репрессор транскрипции (<i>ethR</i>), β-кетоацил АСР синтаза (<i>kasA</i>)
D-циклосерин	D-циклосерин (DCS)	Ингибирование синтеза пептидогликана	аланин рацемаза (<i>alr</i>), D-аланин-D-аланин лигаза (<i>ddl</i>), транспортер D-серина/D-аланина/глицина (<i>сусA</i>), аланиндегидрогеназа (<i>ald</i>)
Производные циклосерина	Теризидон (TRD)	Ингибирование синтеза пептидогликана	аланин рацемаза (<i>alr</i>), D-аланин-D-аланин лигаза (<i>ddl</i>)
Производные иминоферазина	Клофазимин (CLO)	Нарушение окислительно- восстановительного потенциала мембраны	Репрессор транскрипции эффлюксного насоса MmpL5 (<i>mmpR</i>), Цитоплазматическая аминопептидаза (<i>pepQ</i>), Пермиаза Rv1979c
Производные оксазолидинона	Линезолид (LZD)	Ингибирование синтеза белков	23S рРНК (<i>rri</i>), 50S рибосомный белок L3 (<i>rplC</i>)
Диарилхинолины	Бедаквилин (BDQ)	Ингибирование протонных помп АТФ-синтазы	Субъединица С АТФ синтазы (<i>atpE</i>), Репрессор транскрипции эффлюксного насоса MmpL5 (<i>mmpR</i>)
Нитроимидазолы	Деламанид (DMD)	Ингибирование синтеза белков и миколовых кислот	F ₄₂₀ -зависимая глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (<i>fgd1</i>), двухэлектронные кофакторы переноса F ₄₂₀ (<i>fbiA/B/C</i>), дезафлавинозависимая нитроредуктаза (<i>ddn</i>)

Интересно что один из белков, участвующих в обеспечении резистентности к аминогликозидам и циклическим пептидам, Eis (от англ. enhancing intracellular survival protein), связан также со способностью *M. tuberculosis* выживать внутри клеток организма хозяина и является примером ко-эволюции вирулентности и антибиотикорезистентности [130, 127]. Изменение мишени действия антибиотиков (50S субъединицы рибосомы) описано при формировании резистентности к линкозамидам, макролидам и стрептомицину. Модификация 23S рРНК, осуществляемая метилазой, кодируемой геном *erm*, обеспечивает к макролидам. Ген *mfpA* кодирует пентапептидный повторяющийся белок, связывающийся с ДНК-гиразой и обеспечивающий устойчивость к фторхинолонам. Ген *tlyA* кодирует рРНК метилтрансферазу, которая метилирует рибосому; при утрате этой функции формируется устойчивость к капреомицину и виомицину. Аналогично, инактивация гена *gidB*, кодирующего метилтрансферазу 16S рРНК, приводит к устойчивости к стрептомицину. Белок RbpA, связывающийся с РНК-полимеразой, предотвращает связывание рифампицина с РНК-полимеразой и обеспечивает устойчивость *M. tuberculosis* к этому антибиотику [196]. Молекулярная мимикрия мишеней антибиотиков – уникальная стратегия формирования резистентности МЛУ штаммов *M. tuberculosis* к фторхинолонам. Белок MfpA (от англ. Mycobacterium fluoroquinolone resistance protein A) формирует структуры, аналогичные В-форме ДНК по конформации, размеру и электростатическим параметрам, предотвращая связывание фторхинолонов с ДНК-гиразой [101].

Приобретенные механизмы лекарственной устойчивости *M. tuberculosis*

Приобретенная устойчивость к противотуберкулезным препаратам у *M. tuberculosis* развивается в ходе длительного лечения туберкулеза и несоблюдения режимов приема лекарств. Основным фактором, определяющим накопление мутаций, связанных с лекарственной устойчивостью, является концентрация препарата [204]. При концентрации препарата ниже оптимальной для терапии в клетках *M. tuberculosis* появляются мутации, что часто приводит к снижению скорости роста, выживаемости и вирулентности штамма. Негативное влияние мутаций может быть нивелировано за счет компенсаторной эволюции генов, связанных с фитнесом. В качестве примера компенсаторной эволюции, связанной с резистентностью к изониазиду, может быть приведена мутация в гене *ahpC*, которая приводит к увеличению синтеза фермента алкил-гидропероксид-редуктазы AhpC, компенсируя затраты на фитнес, которые вносит

мутация Ser315Thr в гене *katG*. Аналогично, компенсаторная эволюция также описана в случае мутации S531L гена *rpoB*, кодирующего β -субъединицу РНК-полимеразы, в генах *rpoA* и *rpoC* [89].

Эпистаз – взаимодействие неаллельных генов – также описан как компенсаторный механизм для восстановления фитнеса мутантных вариантов *M. tuberculosis*. Позитивный эпистаз наблюдается, когда взаимодействие нескольких генов приводит к «полезному» фенотипу, а негативный эпистаз – к «вредоносному» фенотипу. Примером «позитивного» эпистаза является комбинация мутаций в генах *rpoB* и *gyrA*, обеспечивающая устойчивость к рифампицину и офлоксацину [21].

Клональная интерференция – взаимодействие мутантных клонов в популяции клеток внутри организма хозяина, которая приводит к доминированию клонов с «успешными» мутациями и к элиминации клонов с менее эффективными мутациями. Интересным примером является исследование, в котором наблюдали появление и исчезновение мутаций в штаммах *M. tuberculosis*, выделяемых от пациентов в ходе длительной антитуберкулезной терапии [285]. Показано, что клональная интерференция может приводить к формированию МЛУ клинических штаммов [95].

Регуляторные некодирующие РНК *M. tuberculosis*

Некодирующие РНК (нкРНК) представляют собой транскрипты или часть транскриптов, не кодирующих белков или пептидов и осуществляющих структурные (рибосомальные РНК, рРНК), транспортные (транспортные РНК, тРНК и транспортно-матричные РНК, тмРНК) и регуляторные (рибопереключателы - *riboswitches*, малые некодирующие РНК, мнРНК, и CRISPR-РНК) функции в бактериальной клетке.

Рибопереключателы

Рибопереключателы регулируют транскрипцию или трансляцию в бактериальных клетках в ответ на изменение окружающей среды или присутствие специфического лиганда посредством распознавания специфических метаболитов или ионов без участия вспомогательных белков или других молекул РНК. Рибопереключателы обычно представляют собой участок 5'-нетранслируемой области (НТО) матричной РНК (мРНК), которую он регулирует [180].

У возбудителя туберкулеза описаны несколько рибопереключателов. V_{12} -зависимый рибопереключател, расположенный на 5'-НТО мРНК гена *metE*, кодирующего V_{12} -зависимую метионин синтетазу, катализирующую превращение

гомоцистеина в метионин. В присутствии витамина В₁₂ экспрессия белка MetE подавляется этим рибопереключателем [200]. Рибопереключателем YdaO находится на 5'-НТО мРНК гена *rpfa* (от англ. resuscitation promoting factor A) и регулирует гены, ассоциированные с метаболизмом клеточной стенки *M. tuberculosis* и выживанием в условиях осмотического стресса [201]. Рибопереключателем SAM-IV расположен на 5'-НТО мРНК гена *metC*, кодирующего О-ацетилгомосерин сульфгидрилазу, катализирующую превращение О-ацетилгомосерина в L-метионин. В присутствии S-аденозилметионина, который образуется при взаимодействии АТФ с метионином, рибопереключателем SAM-IV подавляет экспрессию гена *metC* [312].

Малые некодирующие РНК *M. tuberculosis*

Молекулы мнРНК состоят из 50-400 нуклеотидов, участвуют в процессах адаптации бактериальных клеток к стрессам, вызванным изменениями окружающей среды, путем регуляции уровней экспрессии генов или стабилизации мРНК-мишеней, а также в ходе межклеточной коммуникации («чувство кворума», от англ. quorum sensing). В зависимости от расположения мнРНК относительно мРНК-мишени выделяют два класса антисмысловых (от англ. antisense) мнРНК: (1) *cis*-кодируемые мнРНК, синтезируемые с цепи ДНК, комплементарной ДНК мРНК-мишени, имеют высокую степень комплементарности к мРНК-мишени; (2) *trans*-кодируемые мнРНК, гены которых расположены в межгенных регионах ДНК, имеют частичную комплементарность к мРНК-мишени, стабилизация их связывания с мРНК-мишенью в большинстве случаев обеспечивается шаперон-подобными белками Hfq или ProQ [28, 305].

Анализ транскриптома *M. tuberculosis* выявил 119 мнРНК, функции которых в клетке установлены только для некоторых из них [22]. Например, ASdes и ASpks - *cis*-кодируемые мнРНК *M. tuberculosis*, комплементарные мРНК белков DesA1 и Pks12, соответственно, которые участвуют в регуляции метаболизма липидов: DesA1 - десатураза жирных кислот необходима для роста *M. tuberculosis* внутри МФ; Pks12 - поликетид синтаза 12 участвует в синтезе маннозил-β1-фосфомикокетида, мощного иммуногенного фосфолипидного компонента клеточной стенки микобактерий, который распознается как антиген Т-клетками млекопитающих [178, 254]. *Cis*-кодируемая мнРНК ncRv12659 синтезируется с комплементарной цепи гена Rv2660c, имеет высокий уровень представленности в клетках *M. tuberculosis*, подверженных различным стрессам *in vitro* и

in vivo [130]. Одна из наиболее изученных мнРНК возбудителя туберкулеза - Mcr11 (MTS0997), ген которой располагается между генами Rv1264 и Rv1265, кодирующими аденилатциклазу и АТФ-связывающий транскрипционный фактор AbmR, соответственно. Данная мнРНК значительно экспрессируется клетками *M. tuberculosis* в легких мышей с хроническим туберкулезом и в покоящихся клетках *M. tuberculosis*. Mcr11 регулирует экспрессию генов *fadA3*, *lipB* и Rv3282, участвующих в основных путях клеточного метаболизма и в формировании покоящегося состояния *M. tuberculosis* [139, 114]. Показано, что сверхэкспрессия *trans*-кодируемых мнРНК B11 и G2 приводила к остановке клеточного деления, мнРНК F6 - к существенному замедлению роста *M. tuberculosis*, а MTS2823 - к подавлению экспрессии генов, связанных с экспоненциальной фазой роста [23]. Показано, что мнРНК Mcr11(MTS0997) и MTS1338 участвовали в обеспечении проявления патогенности *M. tuberculosis* [257, 54]. Для мнРНК Mcr7 установлена роль в регуляции экспрессии PhoP, белка двухкомпонентной системы PhoPR, играющей роль в проявлении полной вирулентности *M. tuberculosis* [274]. Экспериментально было показано, что мнРНК MrsI спаривалась с 5'-НТО мРНК гена бактериоферритина *bfrA*, что приводило к увеличению его экспрессии в условиях дефицита железа [112, 239].

CRISPR-РНК *M. tuberculosis*

CRISPR-Cas системы (от англ. clustered regularly interspaced short palindromic repeats, короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами, ассоциированные с генами белков Cas), обеспечивающие адаптивный иммунитет бактерий против фагов с помощью кодируемых спейсерами РНК, комплементарных чужеродным нуклеиновым кислотам, обнаружены у 90 % архей и 40 % бактерий. *M. tuberculosis* содержат CRISPR-Cas системы III-A типа [156, 157]. При транскрипции локуса CRISPR образуется пре-crРНК, которая разрезается нуклеазой Cas6 на зрелые crРНК, несущие 8-ми нуклеотидные последовательности на 5'-концах, называемые crРНК-tag, которые необходимы для распознавания чужеродных нуклеиновых кислот [152]. Зрелая crРНК взаимодействует с Csm эффекторным комплексом с образованием рибонуклеопротеинового комплекса, который способен расщеплять чужеродные нуклеиновые кислоты [228] Показано, что основным модулем CRISPR-Cas системы III-A типа является нуклеаза Cas1. Транскрипция гена *cas1* у *M. tuberculosis* изменяется в ответ на присутствие антибиотиков и других стрессов окружающей среды, что предполагает

роль Cas1 в механизмах лекарственной резистентности [311].

Филогенетические линии *M. tuberculosis*

ТБ у человека и животных вызывают бактерии *M. tuberculosis* комплекса (от англ. *M. tuberculosis* complex, МТВС), включающего в себя *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canettii* и др. МТВС подразделяют на 9 филогенетических линий, которые различаются по своему географическому распространению, будучи эндемичными в разных местах по всему миру, что приводит к гипотезе о том, что типы штаммов специально адаптированы к разным популяциям человека [51]. Известные к настоящему времени штаммы *M. tuberculosis* группируют по разным географическим регионам мира и подразделяются на 5 филогенетических линий: линии L1-L4 и L7 (линии L5, L6 и L9 относятся к виду *M. africanum*, а L8 относится к *M. canettii*, которые являются возбудителями легочного туберкулеза в Западной и Восточной Африке). Филогенетическая линия L1 *M. tuberculosis* – Индо-океаническая (от англ. Indo-Oceanic) чаще всего встречается на побережье Индийского океана; линия L3 – в Восточной Африке и в Центральной и Южной Азии (CAS/Dehli); L7 – в Эфиопии. В отличие от L1, L3 и L7 линий, филогенетические линии L2 – Beijing/Восточно-Азиатская (от англ. Beijing/East Asia lineage) и L4 – Евро-Американская (от англ. Euro-American lineage) широко распространены по всему миру [206]. Штаммы линий L2, L3 и L4 относят к группе современных штаммов *M. tuberculosis* (от англ. modern strains), на основании того, что все они несут геномную делецию TbD1 размером 2153 п.о. В ряде публикаций сделано предположение, что штаммы *M. tuberculosis* разных генетических линий могут отличаться по характеру вызываемых ими инфекций [46]. В Евро-Азиатском регионе массовое распространение МЛУ/ШЛУ туберкулеза ассоциировано с генетической линией L2 Beijing *M. tuberculosis* [57].

Генетическая линия Beijing *M. tuberculosis*

Впервые штаммы *M. tuberculosis* семейства Beijing были описаны в 1992-1994 гг. в Пекине (Китай), а позже - в США, Восточной Азии, Российской Федерации и странах бывшего СССР. В настоящее время штаммы данной генетической линии составляют ~13 % от мировой популяции *M. tuberculosis* [218]. Штаммы генотипа Beijing характеризуются наличием важных патогенных свойств: повышенной вирулентностью для животных, в том числе вакцинированных БЦЖ, способностью размножаться в человеческих МФ, высокой трансмиссивностью, способностью адаптироваться к

изменению окружающей среды, а также ассоциацией с лекарственной устойчивостью [169, 12, 1, 90].

Существует несколько классификаций штаммов генотипа Beijing, в частности – подразделение их на древние (от англ. ancient) и современные (от англ. modern) группы [192]. Методами сполиготипирования и анализа тандемных повторов (от англ. variable number of tandem repeats, VNTR) были выявлены 6 основных клональных комплексов (СС1-СС6) и одна базальная подлиния BL7. Клональные комплексы СС1-СС5 включают в себя типичные/современные штаммы линии Beijing, а СС6 и BL7 – атипичные/древние варианты. Анализ представленности СС в разных регионах мира показывает, что регионы Восточной Азии и Дальнего Востока являются центром распространения штаммов Beijing, в котором наблюдается наибольшее разнообразие СС. В Тихоокеанском регионе, Микронезии и Полинезии наиболее распространен СС5; в Центральной Азии и в Черноморском регионе – СС1; в Российской Федерации и Восточной Европе – СС2; в Южной Америке – СС3; в Юго-Восточной Африке – СС4; в Восточной Азии, Северной Америке и Мексике - СС6 и BL7 (рисунок 1.12) [187].

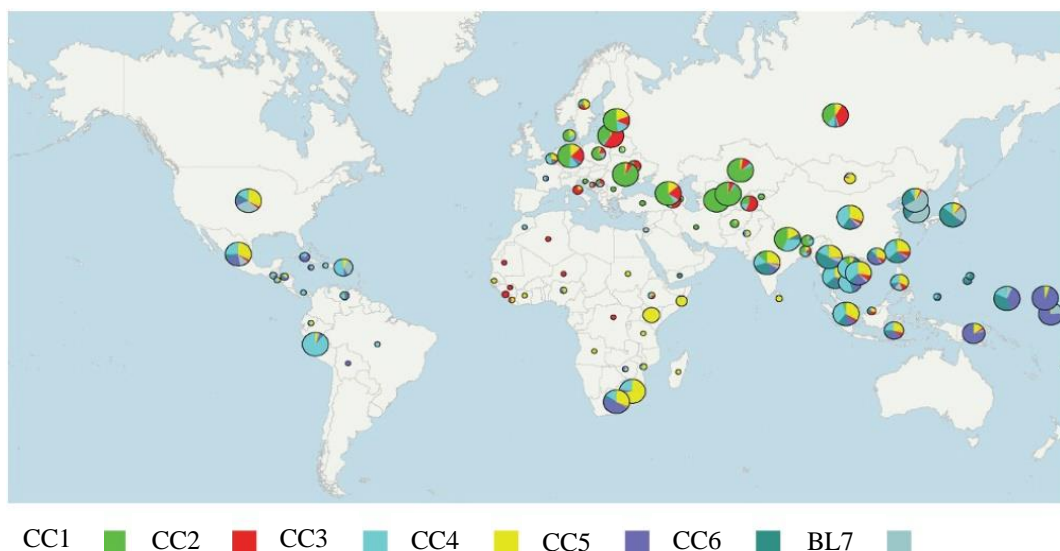


Рисунок 1.12 – Географическое распространение клональных комплексов генетической линии Beijing. Каждый круг соответствует стране, размер круга пропорционален количеству штаммов [187, с изменениями]

Отмечено, что разные СС Beijing *M. tuberculosis* отличаются соотношением штаммов с разными уровнями чувствительности к противотуберкулезным препаратам и наличием специфических механизмов адаптации к селективному давлению лекарств. Среди современных СС наибольшей долей МЛУ штаммов характеризуются СС2 (75,0 %)

и CC1 (30,4 %) (рисунок 1.13) [187].

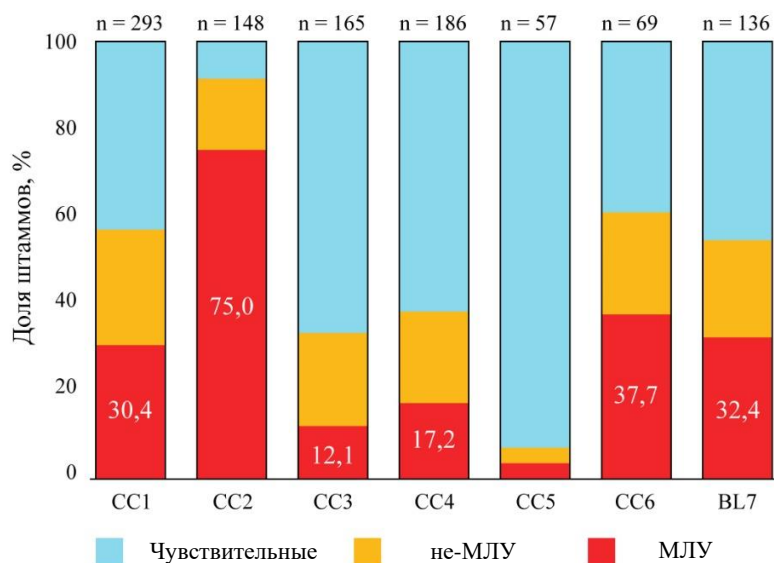


Рисунок 1.13 – Доля МЛУ штаммов *M. tuberculosis* среди клональных комплексов генетической линии Beijing [187, с изменениями]

Российскими исследователями проведен сравнительный обобщающий анализ разных схем генотипирования линии *M. tuberculosis* Beijing, таких как: анализ полиморфизма рестрикционных фрагментов IS6110 (IS6110-RFLP), определение крупных делеций генома – области различий (RDs), анализ однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs), MIRU-VNTR и полногеномное секвенирование (WGS). Была предложена классификация подразделяющая группу Beijing на две клады: древнюю Beijing кладу и современную Beijing кладу, которые включают в себя три (Asia Ancestral 1, Asia Ancestral 2 и Asia Ancestral 3) и семь (Asian African 1, Asian African 2, Asian African 2/RD142, Asian African 3, Pacific RD150, Europe/Russia B0/W148 outbreak и Central Asia) групп, соответственно [260].

Особенностью структуры популяции возбудителя туберкулеза в РФ является то, что 40-50 % случаев туберкулеза ассоциированы со штаммами семейства Beijing [194]. Одной из таких сублиний является сублиния Beijing B0/W148 (Europe/Russia B0/W148 outbreak), которая составляет 25 % от всех выделяемых изолятов линии Beijing (L2) [193]. Кроме того, широко распространены на территории РФ сублинии *M. tuberculosis* Beijing CladeA и CAO (от англ. Central Asia outbreak) [57].

Известно, что представители названных сублиний *M. tuberculosis* Beijing, циркулирующих в РФ, зачастую характеризуются устойчивости к противотуберкулезным препаратам. Штаммы этих клад характеризуются устойчивостью как минимум к

изониазиду и стрептомицину, что обусловлено мутациями *katG* (Ser315Thr) и *rpsL* (Lys43Arg). Оценка скорости формирования SNPs указывает на то, что эпидемическое распространение этих клонов в Евразии происходило совсем недавно, 20-30 лет назад [187].

Опубликованы данные о том, что современные штаммы Beijing являются более вирулентными, по сравнению с древними штаммами [237], что ассоциировано с генами *mce* и *varBC*, продукты которых не только повышают вирулентность, но и модулируют иммунный ответ организма хозяина. Особый интерес у исследователей вызвала мутация со сдвигом рамки считывания в опероне *kdpDE*, кодирующем систему передачи сигналов в штаммах клады B0/W148, которая приводила к повышению вирулентности на мышинных моделях [215]. Для штаммов клады B0/W148 также характерно наличие полиморфизмов по генам *rpoC*, *embA*, *inhA*, *eis* и *folC*, что ассоциировано с их фенотипом МЛУ. Дополнительно идентифицирован набор новых потенциальных генетических детерминант антибиотикорезистентности или компенсаторных механизмов фитнеса - *tmpL11* и Rv2670c.

Другая распространенная среди штаммов семейства Beijing генетическая группа CAO, появление которой датируется 1974 г, также, как и B0/W148, ассоциирована с фенотипом МЛУ и повышенной трансмиссивностью. В ходе эволюционного процесса с течением времени в генетической сублинии CAO накапливались мутации, обеспечивающие устойчивость к противотуберкулезным лекарствам: в 1976 г. к стрептомицину (*rpsL* K43R), в 1977 г. к изониазиду (*katG* S315T), в 1984 г. к этамбутолу (*embB* M306V), этионамиду (*ethA* T314I), а в 1986-1990 гг. сформировался МЛУ фенотип за счет приобретения устойчивости к рифампицину (*rpoB* S450L, *rpoC* N698S). Устойчивость к канамицину и пиперазину сформировалась в 1991 и 1992 гг., соответственно (*eis* g12a и *pncA* Q10P и I133T). К 2006 г. в генетической линии CAO 52 % изолятов имели фенотип пре-ШЛУ (МЛУ плюс устойчивость к канамицину). Описано 37 специфических SNPs, часть из которых ассоциированы с вирулентностью и антибиотикорезистентностью (*mazF7*, *pks12*, *umaA*, *pepA*, *cup138*, *fadD2*, *fadE9*, *eno*, *kdpA*, *lpqW*, *lprA*, *metK*, *pks8* и др.) [186]. Высказано предположение, что экспансия современных штаммов Beijing связана с формированием большого числа мутаций в геномах *M. tuberculosis* в результате сильного селективного давления при использовании противотуберкулезных лекарств [187].

1.3 Моделирование туберкулезной инфекции и покоящегося состояния *M. tuberculosis*

Клинические исследования туберкулезной инфекции у человека и испытание новых диагностических, профилактических и лекарственных противотуберкулезных средств – высокочрезвычайно затратные комплексные мероприятия. Моделирование инфекционного туберкулезного процесса на биологических моделях *in vivo* и *in vitro* позволяет решить многие задачи, связанные с патогенезом инфекции, механизмами взаимодействия макро- и микроорганизмов, воздействием окружающей среды и лекарственных препаратов на клетки микобактерий.

Моделирование туберкулезной инфекции на животных моделях

Разработаны многочисленные модели туберкулеза на животных разных таксономических групп в разной степени удаленных от *Homo sapiens*.

Рыбки Данио (Zebrafish, *Danio rerio*) используются в качестве эффективной платформы для скрининга молекул-кандидатов антитуберкулезных лекарств. Изначально интерес к этим рыбкам как модели туберкулеза был вызван тем, что они являются естественным хозяином микобактерий *M. marinum*, которые эволюционно близки к *M. tuberculosis*, но не являются патогеном для человека. Эта модель позволяет изучать генетику туберкулезной инфекции, внося мутации как в микобактерии, так и в организм рыб [296]. В зависимости от дозы инфицирования на данной модели можно получить активный инфекционный процесс или латентную форму инфекции [73].

Лабораторные мыши (*Mus musculus*) широко используются для моделирования туберкулезной инфекции, при этом применяются разные пути введения патогена: аэрозольный, внутривенный и внутрибрюшинный. Основными преимуществами мышинных моделей являются: низкая стоимость, простота в обращении, небольшая занимаемая площадь, низкие требования к материалам, наличие хорошо изученных иммунологических реагентов и возможность использования инбредных, аутбредных и трансгенных линий. Недостатком мышинных моделей является различие метаболизма мышей и человека и различия в восприимчивости к токсичным соединениям. В качестве параметров оценки тяжести инфекционного процесса используют показатели выживаемости животных, внешнего вида, веса тела, обсемененности микобактериями паренхиматозных органов, изучают гистопатологические изменения в тканях животного

и иммунологические параметры. Данные модели используют для оценки эффективности лекарственных и профилактических противотуберкулезных препаратов. Инбредные линии CBA, DBA/s, C3H, 129/SvJ высокочувствительны к инфекции *M. tuberculosis*, в то время как линии BALB/c и C57BL/6 – наиболее устойчивы. Для преодоления недостатков мышиных моделей, связанных с отсутствием полной идентичности туберкулезной инфекции с таковой у человека были разработаны несколько линий мышей: (1) C3HeB/FeJ - несет рецессивную аллель гена *sst1*, повышающую чувствительность к туберкулезу; (2) CC (Collaborative Cross) – панель рекомбинантных инбредных мышей, полученных из 8 генетически-разнородных групп мышей производителей ; (3) гуманизированные мышиные модели - с трансгенной экспрессией человеческих генов, с периферическими лимфоцитами крови человека или с трансплантацией стволовых клеток человека [158, 71, 26].

Мышиные модели латентной формы туберкулезной инфекции довольно многочисленны. Исторически первой была разработана модель Корнеллского университета, Нью-Йорк, США. Она основана на использовании белых мышей линии Swiss Webster, которых заражали внутривенно клетками *M. tuberculosis* H37Rv в дозе $0,5-2,0 \times 10^6$ КОЕ, а полученную туберкулезную инфекцию лечили в течение 12 недель изониазидом и пипразинамидом, после чего из органов мышей микобактерии высеять не удалось. По завершении антибиотикотерапии в течение 2-3 мес мышам вводили кортизон, в результате из легких и селезенки 50 % мышей удалось высеять клетки *M. tuberculosis*, на основании чего был сделан вывод о формировании у мышей ЛТБИ и последующей реактивации туберкулезной инфекции [181].

Сотрудниками университета Осло, Норвегия, была опубликована модель медленно прогрессирующей первичной ТБИ на гибридных мышках линии B6D2F1. Возбудитель туберкулеза *M. tuberculosis* H37Rv вводили в дозе $1,5 \times 10^6$ КОЕ внутрибрюшинно, лекарственной терапии не осуществляли. Реактивацию туберкулезного процесса осуществляли с помощью кортикостероном. [222].

В лаборатории Университета Джонса Хопкинса, Балтимор, США, была создана модель туберкулезной инфекции у иммунокомпетентных мышей безволосой линии (нуды) SKH1 при введении им подкожного имплантата, содержащего клетки штамма *M. tuberculosis* H37Rv-lux, экспрессирующие ген люциферазы. Вокруг имплантата развивались гранулематозные поражения тканей, содержащие клетки *M. tuberculosis*,

быстро входящие в измененное физиологическое состояние, характеризующееся снижением метаболической активности микобактерий и устойчивостью к изониазиду [148].

При сотрудничестве ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, и фармацевтической компании Sequella, Inc., США, разработана модель ЛТБИ при помощи внутривенного введения клеток *M. tuberculosis* H37Rv, мышам трех линий: высокочувствительной к туберкулезу линии I/StSnEgYCit (I/St), генетически устойчивой к туберкулезу линии C57BL6/JCit (B6) и высокоустойчивой к туберкулезу гибридной линии (I/St×B6)F1 [227].

В институте Форсайт, Бостон, и Университете Колорадо, США моделировали ЛТБИ, заражая мышей линии BALB/c внутривенно в дозе 2×10^6 КОЕ стрептомицин-ауксотрофным штаммом *M. tuberculosis* 18b с последующим ежедневным подкожным введением стрептомицина в течение 4 недель. Иммуногистохимические исследования выявили наличие иммунного ответа во время латентной инфекции у животных [151].

Во ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, при сотрудничестве с Институтом биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, ЛТБИ у мышей линии C57BL моделировали с помощью внутрибрюшинного заражения клетками штамма *M. tuberculosis* H37Rv в дозе $\sim 10^4$ КОЕ/мышь. Реактивацию ЛТБИ осуществляли с помощью аминогуанидина [40].

Коллективом сотрудников ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, разработана модель ЛТБИ на мышах линии I/StSnEgYCit (I/St), которые были инфицированы аэрозольно клетками *M. tuberculosis* H37Rv в дозе ~ 100 КОЕ/мышь, через 1 мес после заражения мышей подвергали трехмесячной терапии рифампицином и изониазидом. Через 13 мес после начала эксперимента в легких мышей наблюдалась остаточная патология, при этом микобактерии не высевались на питательные среды, но их присутствие обнаруживалось с помощью методов ПЦР и микроскопии [226].

Морские свинки (*Cavia porcellus*) – животные, чрезвычайно чувствительные к заражению туберкулезом, что делает их привлекательными для создания моделей ТБИ, нацеленных на тестирование противотуберкулезных лекарств и вакцин [58]. Для инфицирования животных используют разные пути заражения: аэрозольный, интраназальный, трахеальный, внутривенный и внутрибрюшинный. Впервые на модели морских свинок была показана противотуберкулезная активность стрептомицина [100]. Модели на морских свинках имеют много преимуществ, по сравнению с мышинными

моделями ТБИ: высокая чувствительность к туберкулезу, возможность изучения слабовирулентных штаммов *M. tuberculosis* и развитие кавернозного туберкулеза.

На модели морских свинок сложно получить ЛТБИ, потому что эти животные высокочувствительны к низкодозовому заражению *M. tuberculosis*. Для моделирования ЛТБИ на морских свинках используют заражение мутантными штаммами *M. tuberculosis* со сниженной вирулентностью. В совместной публикации сотрудников Института Форсайт и Университета Колорадо, США, описана модель ЛТБИ на морских свинках, при внутривенном заражении животных клетками стрептомицин-ауксотрофного штамма *M. tuberculosis* 18b в дозе 10^7 КОЕ, с последующим ежедневным подкожным введением стрептомицина в течение трех недель. В течение 6 мес после заражения и лечения стрептомицином у животных не наблюдали клинических симптомов туберкулезной инфекции, но определяли микобактериальную нагрузку в легких и селезенке. [150].

В НИИ туберкулеза, Токио, Япония, разработана модель ЛТБИ на морских свинках, которые были инфицированы подкожно в дозе ~ 100 КОЕ *M. tuberculosis* H37Rv-GFP с экспрессией зелёного флуоресцентного белка (GFP). Через 10 мес у животных не было выявлено макроскопических повреждений легких, но обнаруживались микрогранулемы и невысокая бактериальная нагрузка в легких, печени и селезенке [284].

Крысы (*Rattus* sp.) – используются для изучения ТБИ: линии Wistar и Lewis, у которых заражение *M. tuberculosis* не вызывает поражений с центральными некрозами; и хлопковые крысы (*Sigmodon hispidus*), у которых заражение *M. tuberculosis* приводит к развитию некротических поражений и высокого уровня обсемененности органов [271].

При сотрудничестве Военно-медицинского университета, Бетесда, США, и фармацевтических компаний Sequella и Virion Systems, США, разработана модель ЛТБИ на инбредных хлопковых крысах, которых заражали интраназально клетками *M. tuberculosis* H37Rv в дозе $3,9 \times 10^3$ КОЕ/животное. Через 9 месяцев после заражения осуществляли реактивацию туберкулеза иммунодепрессантом циклофосфамидом, после чего у животных была зафиксирована активная форма ТБИ [96].

Кролики (*Oryctolagus cuniculus*) часто используются для моделирования туберкулеза. Наиболее устойчивой линией к заражению *M. tuberculosis* является линия белых новозеландских кроликов NZW, которая используется при инфицировании внутривенно, интратекально, интрабронхиально или аэрозольно. Некоторые штаммы *M. tuberculosis* способны вызывать у NZW хроническую инфекцию, которая в

значительной степени соответствует заболеванию у человека: некротическая пневмония, некротические гранулемы [295]. Кроличья модель была использована для оценки токсичности и эффективности противотуберкулезных препаратов [249].

Лаборатории Университета Джонса Хопкинса, Корнеллского университета, Университета Джорджа Вашингтона, Центра здоровья Техаса, и Колледжа медицины Эйнштейна, США, создали ЛТБИ-модель на кроликах линии NZW, аэрозольно заражая клетками *M. tuberculosis* H37Rv в дозе 10^3 КОЕ/животное. Реактивацию ТБИ осуществляли внутримышечным введением дексаметазона. Через 5 нед после заражения у кроликов было зафиксировано формирование небольшого количества легочных гранулем, содержащих микобактерии в покоем состоянии [174].

Мини-пиги используются для создания моделей ТБИ в целях испытания терапевтических препаратов. Мини-пиги, как и кролики, устойчивы к развитию тяжелой формы туберкулезной инфекции [240].

Малайская турайя (*Tupaia belangeri*) - близкий родственник приматов с весом тела 130-140 г. При ТБИ развиваются казеозно-некротические поражения в легких и других органах. Эта перспективная модель для изучения туберкулезной инфекции [319].

Обезьяны разных таксономических групп (*Macaca mulatta*, *Macaca fascicularis*, *Callithrix jacchus*) используются для испытания вакцин и базовых иммунологических исследований, поскольку их иммунная система в значительной степени схожа с таковой у человека. Несмотря на то, что обезьяны менее чувствительны к туберкулезу, по сравнению с человеком, использование этих моделей позволяет получить полный спектр патогенетических поражений при ТБИ у человека: пневмонию, фиброз и кавернозный некроз [313].

В университете Питсбурга, штат Пенсильвания, США, была разработана модель ЛТБИ на *Macaca fascicularis*, которых заражали низкими дозами (~25 КОЕ) вирулентного штамма *M. tuberculosis* Erdman через бронхоскопическую инстилляцию в легкие, после чего у животных сформировалась ЛТБИ, полностью аналогичная таковой у человека, что было подтверждено с помощью кожного туберкулинового теста и методом оценки пролиферации лимфоцитов, а также наличием небольшого количества фиброзных гранулем в легких [56, 166].

Моделирование покоящегося состояния *Mycobacterium tuberculosis in vitro*

Моделирование покоящегося состояния клеток *M. tuberculosis in vitro* важно для

понимания процессов перехода инфекции активной формы ТБ в ЛТБИ и реактивации этого процесса. Большинство *in vitro* моделей получения покоящихся клеток *M. tuberculosis* основаны на длительном культивировании микобактерий в стрессовых условиях: кислородное голодание, недостаток питательных веществ, окислительный стресс, постепенное снижение pH и др., что имитирует условия внутри легочных гранул человека, больного туберкулезом [109].

Многолетний эксперимент Corper и Cohn, 1933 г. (Национальный Еврейский госпиталь, Денвер, США): 8 штаммов *M. tuberculosis* выращивали в жидкой питательной среде при температуре 37 °С в течение 12 лет. На дне колб выявлены жизнеспособные клетки микобактерий овоидной формы, вирулентность которых доказана при внутривенном заражении морских свинок и кроликов [75].

Модель Wayne и Hayes, 1996 г. (Медицинский Центр и Университет штата Калифорния, США) основана на постепенном истощении кислорода в закрытых пробирках с культурой клеток *M. tuberculosis* при перемешивании. Изучена динамика чувствительности микобактерий к противотуберкулезным препаратам изониазиду, рифампицину, ципрофлоксацину и метронидазолу в ходе длительного культивирования в анаэробных условиях. Переход в покоящуюся форму *M. tuberculosis* постулирован как эволюционный механизм существования в неблагоприятных условиях окружающей среды для неспорулирующих бактерий [309].

Пассирование микобактерий на первичной культуре мышинных макрофагов (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск; Институт биохимии им. А.Н. Баха, Москва; Университет Вэйлса, Великобритания) – *in vitro* модель, основанная на выращивании клеток *M. tuberculosis* в течение 15 суток в питательной среде Sauton при температуре 37 °С аэробно, с последующим введением мышам линии BALB/c внутрибрюшинно и выделением МФ из асцитной жидкости мышей. Микобактерии выделяли из МФ и повторно пассировали через организм мышей. В результате получены коккоидные формы клеток *M. tuberculosis* размером менее 0,45 мкм. Реактивацию покоящихся форм наблюдали в присутствии белков факторов реактивации (resuscitation-promoting factors, Rpf) [40].

Выращивание микобактерий без аэрации в течение 100 дней (Университет Лондона, Великобритания) в питательной среде Middlebrook 7H9, с последующим внесением рифампицина (100 мкг/мл) и инкубацией в течение 5 дней при температуре 37 °С, что привело к формированию рифампицин-устойчивых микобактериальных клеток, которые расценивали как дормантные формы, сохранившие транскрипционную

активность [134].

Модель голодания (GlaxoSmithKline, Великобритания), основанная на выращивании культуры *M. tuberculosis* до логарифмической фазы в питательной среде Middlebrook 7H9 при температуре 37 °С в течение 7 дней, двукратной отмывке фосфатным буфером и дальнейшем культивировании в буфере. Анализ протеома и транскриптома полученной культуры продемонстрировал глобальное снижение уровня экспрессии генов в клетках бактерий в условиях голодания. При этом бактерии сохраняли устойчивость к метронидазолу, в отличие от бактерий, полученных в модели Wayne L.G. & Hayes L.G. 1996 г., описанной выше. Морфология колоний микобактерий была изменена, клеточная стенка бактерий была утолщена, что подтверждало их дормантное состояние [36].

Продолжительное культивирование в стационарной фазе (Институт биохимии им. А.Н. Баха, Москва и Университет Вэйлса, Великобритания) приводило к формированию «некультивируемых» клеток *M. tuberculosis*. Клетки штамма *M. tuberculosis* Academia выращивали в питательной среде Sauton в закрытых пластиковых пробирках стационарно при температуре 37 °С в течение 8 мес. Полученные овоидные клетки размером 1,2 мкм и кокки размером 0,5-0,7 мкм в фильтрате имели неповрежденные мембраны (не окрашивались йодидом пропидия) и не проявляли никакой дыхательной активности (не окрашивались 5-циано-2,3-ди толил тетразолий хлоридом). После 4 месяцев культивирования осуществляли реактивацию микобактерий в присутствии Rpf белков [263].

Культивирование в хемостате (Центр прикладной микробиологии и исследований, Солсбери, Великобритания) культуры *M. tuberculosis* H37Rv в закрытой системе хемостата с постоянным мониторингом температуры, pH, уровня кислорода. Клетки микобактерий выращивали в условиях углеродного голодания с аэрацией и без аэрации. Показано, что при кислородном голодании клетки микобактерий переходят в покоящееся состояние, характеризующееся измененным профилем экспрессии генов [140].

Культивирование в условиях NO-стресса (Стэнфордская медицинская школа, университетов Колорадо, Вашингтона и Калифорнии, США) приводило к подавлению процесса дыхания в клетках *M. tuberculosis* H37Rv. Показано, что малые концентрации NO увеличивают уровень экспрессии DosR регулятора [304].

Культивирование в условиях голодания при низких значениях pH (Университет Барселоны, Испания) осуществляли с помощью культивирования клеток *M. tuberculosis* H37Rv на питательной среде Middlebrook 7H9 до стационарной фазы с последующим переносом клеток в модифицированную среду Middlebrook 7H9 (pH = 5,5) и выращивания анаэробно при температуре 37 °C в течение 21 суток. Полученные микобактерии не были способны расти на стандартных питательных средах, но росли на богатой питательной среде. Продемонстрирована экспрессия в клетках генов *acr*, *icl*, *fbpB*, *groA* и *recA*, являющихся потенциальными маркерами покоящихся микобактерий [122].

Модель кислородного голодания (Институт исследований туберкулеза и Университет штата Иллинойс, Чикаго, США) разработали для скрининга антибактериальных препаратов против покоящихся форм туберкулеза Low-Oxygen-Recovery Assay (LORA). Клетки штамма *M. tuberculosis* H37Rv (pFCAluxAB), несущие репортерную плазмиду с экспрессирующимся геном *luxAB* *Vibrio harveyi*, выращивали в течение 22 дней в питательной среде Dubos в ферментере анаэробно, аналогично модели Wayne L.G. и Hayes L.G. получения покоящихся форм микобактерий. В ходе культивирования проводили измерение сигнала люминесценции клеток в условиях кислородного голодания [64].

Модель множественного стресса (Университет Центральной Флориды, США) осуществляли при культивировании клеток штамма *M. tuberculosis* H37Rv в условиях влияния четырех стрессовых факторов: кислородное голодание, повышенное содержание CO₂, голодание и кислотность среды. В результате микобактерии прекратили реплицироваться, потеряли кислотоустойчивость, накопили триацилглицерин и восковые эфиры, приобрели антибиотикоустойчивость к рифампицину и изониазиду, увеличили синтез липидов, образовывали овоидные формы [85].

Культивирование в условиях недостатка калия (Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва) осуществляли при культивировании клеток штамма *M. tuberculosis* H37Rv на модифицированной питательной среде Sauton, не содержащей калия, в течение 15 дней, после чего добавляли в среду 5 мг/л рифампицина для удаления активно делящихся клеток. Полученные покоящиеся клетки *M. tuberculosis* были неспособны к росту на твердых питательных средах. Реактивацию осуществляли с помощью отмывки клеток от бескальевой среды и культивирования в питательной среде Sauton [248].

Модель стрептомицин-ауксотрофного штамма (Глобальный институт

здравоохранения, Швейцария и Национальный институт здоровья, США) основана на использовании стрептомицин-ауксотрофного штамма *M. tuberculosis* 18b для получения покоящихся форм микобактерий и тестирования на них лекарственных средств. Клетки штамма *M. tuberculosis* 18b культивировали с аэрацией при температуре 37 °С на питательной среде 7Н9 Middlebrook в присутствии стрептомицина 50 мкг/мл до средней логарифмической фазы, после чего клетки отмывали фосфатным буфером и помещали в питательную среду без стрептомицина, инкубировали при температуре 37 °С с аэрацией в течение 10 дней. После культивирования клеток *M. tuberculosis* 18b в питательной среде без стрептомицина полученные клетки не росли на плотных питательных средах и были устойчивы к антимикобактериальным препаратам. Реактивацию покоящихся форм микобактерий проводили с помощью добавления в питательную среду стрептомицина [247].

Выращивание в условиях постепенного закисления среды (Институт биохимии им. А.Н. Баха, Москва, Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина, Пущино и Института микробиологии им. С.Н. Виноградского, Москва) проводили при выращивании клеток *M. tuberculosis* H37Rv в питательной среде Sauton в течение 12-15 дней с дальнейшим переносом клеток в питательную среду Sauton (pH=6,0-6,2) и инкубировании аэробно при температуре 37 °С. После 37-45 дней инкубации клетки переносили в анаэробные стационарные условия при комнатной температуре на 135-143 дней. Препараты покоящихся клеток получали фильтрованием через фильтр с порами 0,22 мкм. Изучена форма полученных покоящихся клеток (овоидные бактерии), которые были устойчивы к повреждающим факторам (прогревание и антибиотики) и утратили способность формировать колонии на твердых питательных средах, но реактивировались при инкубировании в культуральной жидкости активно растущей культуры *M. tuberculosis* или при добавлении рекомбинантного белка Rpf [262].

Модель гранулемы человека *in vitro* (Университет Центральной Флориды, США) разработали при помощи сокультивирования клеток *M. tuberculosis* H37Rv и моноклеарных клеток периферической крови человека (РВМС), которые смешивали в лунках 96-луночного планшета при комнатной температуре с препаратом внеклеточного матрикса (ЕСМ) и клетками микобактерий, инкубировали 45 мин при температуре 37 °С. Затем в суспензию добавляли питательную среду RPMI с 20 % человеческой сывороткой и инкубировали 8 суток при температуре 37 °С. Было показано, что инфицированные

микобактериями клетки РВМС образовывали микрогранулемы. При этом клетки *M. tuberculosis* переходили в состояние покоя, что подтверждено потерей ими кислотоустойчивости при окрашивании, накоплением липидных тел, развитием устойчивости к рифампицину и изменением экспрессии генов. Обработка гранулем моноклональными антителами анти-TNF α вызвала реактивацию покоящихся клеток *M. tuberculosis* [145].

1.4 Противотуберкулезные профилактические и терапевтические вакцины

На сегодняшний день вакцина БЦЖ (*Bacillus Calmette-Guérin*) является единственной лицензированной вакциной для профилактики туберкулеза. Вакцинацию, в основном, проводят у новорожденных детей, для которых данная вакцина обладает высокой степенью протективности. Показано, что при вакцинации БЦЖ во взрослом состоянии формируется слабая защита. В течение последних двух десятилетий во многих странах проводятся работы по разработке новых кандидатных вакцин и БЦЖ-бустеров (препаратов, усиливающих протективные свойства вакцины БЦЖ) [202, 289]. Важными характеристиками вакцинных препаратов является продолжительность защиты и ее эффективность. Эффективность вакцины зависит от статуса организма человека (наличие или отсутствие инфекции, статус иммунной системы, состояние здоровья). Противотуберкулезные вакцины подразделяются на профилактические (для предотвращения или ослабления возможной будущей инфекции) и терапевтические (для индукции иммунного ответа у инфицированных людей, способствующего выздоровлению или улучшению их состояния).

На октябрь 2021 г., по данным организации *TuBerculosis Vaccine Initiative* (TBVI), на разных стадиях испытаний находятся более 20 профилактических и терапевтических противотуберкулезных вакцин (рисунок 1.14). Исследования кандидатных вакцинных препаратов включают в себя несколько этапов: доклинические испытания – оценка безопасности и эффективности препаратов на животных и клеточных моделях; клинические испытания, состоящие из 3 фаз. Фаза 1 – испытание препарата на небольшом числе добровольцев (как правило, молодых взрослых) для оценки безопасности, наличия иммунологической активности и определение дозы. Фаза 2 – испытание на сотнях добровольцев для дальнейшей оценки безопасности и иммунологической активности препарата для пациентов разных возрастов, по сравнению с группой сравнения (плацебо).

Иногда Фаза 2 делится на фазы 2a и 2b. Фаза 2a – пробные исследования по определению уровня безопасности препарата и чувствительности пациентов к разным дозам. Фаза 2b – четкое определение эффективности и безопасности препарата, уровня дозирования для проведения Фазы 3. Фаза 3 – испытание на тысячах добровольцев, сравнение с контрольной группой (препарат сравнения), изучение безопасности для людей в разных географических регионах (<https://www.who.int/ru/news-room/feature-stories/detail/how-are-vaccines-developed>).

	Доклинические испытания	Фаза 1	Фаза 2a	Фаза 2b	Фаза 3
Профилактические вакцины для младенцев и новорожденных	BCG-ZMP1 (Ун-т Цюриха, TBVI)		MTBVAC (Ун-т Сарагосы, Ин-т Пастера, Biofabri, TBVI)		VPM1002 (Ин-т М.Планка, SII, VPM, TBVI)
Профилактические вакцины для подростков и взрослых	H107 (SSI, TBVI)	Ad5 Ag85A (Ун-т Макмастер, CanSino)	MTBVAC (Ун-т Сарагосы, Ин-т Пастера, Biofabri, TBVI)	M72 + ASO1 (GSK, IAVI)	VPM1002 (Ин-т М.Планка, SII, VPM, TBVI)
	BCG, ChadOx1/MVA PPE15-85A (Ун-т Оксфорд, TBVI)	ChadOx1.85A MVA 85A Aerosol (Ун-т Оксфорд, TBVI)	ID93/GLA-SE (QTP101) (Quratis)	DAR-901 (Ун-т Дартмут, Aeras)	MIP (Cadila Pharma)
	CMV-6Ag (Aeras, Vir Biotech, OHSU)	AEC/BC02 (Anhui Zhifei Longcom)		H56:IC31 (SSI, Valneva, Aeras)	ГамТБвак (Минздрав, Россия)
	CysVac2/Ad (Ун-т Сиднея, TBVI)	TB/Flu04L (RIBSP)		BCG Revaccination (Gates MRI)	
BCG-ZMP1 (Ун-т Цюриха, TBVI)					
Терапевтические вакцины	MVA Multiphasic vac. (Transgene, TBVI)	ID93/GLA-SE (ACTG, HVTN)	RUTI (Archivel Pharma)	Ruti (Archivel Pharma)	VPM1002 (Ин-т М.Планка, SII, VPM, TBVI)
	H107 (SSI, TBVI)	H56:IC31 (SSI, Valneva)			
		TB/Flu01L (RIBSP)			

Рисунок 1.14 – Разрабатываемые кандидатные профилактические и терапевтические противотуберкулезные вакцины, и препараты (<https://www.tbvi.eu/what-we-do/pipeline-of-vaccines/>, с изменениями). Синий цвет – живые вакцины; желтый цвет – субъединичные вакцины; красный цвет – векторные вакцины; зеленый цвет – цельноклеточные вакцины

Современные противотуберкулезные вакцинные препараты разрабатываются на нескольких основных технологических платформах. Живые (аттенуированные) вакцины – на основе ослабленных штаммов микобактерий. Субъединичные вакцины – включают в себя один или нескольких слитых иммуногенных белков патогена, а также адъювант, усиливающий антигенное действие белков. Векторные вакцины – презентация антигенов туберкулезного микроба иммунной системе с помощью доставки рекомбинантными ослабленными вирусами (аденовирусами, цитомегаловирусами и др.). Цельноклеточные (инактивированные) вакцины – на основе инактивированных нетуберкулезных микобактерий или фрагментов клеток *M. tuberculosis* (рисунок 1.14).

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Микробиологические методы

Штаммы микроорганизмов

Клинические штаммы *Mycobacterim tuberculosis*, использованные в работе, выделены от пациентов Федерального бюджетного учреждения здравоохранения «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Дагестан» Роспотребнадзора (штамм «Ростов»), от пациентов Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Министерства здравоохранения Российской Федерации (штаммы 120/26 и 267/47). В качестве референс-штамма использовали штамм *M. tuberculosis* H37Rv, полученный из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск» (Таблица 2.1).

Таблица 2.1 – Штаммы *M. tuberculosis*, использованные в работе

Штамм	Номер в коллекции ГКПМ-Оболенск	Источник выделения	Дата выделения	Ссылка
H37Rv	B-4825	Легкие человека, Нью-Йорк, США	1934 г.	[278]
Ростов	B-7601	Мокрота пациента с диагнозом «туберкулез легких»	ноябрь 2013 г.	[5]
120/26	B-9343	Мокрота пациента с диагнозом «туберкулез легких»	май 2018	[110]
267/47	B-9344	Мокрота пациента с диагнозом «туберкулез легких»	апрель 2018	[110]

Питательные среды, условия культивирования и хранения бактерий

Культивирование микобактерий осуществляли на плотных питательных средах Middlebrook 7H10 и 7H11 (BD, Франклин Лейкс, Нью-Джерси, США), Левенштейна–Йенсена (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия), Финна 2 (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия) и на жидкой питательной среде Middlebrook 7H9, обогащенной OADC (BD, Франклин Лейкс, Нью-Джерси, США) с добавлением 0,05 % Tween при температуре 37 °С в течение 21-28 сут. Бульонные культуры выращивали при аэрации со скоростью вращения 180-200 об/мин. Хранение бактериальных культур осуществляли в 50 %-ном глицерине при температуре минус 70 °С, а также в лиофильно высушенном виде.

Выделение бактерий из клинического материала

Образцы мокроты обрабатывали 10 % раствором Na_3PO_4 и перемешивали со стеклянными бусами на приборе Vortex (Scientific Industries, Богемия, Нью-Йорк, США) в течение 10 мин, затем инкубировали при температуре 37 °С в течение 18–20 ч. Суспензию центрифугировали при $3000 \times g$ в течение 15 мин. Осадок обрабатывали 6 % раствором HCl (до $\text{pH} = 7,0$), и отмывали дистиллированной водой. Отмытый осадок высевали на питательные среды Левенштейна–Йенсена (ФБУН ГНЦПМБ, Оболенск, Россия), Финна 2 (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия) и Middlebrook 7H10 (BD, Франклин Лейкс, Нью-Джерси, США). Посевы инкубировали при температуре 37 °С в течение 28 сут. Выросшие колонии микроскопировали, готовили мазки и окрашивали по Цилю–Нильсену [264].

Видовая идентификация бактерий

Микобактерии идентифицировали на приборе MALDI-TOF Biotyper (Bruker Daltonik GmbH, Германия). Для этого использовали две методики – экстракцию белков трифторуксусной кислотой и экстракцию белков муравьиной кислотой, в сочетании с дезинтеграцией бактериальных клеток циркониевыми/кварцевыми шариками, в соответствии с инструкцией производителя.

Изучение динамики роста культур микобактерий

Замороженные аликвоты бактериальных клеток (1×10^5 КОЕ) вносили в 30 мл бульона Middlebrook 7H9 с добавкой OADC (BD, Франклин Лейкс, Нью-Джерси, США) и 0,05% Tween 80, выращивали при температуре 37 °С в стационарных условиях (без перемешивания) в колбе объёмом 250 мл (Greiner AG, Кремс-мюнстер, Австрия) в течение 30 дней для оценки показателей скорости роста (индекс роста и C_{max}). Все эксперименты проводили в трех биологических повторностях. Через каждые пять дней отбирали аликвоты объёмом 0,1 мл для подсчета КОЕ путем посева серийных 10-кратных разведений в трех повторах на плотную питательную среду Middlebrook 7H11, обогащенную OADC (BD, Франклин Лейкс, Нью-Джерси, США). Количество колоний микобактерий на чашках учитывали через 21 день после инкубации при 37 °С.

Индекс роста культуры вычисляли по формуле

$$\text{Индекс роста} = \frac{\log_{10} A}{\log_{10} B},$$

Где $\log_{10} A$ – десятичный логарифм показателя КОЕ в оцениваемый момент времени, $\log_{10} B$ – десятичный логарифм показателя КОЕ в начальный момент времени.

C_{\max} – максимальное значение индекса роста одного штамма [250].

Определение чувствительности к антимикробным препаратам

Минимальные подавляющие концентрации (МПК) противотуберкулезных препаратов: изониазида (INH), рифампина (RIF), стрептомицина (STR), этамбутола (EMB), амикацина (AMK), канамицина (KAN), капреомицина (CAP), офлоксацина (OFX) и пиперазина (PZA) для клинических штаммов *M. tuberculosis* определяли с помощью системы ВАСТЕС MGIT 960 (BD, Спаркс, Мэриленд, США), согласно инструкции производителя, а также при использовании ТБ тест-набора (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия) [4].

Моделирование стрессовых условий культивирования *M. tuberculosis in vitro*

Клетки штамма *M. tuberculosis* H37Rv выращивали в жидкой питательной среде 7H9 с добавкой OADC (BD, Франклин Лейкс, Нью-Джерси, США) 0,05 % Tween 80 до оптической плотности ($OD_{600} \approx 1$), осаждали при $6000 \times g$ при температуре $4^\circ C$ в течение 20 мин, трижды отмывали фосфатным буфером и переносили в жидкую питательную среду, состав которой моделировал один из стрессов: осмотический, голодание, гипоксия, кислотный и оксидативный. В качестве контроля бесстрессовой среды клетки штамма *M. tuberculosis* H37Rv переносили в свежую порцию жидкой питательной среды 7H9 с 10 % OADC (BD, Франклин Лейкс, Нью-Джерси, США) и 0,05 % Tween 80, pH = 7,0.

Осмотический стресс моделировали культивированием микобактерий в дистиллированной воде в течение 2, 15 и 24 ч при температуре $37^\circ C$ на качалке со скоростью вращения 180-200 об/мин.

Голодание моделировали при культивировании в истощенной питательной среде (супернатант стационарной культуры) в течение 2, 15 и 24 ч при температуре $37^\circ C$ на качалке со скоростью вращения 180-200 об/мин.

Гипоксический стресс моделировали с помощью культивирования микобактерий в питательной среде 7H9 с 10 % OADC и 0,05 % Tween 80 в колбе с герметично закрытой крышкой без доступа кислорода в стационарных условиях в течение 2, 15 и 24 ч при температуре $37^\circ C$.

Кислотный стресс моделировали при культивировании клеток штамма *M. tuberculosis* H37Rv в питательной среде 7H9 с 10 % OADC и 0,05 % Tween 80, pH = 5,4 в течение 2, 15 и 24 ч при температуре $37^\circ C$ на качалке со скоростью вращения 180-200 об/мин.

Окисидативный стресс моделировали с помощью культивирования микобактерий в питательной среде 7H9 с 10 % OADC и 0,05 % Tween 80 с добавлением H_2O_2 в конечных концентрациях 0,5, 1,0 и 5,0 мМ или с добавлением препарата PAPA NONOate (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США), являющегося донором NO, в конечных концентрациях по NO 0,04, 0,4 и 4,0 мМ. В этих условия клетки штамма *M. tuberculosis* H37Rv инкубировали при температуре 37 °С при аэрации (200 об/мин) в течение 40 мин.

По завершении культивирования клетки микобактерий осаждали при 6000×g при температуре 4 °С в течение 20 мин и выделяли из них тотальную РНК. Каждый эксперимент проводили в трех биологических повторностях.

2.2 Биохимические методы

Определение биохимических свойств *M. tuberculosis*

Нитратредуктазную активность и способность к росту на среде с тиафенкарбоксигидразидом определяли с помощью «Набора питательных сред для ускоренного определения лекарственной чувствительности и первичной идентификации микобактерий туберкулеза» (ТБ тест-набор), регистрационный № ФСР 2007/01366, с. 1/14 (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия).

Выделение геномной ДНК

Одну петлю культуры *M. tuberculosis*, выращенную на плотной питательной среде Middlebrook 7H11 с добавкой OADC (BD, Франклин Лейкс, Нью-Джерси, США), инокулировали в 20 мл питательной среды Middlebrook 7H9 с добавкой OADC (BD, Франклин Лейкс, Нью-Джерси, США) и 0,05 % Tween, культивировали при температуре 37 °С с аэрацией в течение 14-21 дней. Клетки осаждали при 2500×g в течение 15 мин, удаляли культуральную жидкость, осадок ресуспендировали в 1 мл Breaking buffer (50 мМ Tris-HCl, 10 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA), 100 мМ NaCl, pH = 8, стерилизовали автоклавированием, перед использованием вносили РНКазу до конечной концентрации 200 мг/л). Полученный раствор переносили в пробирку объемом 2 мл, содержащую 200-300 мкл 0,1 мм бусы из диоксида циркония/диоксида кремния (BioSpec Products, Бартлсвилл, Оклахома, США) и разрушали клетки на приборе Bead Beater instrument (BioSpec Products, Бартлсвилл, Оклахома, США) при максимальной скорости 2 раза по 15 сек. Лизат переносили в новую пробирку, бусы дважды промывали 200 мкл Breaking buffer, смыв добавляли к лизату. Для удаления белков к лизату

добавляли 0,1 объема 10 % додецилсульфата натрия (SDS) и 0,01 объема протеиназы К (10 мг/мл), выдерживали при температуре 55 °С в течение 1 ч, периодически перемешивая переворачиванием. Дальнейшую очистку проводили при помощи добавления равного объема смеси фенол/хлороформ/изопропанол в соотношении 25/24/1, соответственно, при интенсивном перемешивании, с дальнейшим осаждением при 12000×g в течение 30 мин. Верхнюю водную фазу аккуратно переносили в новую пробирку и добавляли равный объем хлороформа для удаления следов фенола, интенсивно перемешивали и осаждали при 12000×g в течение 5 мин. Верхнюю водную фазу переносили в новую пробирку и добавляли 0,1 объем 3 М ацетата натрия (рН = 5,2) и 1 объем изопропанола, полученную смесь перемешивали 5 мин и выдерживали при температуре 4 °С в течение 1 ч. Геномную ДНК осаждали при 12000×g в течение 15 мин, промывали 500 мкл 70 % этанола, осаждали при 12000×g в течение 30 мин, сушили при комнатной температуре ~10-15 мин и разбавляли в 100 мкл дистиллированной воды, свободной от нуклеаз [34].

Выделение ДНК для полногеномного секвенирования

Несколько бактериальных петлей культуры штаммов *M. tuberculosis*, выращенной на плотной питательной среде, суспендировали в 0,4 мл буферного раствора ТЕ (10 мМ Tris HCl, 1 мМ EDTA, рН = 8) и инактивировали при 80 °С в течение 20 мин. Добавляли 50 мкл раствора лизоцима (10 мг/мл), интенсивно перемешивали и инкубировали при температуре 37 °С в течение 2 ч при перемешивании. Затем вносили 70 мкл 10 % SDS и 5 мкл протеиназы К, 100 мкл 5 М NaCl и 100 мкл раствора СТАВ/NaCl (4,1 г NaCl, 10 г бромида цетилтриметиламмония (СТАВ) 80 мл дистиллированной воды) интенсивно перемешивали до появления молочно-белой окраски раствора и инкубировали при 65 °С в течение 10 мин. Затем добавляли 750 мкл смеси хлороформ/изоамиловый спирт (24/1), встряхивали в течение 10 сек и осаждали при 30000×g в течение 5 мин. Надосадочную жидкость переносили в новую пробирку, добавляли 450 мкл изопропилового спирта, инкубировали на льду в течение 10 мин, осаждали при комнатной температуре при 30000×g в течение 15 мин. Удаляли супернатант и добавляли к осадку 1 мл 70 % этанола, центрифугировали при 20000×g при температуре 4 °С в течение 15 мин. Супернатант удаляли, осадок высушивали и ресуспендировали в 20 мкл ТЕ буфера [5].

Выделение тотальной РНК из клеток *M. tuberculosis*

Одну петлю культуры *M. tuberculosis* H37Rv, выращенную на плотной питательной среде Middlebrook 7H11 с добавкой OADC (BD, Франклин Лейкс, Нью-Джерси, США),

инокулировали в 50 мл питательной среды Middlebrook 7H9 с добавкой OADC (BD, Франклин Лейкс, Нью-Джерси, США) и 0,05 % Tween, культивировали при температуре 37 °С с аэрацией в течение 7-10 дней до достижения оптической плотности $OD_{600} \approx 1$. Клетки *M. tuberculosis* H37Rv осаждали при $6000 \times g$ в течение 20 мин при температуре 4 °С ресуспендировали в смеси фенола и гуанидинтиоцианата и переносили в пробирки, содержащие 0,2-0,3 мл бус $\varnothing \approx 0,1$ мм из диоксида циркония/диоксида кремния (BioSpec Products, Бартлсвилл, Оклахома, США) и разрушали клетки при помощи Bead Beater instrument на максимальной скорости 3 раза по 30 сек (BioSpec Products, Бартлсвилл, Оклахома, США). Далее использовали набор реагентов РНК-ЭКСТРАН (Синтол, Москва, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Выделенную тотальную РНК обрабатывали Turbo DNase (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния, США) для удаления следов геномной ДНК. Визуализацию тотальной РНК осуществляли при помощи электрофореза в агарозном геле и окраски бромистым этидием или SYBR Green.

Выделение тотальной РНК из тканей легких мышей

Фрагменты легких асептически вырезали из грудной клетки умерщвлённых экспериментальных мышей линии C57BL/6, взвешивали, погружали в жидкий азот и помещали в микропробирку, содержащую 0,8 мл смеси фенола и гуанидинтиоцианата и 0,2-0,3 мл бус $\varnothing \approx 0,1$ мм из диоксида циркония/диоксида кремния (BioSpec Products, Бартлсвилл, Оклахома, США) и разрушали клетки при помощи Bead Beater instrument на максимальной скорости 3 раза по 30 сек (BioSpec Products, Бартлсвилл, Оклахома, США). Далее процедуру выделения тотальной РНК проводили, как описано выше.

2.3 Молекулярно-генетические методы

Синтез кДНК

Для синтеза кДНК из 1 мкг тотальной РНК использовали набор RevertAid RT Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) в соответствии с протоколом производителя.

Полимеразная цепная реакция

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с помощью амплификатора MasterCycler Gradient Thermal Cycler (Eppendorf, Гамбург, Германия) в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 2 мкл диметилсульфоксида (DMSO), 2 мкл 2 мМ дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP) (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс,

США), 10-кратного буфера DreamTaq Green (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США), по 1 мкл 10 пмоль прямого и обратного праймеров, 1 ед. DreamTaq ДНК полимеразы (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) и ~10 нг геномной ДНК *M. tuberculosis*. Для амплификации использовали следующую программу: 95 °С 5 мин., (95 °С 20 сек., 61 °С 20 сек., 72 °С 30 сек.) × 35 циклов, 72 °С 5 мин., 4 °С – хранение. Визуализацию продуктов амплификации проводили при помощи электрофореза в 0,8 - 2,5 % агарозном геле (в зависимости от размера ПЦР-продуктов) с последующей окраской бромистым этидием.

ПЦР в реальном времени (количественная ПЦР)

ПЦР в реальном времени проводили на приборе CFX96 Real-Time PCR (Bio-Rad Laboratories, Геркулес, Калифорния, США), используя набор qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Москва, Россия). Детекцию специфической амплификации обеспечивали за счет репортерной флюоресценции интеркалирующего красителя SYBR Green. ПЦР реакцию проводили в соответствии с программой: 95 °С 5 мин., (95 °С 20 сек., 61 °С 20 сек., 72 °С 30 сек. + оценка репортерной флюоресценции) × 40 циклов. Для подтверждения специфичности реакции проводили анализ кривой плавления ПЦР-продукта в интервале температур 60 °С - 94 °С, с шагом оценки флюоресценции 0,2 °С. Для статистической достоверности каждая реакция проводилась в трех технических повторах.

Сполиготипирование

Сполиготипирование выполняли как описано ранее [144]. Кратко, 20 нг хромосомной ДНК амплифицировали с праймерами DRa-5'-Biotin-ggttttgggtctgacgac-3' и DRb-5'-ccgagaggggacggaac-3' (Isogen Life Science, Утрехт, Нидерланды). Реакцию проводили в 50 мкл: прямой и обратный праймеры – по 10 пмоль; 0,2 мМ dNTP (Fermentas, Уолтем, Массачусетс США); 10×Taq буфер с KCl и 1,5 мМ MgCl₂ (Fermentas, Уолтем, Массачусетс США); Taq ДНК-полимераза – 5 ед./мкл (Fermentas, Уолтем, Массачусетс США); хромосомная ДНК – 20 нг. Реакцию амплификации проводили в амплификаторе MasterCycler Gradient Thermal Cycler (Eppendorf, Гамбург, Германия) по программе: 96 °С, 3 мин; 30 циклов (96 °С, 1 мин; 55 °С, 1 мин; 72 °С, 30 с); 72 °С, 5 мин. ПЦР-продукты прогревали с буфером 2×SSPE / 0,1 % SDS в течение 10 мин при температуре 99 °С и вносили в миниблоттер Miniblotter 45 (Immuntics, Бостон, Массачусетс, США) с мембраной, на которой локализованы 43 спейсера (Isogen Life

Science, Утрехт, Нидерланды). Гибридизацию проводили в течение 1 ч при температуре 60 °С. Мембрану дважды отмывали при температуре 60 °С в 250 мл буфера 2×SSPE / 0,5 % SDS, инкубировали в течение 1 ч при температуре 42 °С в буфере 2×SSPE / 0,5 % SDS с SA-HRP (Amersham Biosciences, Эмиршем, Великобритания) и дважды - при температуре 42 °С в 250 мл буфера 2×SSPE / 0,5 % SDS и при комнатной температуре в буфере 2×SSPE. Результаты выявляли с помощью хемилюминесцентной реакции в соответствии с рекомендациями производителя (Amersham Biosciences, Эмиршем, Великобритания).

MIRU-VNTR-типирование

Для генотипирования использовали метод MIRU-VNTR-типирования, основанный на анализе 24 локусов хромосомы возбудителя туберкулеза [286]. ПЦР проводили на амплификаторе DNA Engine Dyad (Bio-Rad, Геркулес, Калифорния, США) в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 50 мМ KCl, 10 мМ Tris-HCl, pH = 8,8, 0,08 % Nonidet P40, 1,5–3,0 мМ MgCl₂, 0,2 мМ каждого дезоксинуклеотида, 0,4 мкМ каждого праймера, 1 ед. активности рекомбинантной *Taq*-полимеразы (Хеликон, Россия). Режим амплификации: 95 °С, 10 мин; 30 циклов (95 °С, 1 мин; 59 °С, 1 мин; 72 °С, 2 мин); 72 °С, 10 мин. Продукты реакции амплификации анализировали методом электрофореза в 1,2 % агарозном геле в 1×TBE-буфере. Окраску проводили бромистым этидием. Размер ПЦР-продуктов определяли с помощью маркеров размеров ДНК GeneRuler™ 100 bp DNA Ladders (Fermentas, Уолтем, Массачусетс США). Число tandemных повторов в соответствующих 24 локусах вычисляли путем сравнения табличных данных с размерами ПЦР-продукта.

Полногеномное секвенирование

Полногеномное секвенирование штаммов *M. tuberculosis* осуществляли с помощью прибора Ion Torrent PGM, используя набор реагентов PGM Sequencing 200 Kit v2 (Life Technologies, Камарильо, Калифорния, США). Последовательности ридов размещали в базе данных NCBI в рамках проекта BioProject PRJNA269675. Сборку генома *de novo* осуществляли с помощью программы Newbler GS 2.5 (Roche, Бранфорд, Коннектикут, США), используя стандартные параметры для Ion technology.

Для полногеномного секвенирования на приборе MGISEQ-200RS образцы хромосомной ДНК *M. tuberculosis* расщепляли на фрагменты размером 350 пар оснований (п.о.) с помощью ультразвукового дезинтегратора и очищали при помощи AMPure магнитных бус (ThermoFisher, Уолтем, Массачусетс, США). Библиотеки с парным

концом были подготовлены с помощью набора MGIEasy Universal Library Prep Set (BGI/MGI, Шэньчжэнь, Китай/Сан-Хосе, Калифорния, США) в соответствии с инструкциями производителя. Полногеномное секвенирование выполняли с использованием прибора MGISEQ-200RS (BGI/MGI, Шэньчжэнь, Китай/Сан-Хосе, Калифорния, США) получены 50 п.о. риды с парными концами. Последовательности ридов размещены в базе данных NCBI в рамках проекта BioProject PRJNA704837.

2.4 Биоинформатические методы

Дизайн олигонуклеотидных праймеров

Специфичные праймеры для оценки представленности цитокинов в тканях легких мышей линии C57BL/6 и малых некодирующих РНК в клетках *M. tuberculosis* рассчитывали, используя программу Vector NTI Advance 11.0 (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США). Синтез олигонуклеотидов осуществляли в компании Евrogen (Москва, Россия). Вторичную структуру олигонуклеотидов анализировали при помощи программы Gene Runner 6.5.52 (<http://www.generunner.net/>), специфичность праймеров – с помощью веб-ресурсов NCBI primer design (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) и Insilico (<http://insilico.ehu.eu/>) [321, 39].

Анализ данных полногеномного секвенирования

Подтверждение наличия однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs) в гене *sigA* и САО-специфической вставки IS6110 в межгенную область Rv1359-Rv1360 выполняли с помощью ПЦР, как описано ранее [261]. Оценку качества полученных ридов при полногеномном секвенировании проводили с помощью программы FastQC v.0.11.9 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). SNPs выявляли с помощью ресурса Snippy pipeline v.4.6.0 (<https://github.com/tseemann/snippy>), качество проверяли с помощью QualiMap v.2.2.2 [210].

Филогенетический анализ

Филогенетический анализ проводили с использованием международной базы данных VNTRPLUS (<http://www.miruvnrplus.org/>), а также баз данных отдела коллекционных культур ФБУН ГНЦ ПМБ и лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов ФНКЦ ФХМ ФМБА.

2.5 Биологические методы

Биоэтические требования

Все эксперименты на животных проводили в соответствии с требованиями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых в научных целях), Санитарных правил 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и возбудителями паразитарных заболеваний» и Ветеринарных протоколов: ВП-2016/8, ВП-2018/6, ВП-2018/7, ВП-2018/8 и ВП-2020/10. Кроме того, все эксперименты на животных были одобрены отделом биоэтики ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболенск, Россия).

Лабораторные животные

В работе использовали самок мышей линии C57BL/6 и морских свинок линии альбиносы. Животные были получены из Научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства (Андреевка, Россия). Животных содержали в поликарбонатных клетках при освещении с 7:00 до 19:00 в виварном помещении уровня безопасности BSL3 при температуре (22 ± 2) °C и влажности на уровне (50 ± 10) %. Грызуны получали водопроводную воду и мышиный комбикорм РК-120 (Лабораторкорм, Россия) *ad libitum* на протяжении всего исследования. Состояние здоровья животных (внешний вид, поведение) проверяли, по крайней мере, два раза в день, два раза в неделю определяли массу тела. В экспериментах использовали минимальное количество животных, необходимое для обеспечения статистической достоверности. Животные были разделены на группы случайным образом. Показатель выживаемости животных рассчитывали, как отношение выживших животных к общему количеству в группе.

Заражение животных

Внутривенное заражение. Самок мышей линии C57BL/6 возраста 7-8 недель и веса 20-22 г заражали в боковую хвостовую вену суспензией клеток штаммов *M. tuberculosis* ($\sim 5 \times 10^6$ КОЕ/мл) в объеме 0,1 мл 0,9 % NaCl.

Аэрозольное заражение. Мышей линии C57BL/6 и морских свинок альбиносов заражали штаммом *M. tuberculosis* H37Rv в аэрозольной камере CO 099C A4224 (Glas-Col, Терре-Хот, Индиана, США). Использовали суспензию микобактерий в концентрации

10⁶ КОЕ/мл в объеме 7 мл. Режим работы камеры: ENTER PREHEAT TIME - 900; ENTER NEB.TIME – 1800; ENTER CD. TIME- 900; ENTER DEC. TIME – 900; контроль вакуума. Режимы работы камеры: А. Поддержание динамического режима – 60л/мин; Б. Подача воздуха в небулайзер – 10 л/мин. Доза заражения рассчитана, как 50-100 КОЕ/животное. После заражения животных содержали в микроизоляторах (S = 864 см²) с крышками, оборудованными НЕРА-фильтрами. Животные имели свободный доступ к корму и воде.

Внутрибрюшинное заражение. Самкам мышей линии C57BL/6 внутрибрюшинно вводили 1×10⁴ КОЕ/мышь штамма *M. tuberculosis* H37Rv для развития хронического процесса инфекции.

Испытание вакцинных препаратов

Характеристика вакцинных препаратов. В работе использованы препараты:

- «Полиантигенная вакцина для профилактики и вспомогательного лечения туберкулеза ЛТБвак» (ФГБУ «НИЦЭМ» им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия)- вакцина противотуберкулезная субъединичная рекомбинантная, содержащая рекомбинантный белок ESAT6-CFP10-Ag85a-Rv2660с, который представляет собой слитые микобактериальные белки ESAT-6, CFP10, Ag85a и Rv2660с с гистидиновым тагом длиной 8 остатков, и адъювант (СПГ-олигонуклеотид и мурамилдипептид, иммобилизованные на частицах носителя PLGA, сополимера молочной и гликолевой кислот);

- «ГамТБвак» (ФГБУ «НИЦЭМ» им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия) - препарат сравнения - вакцина противотуберкулезная субъединичная рекомбинантная для бустерного применения (ревакцинации) у БЦЖ-вакцинированных людей, в состав которой входят рекомбинантные белки *M. tuberculosis* Ag85A-DBD и ESAT6-CFP10-DBD, слитые с декстрансвязывающим доменом декстрансуказы из штамма *Leuconostoc citreum* KM20 (DBD) и адъювант (декстран 500 кДа, диэтиламиноэтил-декстран 500 кДа и CpG олигонуклеотид 5'-ggGGGACGA:TCGTCgggggg-3').

Вакцинация мышей линии C57BL/6 и морских свинок. Вакцинацию животных вакциной «БЦЖ» (получена из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск», инвентарный номер В-4824) осуществляли однократно подкожно клетками в дозе 10⁵ КОЕ/животное, размороженными после хранения при температуре -70 °С. Для создания гомогенной взвеси суспензию клеток ресуспендировали инсулиновым шприцем в асептических условиях с соблюдением

правил техники безопасности, разводили в фосфатном буфере с 0,05 % твина 80. Часть приготовленной суспензии использовали для контрольного высева на плотную питательную среду 7H11, обогащённой 10 % OADC.

Бустерная иммунизация мышей линии C57BL/6 и морских свинок. Бустерную иммунизацию субъединичными рекомбинантными противотуберкулезными препаратами проводили двукратно в дозе 5 мкг/животное (подкожно и интраназально) мышей и свинок с двухнедельным интервалом.

Лечение хронического туберкулеза у мышей линии C57BL/6. Терапевтическую эффективность вакцинных препаратов определяли на модели хронического туберкулеза у мышей линии C57BL/6. Терапевтическую дозу (5 мкг/животное) вакцины вводили животным подкожно на 16, 19 и 22 неделю после заражения. Оценивали динамику обсемененности легких и селезенок животных на 25 и 29 недели после заражения, в сравнении с контрольными группами животных (введение физ. раствора или адьюванта вместо вакцинного препарата).

Эвтаназия животных

В данном исследовании использованы гуманные методы умерщвления инфицированных животных – эвтаназия газом CO₂ с последующей цервикальной дислокацией.

Определение обсемененности паренхиматозных органов животных

Микобактериальную нагрузку в легких, селезенке и печени мышей линии C57BL/6 и морских свинок альбиносов определяли путем приготовления гомогенатов органов и высевов 10-кратных разведений на плотную питательную среду 7H11 Middlebrook с добавкой OADC. Подсчет колоний осуществляли после выращивания в течение 21-28 дней при температуре 37 °С.

2.6 Гистологические методы

Приготовление гистологических срезов

Образцы паренхиматозных органов испытуемых животных фиксировали в 10 % формалине (БиоХим-НН, Нижний Новгород, Россия), дегидратировали в градиентных концентрациях этанола и бутанола и заключали в парафин. Затем готовили тонкие срезы (5 мкм) на приборе Ultracut microtome instrument (Reichert-Jung, Бенсхайм, Германия). Депарафинированные срезы окрашивали гематоксилином/эозином, оценивали и

документировали при помощи микроскопа Nikon Eclipse 80i и цифровой камеры Nikon DS-U2 (Nikon, Токио, Япония).

Полуколичественная оценка гистологических срезов

Фотографии окрашенных гистологических срезов, полученные при увеличении $\times 40$ (~ 100 полей на один срез) анализировали двойным слепым методом. Для полуколичественной оценки срезов использовали шкалу от 0 до 3 (таблица 2.2).

Таблица 2.2 - Полуколичественная гистологическая балльная система

Оцениваемые параметры	Оценка/среднее количество на 100 полей обзора			
	0	1	2	3
	Легкие			
Макрофаги	0	≤ 8000	≤ 8500	≤ 9000
Лимфоциты	0	≤ 500	≤ 1000	≤ 2000
Полиморфоядерные лейкоциты	0	≤ 100	≤ 250	≤ 500
	Печень			
Гранулемы	0	≤ 50	≤ 100	≤ 150
Макрофаги	0	≤ 1000	≤ 2000	≤ 3000
Лимфоциты	0	≤ 500	≤ 1000	≤ 1500
Полиморфоядерные лейкоциты	0	≤ 500	≤ 1000	≤ 1500

2.7 Статистические методы

Анализ всех экспериментальных данных проводили с использованием программы GraphPad Prism версии 8.0.1 для Windows (GraphPad Software, Ла-Хойя, США). Данные о выживаемости животных анализировали с использованием непараметрического статистического критерия Гехана-Бреслоу-Уилкоксона. Значения индекса роста и S_{\max} культур штаммов *M. tuberculosis* сравнивали с использованием непарного t-критерия Стьюдента. Статистический анализ между группами в экспериментах по оценке бактериальной обсемененности органов животных проводили с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни или дисперсионного анализа ANOVA. Баллы по полуколичественной гистологической шкале суммировали для статистического сравнения. Для оценки значимости различий использовали непарный t-критерий Уэлча. Эксперименты повторяли не менее 3 раз. Относительные уровни транскрипции изучаемых генов мышинных цитокинов в клетках легких мышей линии C57BL/6 рассчитывали методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [168]. Представленность транскриптов малых некодирующих РНК в клетках *M. tuberculosis* рассчитывали методом математического моделирования для количественной ПЦР в реальном времени [221]. Различия при $p \leq 0,05$ считали значимыми.

Глава 3. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ И ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГИПЕРВИРУЛЕНТНОГО ШТАММА *Mycobacterium* *tuberculosis* РОСТОВ

Штамм *M. tuberculosis* Ростов был выделен из образца мокроты, полученной от 35-летнего мужчины, госпитализированного в Южном федеральном округе России в ноябре 2013 г. и депонирован в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск» (В-7601) (таблица 2.1).

3.1 Культурально-морфологические и биохимические свойства

Штамм *M. tuberculosis* Ростов формировал сухие морщинистые колонии цвета слоновой кости на средах Левенштейна–Йенсена и Финна 2, а на среде Middlebrook 7H10 - более плоские и светлые колонии. В мазках, окрашенных по Цилю–Нильсену, были выявлены мелкие палочки, окрашенные в красный цвет, расположенные под углом друг к другу и в виде скоплений. Видовая идентификация с помощью технологии MALDI показала принадлежность выделенного штамма к *M. tuberculosis* с уровнем достоверности 1,5–1,7.

Показано, что штамм *M. tuberculosis* Ростов характеризовался более быстрым размножением клеток, по сравнению с референс-штаммом *M. tuberculosis* H37Rv, что определено с помощью сравнения показателей индекса роста и значений C_{max} этих штаммов. Кривая индекса роста штамма Ростов располагается существенно выше, чем кривая референс-штамма H37Rv ($p < 0,05$). Медиана показателя C_{max} штамма Ростов статистически значимо больше, чем соответствующий показатель штамма H37Rv ($p < 0,05$) (рисунок 3.1).

Штамм *M. tuberculosis* Ростов характеризовался наличием нитратредуктазной активности, а также способностью расти на среде с тиафен-карбоксихидразидом, что характерно для *M. tuberculosis*.

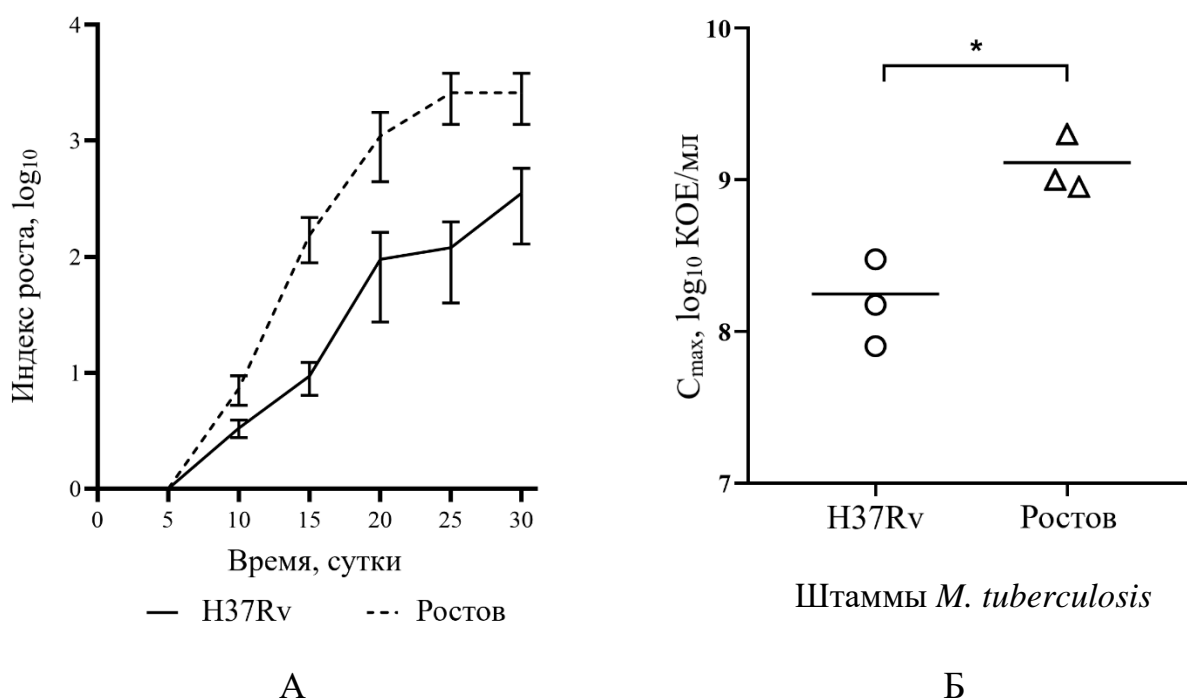


Рисунок 3.1 – Индекс роста (А) и C_{max} (Б) штаммов *M. tuberculosis* Н37Rv и Ростов в бульоне Middlebrook 7H9. * - $p < 0,05$

3.2 Чувствительность к противотуберкулезным препаратам

Выявлена устойчивость штамма Ростов к четырем противотуберкулезным препаратам 1-го ряда (изониазиду, рифампицину, стрептомицину и этамбутолу) и трем противотуберкулезным препаратам 2-го ряда (амикацину, канамицину, капреомицину) (Таблица 3.1).

Таблица 3.1 – Минимальные подавляющие концентрации противотуберкулезных препаратов и мутации в генах маркеров резистентности штамма *M. tuberculosis* Ростов

Антибиотик	МПК, мг/л	Интерпретация	Мутация в гене маркера резистентности	Аминокислотная замена
Изониазид	>1	R	<i>katG</i> (C944G)	Ser315Thr
Рифампицин	>40	R	<i>rpoB</i> (C1349T)	Ser450Leu
Стрептомицин	>10	R	<i>rpsL</i> (A128G)	Lys43Arg
Этамбутол	>5	R	<i>embB</i> (A916G)	Met306Val
Амикацин	>30	R	<i>rrs</i> (A1401G)	-
Канамицин	>30	R	<i>rrs</i> (A1401G)	-
Капреомицин	>30	R	<i>rrs</i> (A1401G)	-
Офлоксацин	≤3	S	-	-

Примечание: МПК – минимально подавляющая концентрация; R – устойчивость; S – чувствительность; *katG* – ген каталазы-пероксидазы; *rpoB* – ген β-субъединицы РНК полимеразы; *rpsL* – ген рибосомного белка S12; *embB* – ген арабинозиллиндолилацетинозитол синтазы; *rrs* – ген 16S рибосомальной РНК; А - аденин; Т – тимин; G – гуанин; С - цитозин; Ser – серин; Thr – треонин; Leu – лейцин; Lys – лизин; Arg – аргинин; Met – метионин; Val – валин

Данный фенотип резистентности ассоциирован с наличием мутаций в генах маркеров устойчивости к антитуберкулезным препаратам. Кроме того, в геноме штамма

Ростов обнаружена компенсаторная мутация в гене *rpoC* (G994A), приводящая к аминокислотной замене Gly332Ser. На этом основании данный штамм отнесен к категории *M. tuberculosis* с пред-широкой лекарственной устойчивостью (пред-ШЛУ).

3.3 Генотипирование штамма *M. tuberculosis* Ростов

Методом сполиготипирования, основанным на анализе полиморфизма хромосомного локуса DR, штамм *M. tuberculosis* Ростов отнесен к генотипу Beijing (кластер 94-32). MIRU-VNTR типирование по 24 локусам выявило профиль 224233352644425153253823, который в международной базе данных MIRU-VNTRplus определен как 9358-25. Этот профиль наиболее близок к кластеру 94-32 и имеет отличия в двух локусах (рисунок 3.2).

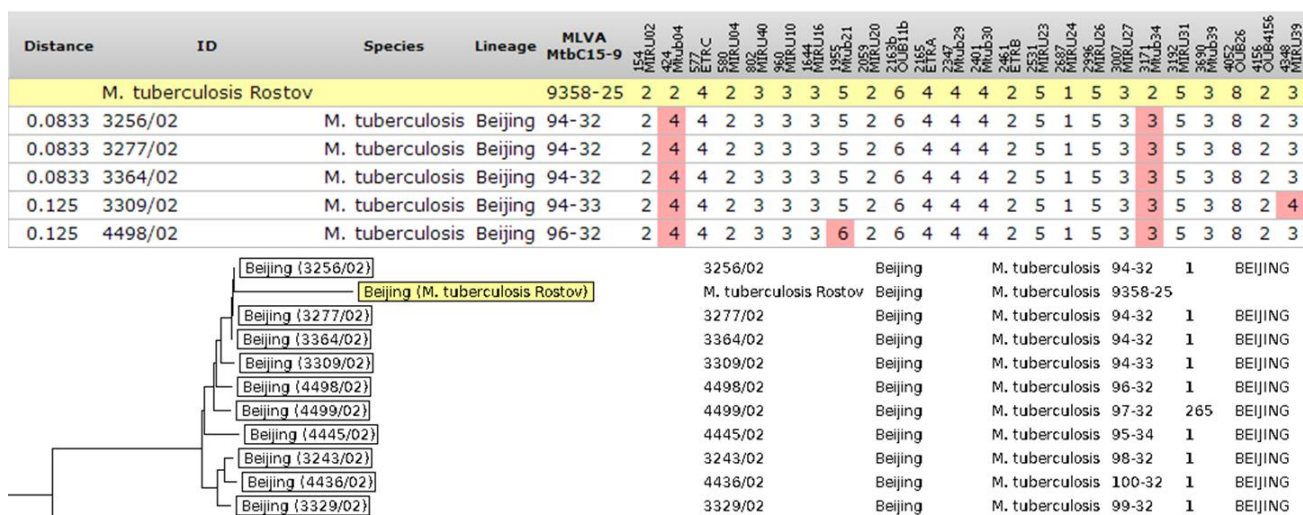


Рисунок 3.2 – Результаты MIRU-VNTR типирования штамма *M. tuberculosis* Ростов

Методом определения специфических SNPs и полногеномного секвенирования (на приборе Ion Torrent PGM) определена принадлежность штамма Ростов к кладе CAO семейства Beijing, на основании наличия в его геноме 46 мутаций, характерных для этой клады, включая 16 синонимичных, 22 значимых и 8 замен в межгенном пространстве (таблица 3.2). Геном штамма размещен в базе данных GenBank [JAAMPG000000000.1].

Таблица 3.2 – SNPs, выявленные в геноме штамма *M. tuberculosis* Ростов, определяющие его принадлежность к кладе CAO генотипа Beijing

Координаты нуклеотида в геноме	Ген	Rv номер	Нуклеотидная замена	Аминокислотная замена	Тип SNP	Покрытие
42227	ND	Rv0039c	G→A	Thr42Met	NS	23
46324	<i>leuS</i>	Rv0041	T→C	-	S	13

Продолжение таблицы 3.2

Координаты нуклеотида в геноме	Ген	Rv номер	Нуклеотидная замена	Аминокислотная замена	Тип SNP	Покрытие
139850	IGR	Rv0115-Rv0116c	T→A	-	S	17
151798	<i>pepA</i>	Rv0125	A→G	-	S	35
163467	<i>cyp138</i>	Rv0136	A→G	-	S	21
325703	<i>fadD2</i>	Rv0270	C→T	-	S	11
407167	ND	Rv0339c	C→T	Ala428Thr	NS	23
560615	<i>umaA</i>	Rv0469	A→C	Glu243Ala	NS	13
767670	IGR	Rv0668-Rv0669c	T→C	-	S	13
843909	<i>fadE9</i>	Rv0752c	A→G	Val169Ala	NS	10
1145736	<i>eno</i>	Rv1023	T→A	-	S	18
1152701	<i>kdpA</i>	Rv1029	C→T	-	S	20
1159808	IGR	Rv1034c-Rv1035c	C→T	-	S	17
1208181	ND	Rv1084	G→A	-	S	20
1257452	ND	Rv1132	T→C	Leu43Pro	NS	14
1296834	<i>lpqW</i>	Rv1166	A→C	Glu228Ala	NS	18
1419658	<i>lprA</i>	Rv1270c	C→T	Ala31Thr	NS	17
1567524	<i>metK</i>	Rv1392	G→A	Glu228Lys	NS	25
1884305	<i>pkS8</i>	Rv1662	T→G	Phe868Val	NS	21
2000234	ND	Rv1767	C→T	Ala54Val	NS	19
2062735	IGR	Rv1818c-Rv1819c	T→C	-	S	30
2107264	<i>modC</i>	Rv1859	C→T	Arg231Cys	NS	21
2149762	<i>nanT</i>	Rv1902c	G→A	-	S	12
2197921	<i>lppG</i>	Rv1946c	T→A	Ser14Cys	NS	14
2198786	ND	Rv1948c	T→G	-	S	20
2304238	<i>pkS12</i>	Rv2048c	A→G	Ser917Pro	NS	13
2321369	<i>mazF7</i>	Rv2063A	A→G	Asn105Asp	NS	19
2527575	ND	Rv2252	G→A	Gly196Asp	NS	19
2817269	<i>accD1</i>	Rv2502c	C→T	-	S	16
2915934	<i>yajC</i>	Rv2588c	T→G	Asp87Ala	NS	18
2939372	ND	Rv2611c	A→G	-	S	22
2968452	IGR	Rv2643-Rv2644c	G→A	-	S	17
2982829	ND	Rv2665	T→G	Leu44Arg	NS	17
3302980	IGR	Rv2950c-Rv2951c	T→C	-	S	13
3332110	<i>ung</i>	Rv2976c	G→A	-	S	27
3338820	<i>gpdA2</i>	Rv2982c	T→C	-	S	16
3408521	<i>nrdF2</i>	Rv3048c	G→A	-	S	14
3548984	IGR	Rv3179-Rv3180c	T→C	-	S	24
3570220	<i>uvrD2</i>	Rv3198c	T→C	Glu331Gly	NS	20
3597879	IGR	Rv3221c-Rv3221A	T→C	-	S	13
3657759	<i>fadE25</i>	Rv3274c	C→T	Gly111Ser	NS	25
3723401	<i>trpS</i>	Rv3336c	G→A	-	S	21
3777389	ND	Rv3365c	G→A	Pro38Leu	NS	21
3857226	ND	Rv3437	G→T	Asp106Tyr	NS	17
3982279	<i>fadE29</i>	Rv3543c	T→C	Ile288Val	NS	11
4224185	ND	Rv3778c	A→G	-	S	35

Примечание: ND – нет данных; «-» - отсутствие аминокислотной замены; S – синонимичная SNP; NS – значимая/несинонимичная SNP; *leuS* – ген лейцил-тРНК синтетазы; IGR – межгенное пространство; *pepA* – ген сериновой протеазы; *cyp138* – ген цитохрома P450 138; *fadD2*, *fadE25*, *fadE29* – гены КоА-лигазы жирных кислот; *umaA* – ген синтазы миколовых кислот; *fadE9* – ацил-КоА дегидрогеназы; *eno* – ген энлазы; *kdpA* – ген калий-транспортирующей АТФазы; *lpqW*, *lprA*, *lppG* – гены липопротеинов; *metK* – ген S-аденозилметионинкиназы; *pkS8*, *pkS12* – гены поликетидсинтаз; *nanT* – ген интегрального мембранного белка, транспортирующего сиаловую кислоту; *mazF7* – ген токсина MazF7; *accD1* – ген ацетил-/пропионил-КоА-карбоксилаза; *yajC* – ген фактора секреции; *ung* – ген урацил-ДНК-гликозилазы; *gpdA2* – ген глицерол-3-фосфатдегидрогеназы; *nrdF2* – ген рибонуклеозид-дифосфатредуктазы; *uvrD2* – ген АТФ-зависимой ДНК-геликазы; *trpS* – ген триптофанил-тРНК синтетазы; А - аденин; Т – тимин; G – гуанин; С -цитозин; Thr – треонин; Met – метионин; Ala – аланин; Glu – глутаминовая кислота; Val – валин; Leu – лейцин; Pro – пролин; Asn – аспарагин; Asp – аспарагиновая кислота; Lys – лизин; Phe – фенилаланин; Arg – аргинин; Cys – цистеин; Ser – серин; Gly – глицин; Tyr – тирозин; Ile – изолейцин

Принадлежность штамма Ростов к генетической кладе CAO подтверждена филогенетическим анализом (Приложение А).

3.4 Вирулентность штамма Ростов для мышей линии C57BL/6

Мышей линии C57BL/6 заражали внутривенно суспензией клеток штамма *M. tuberculosis* Ростов в дозе 5×10^6 КОЕ/животное. В качестве позитивного контроля использовали заражение вирулентным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv в той же дозе, в качестве негативного контроля – внутривенное введение такого же объема забуференного физиологического раствора (ЗФР). Каждая группа состояла из 9 мышей. Наблюдение за животными проводили в течение 90 дней после заражения (п.з.).

Динамика выживаемости и изменение массы тела животных

Гибель животных в группе мышей, зараженных штаммом Ростов, отмечалась начиная с 18 дня п.з., а в группе мышей, зараженных штаммом H37Rv – с 36 дня п.з. Все мыши, зараженные штаммом Ростов, погибли к 47 дню п.з., а ~ 56 % мышей, зараженных штаммом H37Rv, выжили в течение всех 90 дней наблюдения п.з. (рисунок 3.3).

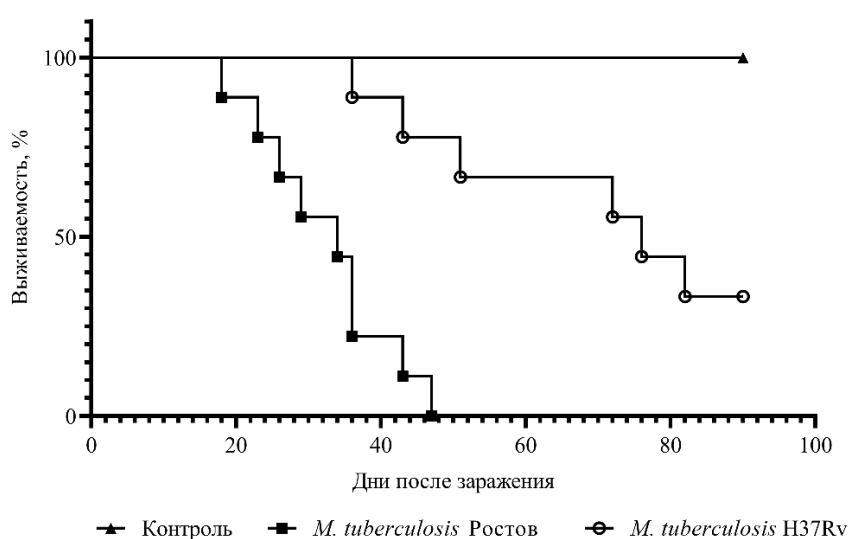


Рисунок 3.3 – Динамика выживаемости мышей линии C57BL/6, зараженных внутривенно штаммами *M. tuberculosis* Ростов и H37Rv в дозе 5×10^6 КОЕ/животное, контроль – группа животных, которым введен ЗФР

Анализ массы тела мышей, зараженных штаммами *M. tuberculosis* Ростов и H37Rv, выявил, что, начиная с 9-10 дня после внутривенного заражения, происходило снижение данного показателя, по сравнению с контролем (рисунок 3.4).

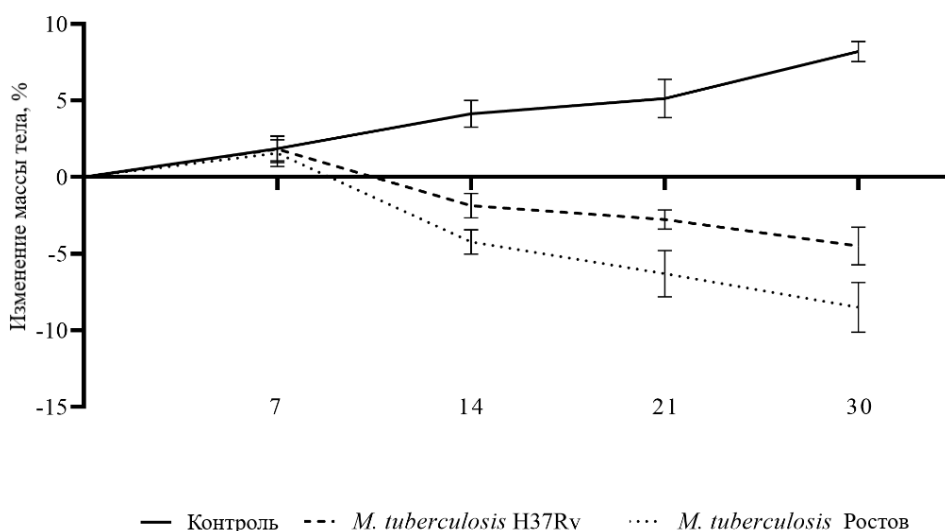




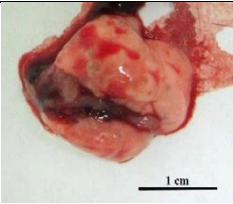
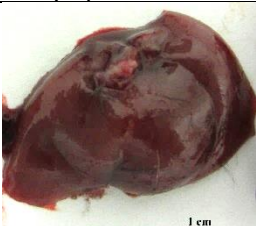
Рисунок 3.4 – Изменение массы тела мышей линии C57BL/6, зараженных внутривенно штаммами *M. tuberculosis* Ростов и H37Rv в дозе 5×10^6 КОЕ/животное

Изучение туберкулезного процесса на 30-й день после заражения

Показано, что к 30-му дню п.з. около 50 % мышей линии C57BL/6, зараженных штаммом *M. tuberculosis* Ростов, погибли, в то время как все мыши группы, зараженной штаммом *M. tuberculosis* H37Rv, были живы. Это указывает на большую тяжесть патологического процесса, вызванного штаммом *M. tuberculosis* Ростов. Различия патологических процессов подтверждались оценкой внешнего вида животных, морфологии внутренних органов и гистологических срезов паренхиматозных органов.

Внешний вид животных после заражения штаммом Ростов характеризовался крайним истощением тела и взъерошенным мехом, а внешний вид мышей после заражения штаммом H37Rv - легким истощением и гладким мехом. Легкие мышей, инфицированных штаммом Ростов, отличались от таковых у мышей, инфицированных штаммом H37Rv, увеличенным объемом и интенсивной гиперемией легких, а легкие мышей, инфицированных штаммом H37Rv, имели бледно-розовую окраску с множеством включений. Аналогичные различия отмечены в печени животных: у мышей, зараженных штаммом Ростов, печень была темно-коричневой с множественными узелками и с жировой дистрофией, а у мышей, инфицированных штаммом H37Rv, — гладкой, темно-коричневой и нормального объема (таблица 3.3).

Таблица 3.3 – Сравнительная характеристика выживаемости, внешнего вида животных и морфологии внутренних органов мышей линии C57BL/6, инфицированных штаммами *M. tuberculosis* Ростов и H37Rv

Штамм <i>M. tuberculosis</i>	Выживаемость на 30-й день п.з., %	Внешний вид мышей	Легкие	Печень
Ростов	~50	Крайнее истощение, сгорбленная спина, взъерошенный мех	 Интенсивная гиперемия, без видимых узелков	 Темно-коричневый цвет с множественными узелками, жировая дистрофия
H37Rv	100	Легкая истощенность, гладкий мех	 Бледно-розовый цвет с множественными включениями	 Гладкая поверхность, насыщенный коричневый цвет, нормальный объем

При гистологическом исследовании паренхиматозных органов мышей линии C57BL/6, инфицированных внутривенно штаммом *M. tuberculosis* H37Rv в дозе 5×10^6 КОЕ/животное, выявлена типичная для мышинных моделей ТБ картина: наличие в лёгких мелких гранулем, состоящих из многочисленных широкоплазменных МФ, между которыми выявляется небольшое количество лимфоцитов, присутствие плотных периваскулярных лимфоцитарных инфильтратов, формируемых в легких в дополнение к гранулемам; в гистологических срезах печени зафиксированы единичные инфильтраты, состоящие из нескольких лимфоцитов. Напротив, у мышей линии C57BL/6, зараженных штаммом *M. tuberculosis* Ростов, в легких имело место диффузное утолщение альвеолярных перегородок за счет повышенного количества МФ, лимфоцитарных инфильтратов не наблюдалось; в печени показано наличие узелков, состоящих из очаговых клеточных скоплений в паренхиме, клеточные инфильтраты включали в себя единичные МФ и большое количество полиморфноядерных лейкоцитов, что свидетельствует об интенсивном размножении возбудителя и усиленном развитии патологического воспалительного процесса (рисунок 3.5).

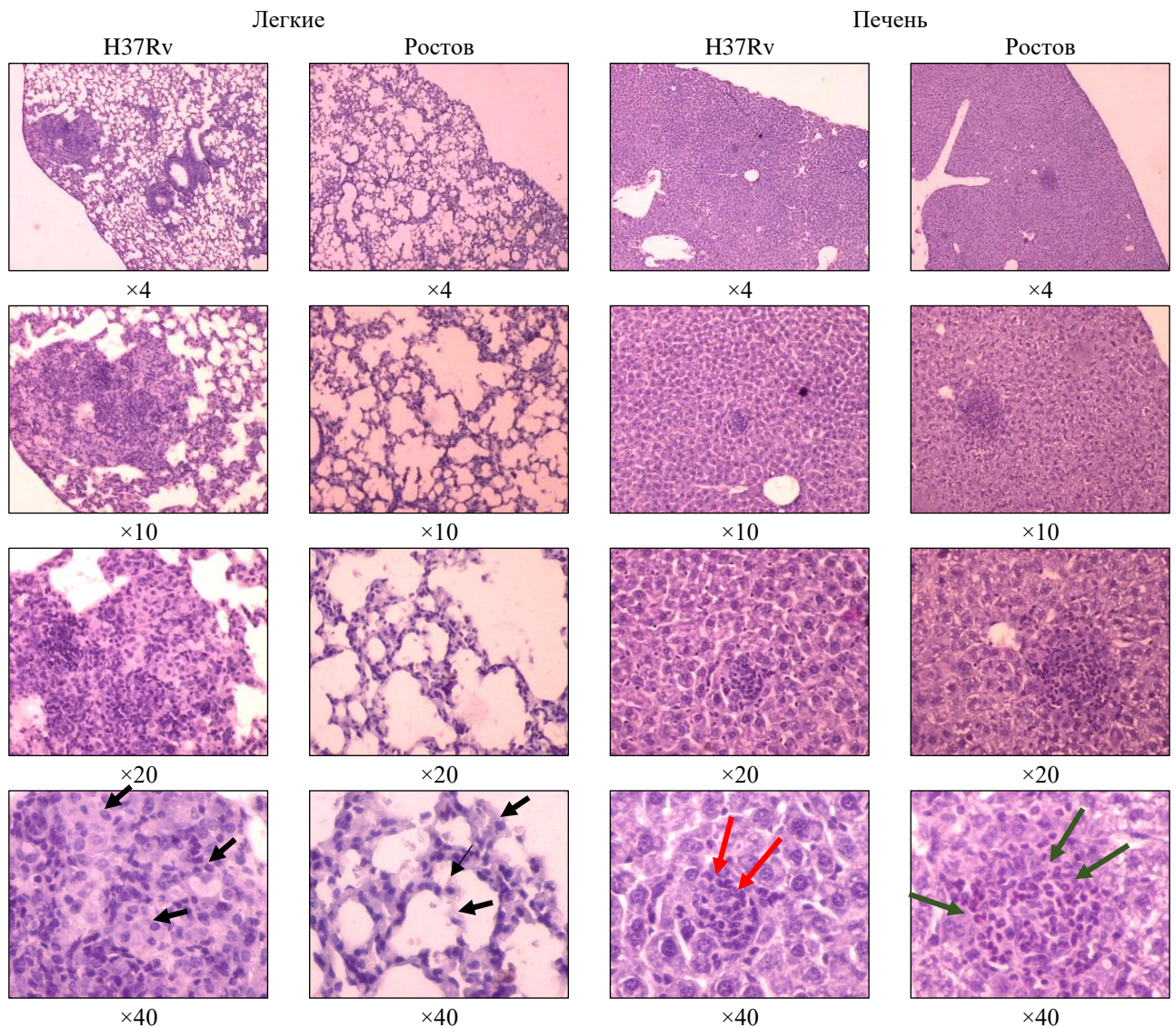


Рисунок 3.5 – Гистологические срезы легких и печени мышей линии C57BL/6 на 30-е сутки после внутривенного введения клеток штаммов *M. tuberculosis* H37Rv и Ростов в дозе 5×10^6 КОЕ/животное. Стрелками указаны МФ (черный цвет), лимфоциты (красный цвет) и полиморфноядерные лейкоциты (зеленый цвет)

Бактериальная обсемененность легких мышей, инфицированных штаммами *M. tuberculosis* H37Rv и Ростов на 30-й день п.з. составила $\sim 2,8 \times 10^5$ и $\sim 3,6 \times 10^6$ КОЕ/г, соответственно, а печени - $\sim 0,7 \times 10^5$ и $\sim 1,0 \times 10^6$ КОЕ/г. Таким образом показано, что клинический штамм Ростов более активно размножался в паренхиматозных органах мышей линии C57BL/6, по сравнению со штаммом H37Rv (рисунок 3.6).

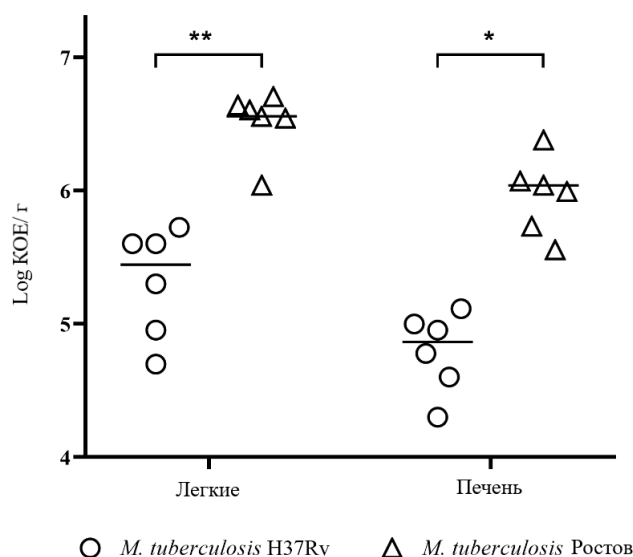


Рисунок 3.6 –Бактериальная обсемененность паренхиматозных органов мышей линии C57BL/6 на 30-й день п.з. штаммами *M. tuberculosis* H37Rv и Ростов в дозе 5×10^6 КОЕ/животное. *-значения $p \leq 0,05$; ** — значения $p \leq 0,01$

3.5 Заключение по Главе 3

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* [293]. 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.

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 *M. tuberculosis* с 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*, кодирующей β -субъединицу РНК-полимеразы (G764363A, Gly332Ser).

Компенсаторная мутация, по-видимому, определила способность штамма *M. tuberculosis* Ростов расти на искусственных питательных средах с большей скоростью, по сравнению со штаммом H37Rv, за счет компенсации негативного влияния мутаций в гене *rpoB* на фитнес микобактерий, как отмечалось ранее [72].

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 п.з. (100 % против 44 %, соответственно), внешнего вида животных и морфологии внутренних органов, а также показателей обсемененности паренхиматозных органов мышей микобактериями и гистологической картиной срезов органов. 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. Полученные данные согласуются с опубликованными ранее сведениями, что штамм H37Rv менее вирулентен по сравнению со штаммами генотипа Beijing [237].

Таким образом, показано, что штамм *M. tuberculosis* Ростов, отнесенный к категории 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.

**Глава 4. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГИПЕРВИРУЛЕНТНЫХ
ШТАММОВ *Mycobacterium tuberculosis* 267/47 И 120/26,
ПРИНАДЛЕЖАЩИХ К СУБЛИНИЯМ В0/W148 И СА0 ГЕНОТИПА BEIJING**

4.1 Клинические данные

Два клинических штамма *M. tuberculosis* 267/47 и 120/26 были выделены из мокроты двух пациентов Национального медицинского исследовательского центра фтизиопульмонологии и инфекционных болезней, Москва, Россия в 2018 г. (таблица 4.1).

Таблица 4.1 – Клинические данные по штаммам *M. tuberculosis* 267/47 и 120/26

Показатель	Пациент А	Пациент Б
Пол	Мужской	Мужской
Возраст, лет	41	36
Вредные привычки	Изредка прием алкоголя	Курение 12 лет, изредка прием алкоголя
Диагноз	Фиброзно-кавернозный инфильтративный туберкулез легких.	Инфильтративный туберкулез верхней доли левого легкого, находящийся в фазе распада, в верхней доле левого легкого выявлен округлый очаг инфильтрации 38×28 мм с полостью распада.
Хирургическое вмешательство	Лобэктомия нижней доли левого легкого; бронхоблокатор введен в бронх верхней доли правого легкого; позже - в бронх верхней доли левого легкого.	Бронхоблокатор введен в бронх верхней доли левого легкого.
Антибактериальная терапия	PZA 1,5 г; PAS 9,0 г; LZD 0,6 г; BDQ 0,1 г; CS 0,5 г	PZA 1,5 г; LVX 0,75 г; KAN 1,0 г; PTO 0,75 г; CS 0,5 г; замена KAN 1,0 г на PAS 10,0 г
Позитивная динамика терапии	Полное и частичное рассасывание очагов в обоих легких и значительное уменьшение полости распада в левом легком.	Редукция полости в верхней доле левого легкого и частичное рассасывание очагов инфильтрации; после введения бронхоблокатора отмечено уменьшение полости распада и частичное рассасывание очагов в верхней доле левого легкого.
Клинический результат	Больной выписан в удовлетворительном состоянии для продолжения лечения в противотуберкулезном учреждении по месту жительства.	Больной выписан в удовлетворительном состоянии для продолжения лечения в противотуберкулезном учреждении по месту жительства.
Штамм <i>M. tuberculosis</i>	267/47	120/26
Дата выделения	17.05.2018	18.04.2018
Устойчивость	INH, RIF, STR, EMB, AMK, KAN, CAP, OFX, PZA	INH, RIF, STR, EMB

Примечание: PZA – пиперазид; PAS - парааминосалициловая кислота; LZD – линезолид; BDQ – бедаквилин; LVX – левофлоксацин; KAN – канамицин; PTO – протионамид; CS – циклосерин; INH – изониазид; RIF -рифампицин; STR – стрептомицин; EMB – этамбутол; AMK – амикацин; CAP – капреомицин; OFX - офлоксацин

4.2 Культурально-морфологические свойства

Сравнение культуральных характеристик (индекс роста и C_{\max}) штаммов *M. tuberculosis* 267/47 и 120/26 показало, что оба клинических штамма росли медленнее, чем контрольный штамм *M. tuberculosis* H37Rv на протяжении всего периода эксперимента, $p < 0,05$. Значение C_{\max} для штаммов *M. tuberculosis* 267/47 и 120/26 было достигнуто на 25 сут, а для штамма H37Rv - на 30 сут (рисунок 4.1). Морфология бактериальных клеток клинических штаммов 267/47 и 120/26 не отличалась от таковой у штамма H37Rv.

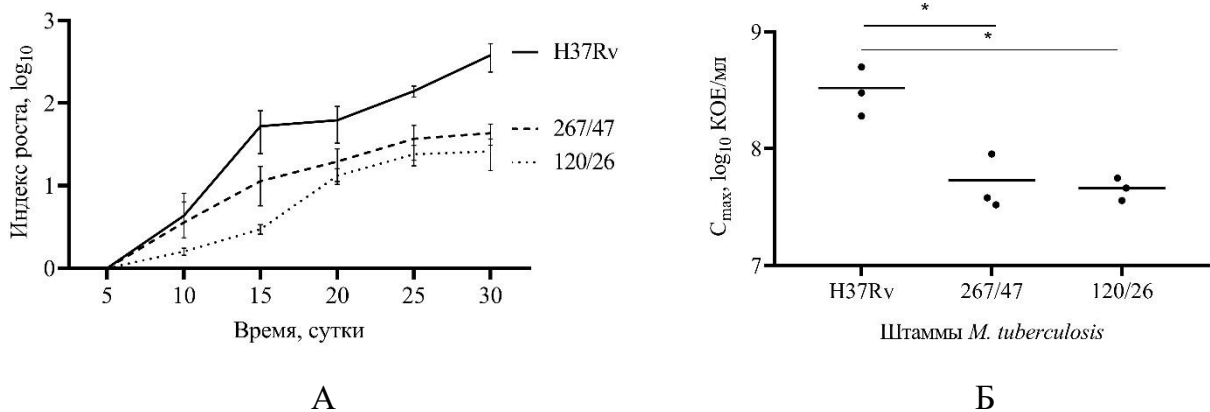


Рисунок 4.1 – Индекс роста (А) и C_{\max} (Б) штаммов *M. tuberculosis* H37Rv, 267/47 и 120/26 при выращивании в бульоне Middlebrook 7H9. * - $p < 0,05$

4.3 Фенотипы и генотипы чувствительности штаммов *M. tuberculosis* 267/47 и 120/26 к антитуберкулезным препаратам

Выявлена устойчивость штамма 267/47 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), на основании чего он отнесен к категории резистентности ШЛУ. Данный фенотип ассоциирован с наличием 6 точечных мутаций в генах антибиотикорезистентности и 2 точечных мутаций в промоторных областях генов (таблица 4.2). Кроме того, в геноме этого штамма обнаружена компенсаторная мутация в гене *proC* Gly332Ser.

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 *M. tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ). В геноме данного штамма идентифицированы 4

точечные мутации в генах антибиотикорезистентности (таблица 4.2). Кроме того, в геноме этого штамма обнаружена компенсаторная мутация в гене *rpoC* Asn698Ser.

Таблица 4.2 – Минимальные подавляющие концентрации противотуберкулезных препаратов и мутации в генах маркеров резистентности штаммов *M. tuberculosis* 267/47 и 120/26

Антибиотик	<i>M. tuberculosis</i> 267/47		<i>M. tuberculosis</i> 120/26	
	МПК, мг/л (интерпретация)	Мутация в гене маркера резистентности, аминокислотная замена, (мутация в промоторной области)	МПК, мг/л (интерпретация)	Мутация в гене маркера резистентности, аминокислотная замена
INH	>1 (R)	<i>katG</i> C944G, Ser315Thr, <i>inhA</i> (T-8A)	>1 (R)	<i>katG</i> C944G, Ser315Thr
RIF	>40 (R)	<i>rpoB</i> C1349T, Ser450Leu	>40 (R)	<i>rpoB</i> C1349T, Ser450Leu
STR	>10 (R)	<i>rpsL</i> A128G, Lys43Arg	>10 (R)	<i>rpsL</i> A128G, Lys43Arg
EMB	>5 (R)	<i>embB</i> A1490G, Gln497Arg	>5 (R)	<i>embB</i> G1217A, Gly406Asp
AMK	>30 (R)	<i>rrs</i> A1401G	<30 (S)	-
KAN	>30 (R)	<i>rrs</i> A1401G	<30 (S)	-
CAP	>30 (R)	<i>rrs</i> A1401G	<30 (S)	-
OFX	>3 (R)	<i>gyrA</i> G280A, Asp94Asn	<3 (S)	-
PZA	>1000 (R)	<i>pncA</i> (T-11C)	<1000 (S)	-

Примечание: МПК – минимальная подавляющая концентрация; R – устойчивость; S – чувствительность; INH – изониазид; RIF – рифампицин; STR – стрептомицин; EMB – этамбутол; AMK – амикацин; KAN – канамицин; CAP – капреомицин; OFX – офлоксацин; PZA – пиперазид; *katG* – ген каталазы-пероксидазы; *inhA* – 2-транс-эноил-АСР (КоА) редуктаза; *rpoB* – ген β-субъединицы РНК полимеразы; *rpsL* – ген рибосомного белка S12; *embB* – ген арабинозилндолилацетинозитол синтазы; *rrs* – ген 16S рибосомальной РНК; *gyrA* – ген субъединицы А ДНК-гиразы; *pncA* – ген пиперазидазы; А – аденин; Т – тимин; G – гуанин; С – цитозин; Ser – серин; Thr – треонин; Leu – лейцин; Lys – лизин; Arg – аргинин; Gln – глутамин; Asp – аспарагиновая кислота; Asn – аспарагин; Gly – глицин

4.4 Генотипирование штаммов *M. tuberculosis* 267/47 и 120/26

Результаты полногеномного секвенирования (на приборе MGISEQ-200RS) и филогенетический анализ показали, что штаммы 267/47 и 120/26 принадлежат к генотипу Beijing, кладам B0/W148 и CAO, соответственно (Приложения А, Б). Геномы штаммов размещены в базе данных GenBank [NZ_CP071128.1 и NZ_CP071127.1, соответственно].

В геноме штамма *M. tuberculosis* 267/47 определены 43 SNPs, специфичных для клады B0/W148, в том числе 24 синонимичных и 19 значимых замен (таблица 4.3).

Таблица 4.3 – SNPs, выявленные в геноме штамма *M. tuberculosis* 267/47, определяющие его принадлежность к кладе B0/W148 генотипа Beijing

Координаты нуклеотида в геноме	Ген	Rv номер	Нуклеотидная замена	Аминокислотная замена	Тип SNP	Покрытие
4086	<i>recF</i>	Rv0003	G→T	-	S	243
143120	<i>oxcA</i>	Rv0118c	C→A	Ala253Ser	NS	201
404130	ND	Rv0338c	T→C	Glu571Gly	NS	178
751999	<i>mkl</i>	Rv0655	C→T	-	S	186

Продолжение таблицы 4.3

Координаты нуклеотида в геноме	Ген	Rv номер	Нуклеотидная замена	Аминокислотная замена	Тип SNP	Покрытие
895164	ND	Rv0802c	G→A	-	S	218
907046	<i>pabC</i>	Rv0812	G→A	-	S	162
1035426	<i>pstS3</i>	Rv0928	T→G	Phe175Cys	NS	206
1154618	<i>kdpB</i>	Rv1030	C→T	-	S	147
1272899	ND	Rv1145	T→G	-	S	171
1584762	<i>rpe</i>	Rv1408	G→A	-	S	154
1668082	<i>ripA</i>	Rv1477	G→C	Ala365Pro	NS	179
1710601	ND	Rv1518	T→A	*320Lys	NS	231
1947325	<i>vapC12</i>	Rv1720c	T→C	His32Arg	NS	172
2078967	ND	Rv1833c	C→A	Asp275Tyr	NS	146
2132640	ND	Rv1882c	G→C	-	S	158
2267125	ND	Rv2022c	T→C	-	S	180
2335638	ND	Rv2079	T→C	Leu95Ser	NS	208
2517129	<i>fabD</i>	Rv2243	A→G	Thr115Ala	NS	172
2544135	<i>cyp128</i>	Rv2268c	A→C	Ser48Ala	NS	157
2569288	ND	Rv2298	G→C	-	S	220
2604740	ND	Rv2331A	A→G	Met1Val	NS	248
2954197	ND	Rv2627c	G→A	-	S	217
2964454	ND	Rv2638	C→T	Phe17Leu	NS	201
3014343	ND	Rv2698	C→T	-	S	166
3031090	ND	Rv2719c	G→A	Gln150*	S	202
3086731	ND	Rv2779c	A→G	-	S	230
3161858	<i>mgo</i>	Rv2852c	T→G	-	S	168
3203157	ND	Rv2893	C→T	-	S	138
3566107	ND	Rv3196	C→A	Ala107Asp	NS	125
3697016	<i>upp</i>	Rv3309c	G→C	-	S	122
4017448	ND	Rv3575c	G→A	-	S	165
4221544	ND	Rv3776	T→C	-	S	203
4221559	ND	Rv3776	T→C	-	S	161
4221565	ND	Rv3776	G→C	-	S	158
4221586	ND	Rv3776	A→G	-	S	176
4221591	ND	Rv3776	C→G	Thr168Ser	NS	210
4221609	ND	Rv3776	G→C	Ser174Thr	NS	159
4221619	ND	Rv3776	G→A	-	S	168
4338371	<i>whiB6</i>	Rv3862c	T→G	Thr51Phe	NS	167
4349982	<i>eccCb1</i>	Rv3871	G→T	Ala386Ser	NS	147
4358998	<i>espK</i>	Rv3879c	A→G	Ile262Thr	NS	88
4367633	<i>eccE2</i>	Rv3885c	T→C	Thr297Ala	NS	210
4399683	ND	Rv3910	C→G	-	S	161

Примечание: ND – нет данных; «-» - отсутствие аминокислотной замены; S – синонимичная SNP; NS – значимая/несинонимичная SNP; *recF* – ген белка генетической рекомбинации и репарации ДНК; *oxcA* – ген оксалил-КоА декарбоксилазы; *mkl* – ген ABC транспортера; *pabC* – ген аминотрансферазы; *pstS3* – ген периплазматического фосфатсвязывающего липопротеина; *kdpB* – ген β-цепи калий-транспортирующей АТФазы; *rpe* – ген белка теплового шока; *ripA* – ген пептидогликангидролазы; *vapC12* – ген токсина VapC12; *fabD* – ген трансацилазы белка-транспортера малонил-КоА-ацила; *cyp128* – ген цитохрома P450 128; *mgo* – ген малат:хинон-оксидоредуктазы; *upp* – ген урицил-фосфорибозилтрансферазы; *whiB6* – ген транскрипционного регуляторного белка; *eccCb1* – ген белка системы секреции ESX-1 типа VII; *espK* – ген белка, ассоциированного с системой секреции ESX-1; *eccE2* – ген белка системы секреции ESX-2 типа VII; A – аденин; T – тимин; G – гуанин; C – цитозин; Ala – аланин; Ser – серин; Glu – глутаминовая кислота; Gly – глицин; Phe – фенилаланин; Cys – цистеин; Pro – пролин; * – стоп-кодон; Lys – лизин; His – гистидин; Arg – аргинин; Asp – аспарагиновая кислота; Tyr – тирозин; Leu – лейцин; Thr – треонин; Met – метионин; Val – валин; Gln – глутамин; Ile – изолейцин

В геноме штамма *M. tuberculosis* 120/26 определены 46 SNPs, специфичных для клады CAO, в том числе 16 синонимичных и 22 значимых замен и 8 замен в межгеномном

пространстве (таблица 4.4).

Таблица 4.4 – SNPs, выявленные в геноме штамма *M. tuberculosis* 120/26, определяющие его принадлежность к кладе CAO генотипа Beijing

Координаты нуклеотида в геноме	Ген	Rv номер	Нуклеотидная замена	Аминокислотная замена	Тип SNP	Покрытие
42227	ND	Rv0039c	G→A	Thr42Met	NS	123
46324	<i>leuS</i>	Rv0041	T→C	-	S	168
139850	IGR	Rv0115-Rv0116c	T→A	-	S	213
151798	<i>pepA</i>	Rv0125	A→G	-	S	150
163467	<i>cyp138</i>	Rv0136	A→G	-	S	117
325703	<i>fadD2</i>	Rv0270	C→T	-	S	158
407167	ND	Rv0339c	C→T	Ala428Thr	NS	142
560615	<i>umaA</i>	Rv0469	A→C	Glu243Ala	NS	185
767670	IGR	Rv0668-Rv0669c	T→C	-	S	144
843909	<i>fadE9</i>	Rv0752c	A→G	Val169Ala	NS	144
1145736	<i>eno</i>	Rv1023	T→A	-	S	175
1152701	<i>kdpA</i>	Rv1029	C→T	-	S	172
1159808	IGR	Rv1034c-Rv1035c	C→T	-	S	82
1208181	ND	Rv1084	G→A	-	S	131
1257452	ND	Rv1132	T→C	Leu43Pro	NS	208
1296834	<i>lpqW</i>	Rv1166	A→C	Glu228Ala	NS	173
1419658	<i>lprA</i>	Rv1270c	C→T	Ala31Thr	NS	165
1567524	<i>metK</i>	Rv1392	G→A	Glu228Lys	NS	149
1884305	<i>pkс8</i>	Rv1662	T→G	Phe868Val	NS	182
2000234	ND	Rv1767	C→T	Ala54Val	NS	154
2062735	IGR	Rv1818c-Rv1819c	T→C	-	S	94
2107264	<i>modC</i>	Rv1859	C→T	Arg231Cys	NS	140
2149762	<i>nanT</i>	Rv1902c	G→A	-	S	192
2197921	<i>lppG</i>	Rv1946c	T→A	Ser14Cys	NS	169
2198786	ND	Rv1948c	T→G	-	S	305
2304238	<i>pkс12</i>	Rv2048c	A→G	Ser917Pro	NS	109
2321369	<i>mazF7</i>	Rv2063A	A→G	Asn105Asp	NS	126
2527575	ND	Rv2252	G→A	Gly196Asp	NS	180
2817269	<i>accD1</i>	Rv2502c	C→T	-	S	150
2915934	<i>yajC</i>	Rv2588c	T→G	Asp87Ala	NS	178
2939372	ND	Rv2611c	A→G	-	S	107
2968452	IGR	Rv2643-Rv2644c	G→A	-	S	180
2982829	ND	Rv2665	T→G	Leu44Arg	NS	138
3302980	IGR	Rv2950c-Rv2951c	T→C	-	S	147
3332110	<i>ung</i>	Rv2976c	G→A	-	S	145
3338820	<i>gpdA2</i>	Rv2982c	T→C	-	S	132
3408521	<i>nrdF2</i>	Rv3048c	G→A	-	S	180
3548984	IGR	Rv3179-Rv3180c	T→C	-	S	171
3570220	<i>uvrD2</i>	Rv3198c	T→C	Glu331Gly	NS	164
3597879	IGR	Rv3221c-Rv3221A	T→C	-	S	137
3657759	<i>fadE25</i>	Rv3274c	C→T	Gly111Ser	NS	149
3723401	<i>trpS</i>	Rv3336c	G→A	-	S	148
3777389	ND	Rv3365c	G→A	Pro38Leu	NS	123
3857226	ND	Rv3437	G→T	Asp106Tyr	NS	108
3982279	<i>fadE29</i>	Rv3543c	T→C	Ile288Val	NS	186
4224185	ND	Rv3778c	A→G	-	S	158

Примечание: ND – нет данных; «-» - отсутствие аминокислотной замены; S – синонимичная SNP; NS – значимая/несинонимичная SNP; *leuS* – ген лейцил-тРНК синтетазы; IGR – межгенное пространство; *pepA* – ген сериновой протеазы; *cyp138* – ген цитохрома P450 138; *fadD2*, *fadE25*, *fadE29* – гены КоА-лигазы жирных кислот; *umaA* – ген синтазы миколовых кислот; *fadE9* – ацил-КоА дегидрогеназы; *eno* – ген энлазы; *kdpA* – ген калий-транспортирующей АТФазы; *lpqW*, *lprA*, *lppG* – гены липопротеинов; *metK* – ген S-аденозилметионинкиназы; *pkс8*,

pks12 – гены поликетидсинтаз; *nanT* – ген интегрального мембранного белка, транспортирующего сиаловую кислоту; *mazF7* – ген токсина MazF7; *accD1* – ген ацетил-/пропионил-КоА-карбоксилаза; *yajC* – ген фактора секреции; *ung* – ген урацил-ДНК-гликозилазы; *gpdA2* – ген глицерол-3-фосфатдегидрогеназы; *nrdF2* – ген рибонуклеозид-дифосфатредуктазы; *uvrD2* – ген АТФ-зависимой ДНК-геликазы; *trpS* – ген триптофанил-тРНК синтетазы; А – аденин; Т – тимин; G – гуанин; С – цитозин; Thr – треонин; Met – метионин; Ala – аланин; Glu – глутаминовая кислота; Val – валин; Leu – лейцин; Pro – пролин; Asn – аспарагин; Asp – аспарагиновая кислота; Lys – лизин; Phe – фенилаланин; Arg – аргинин; Cys – цистеин; Ser – серин; Gly – глицин; Tyr – тирозин; Ile – изолейцин

Анализ категорий генов (на основании информации веб-ресурса Mycobrowser (<https://mycobrowser.epfl.ch/>)), в которых выявлены специфичные SNPs, показал, что в генетической кладе B0/W148 наибольшее количество генов связаны с клеточной стенкой и клеточными процессами, гипотетическими белками и промежуточным метаболизмом и дыханием, а в генетической кладе CAO – с клеточной стенкой и клеточными процессами и липидным метаболизмом. В генетической кладе CAO специфические SNPs обнаружены также в 8 участках межгенных пространств, а в кладе B0/W148 таковых не обнаружено (таблица 4.5).

Таблица 4.5 – Функциональные категории генов и межгенные пространства, в которых идентифицированы специфичные SNPs для клад B0/W148 или CAO генотипа Beijing

Функциональная категория	Количество генов и межгенных пространств, в которых локализованы специфичные SNPs	
	Клада B0/W148	Клада CAO
Клеточная стенка и клеточные процессы	10	10
Гипотетические белки	9	5
Пути передачи информации	1	5
Промежуточный метаболизм и дыхание	11	5
Липидный метаболизм	1	11
Регуляторные белки	3	1
Вирулентность, детоксикация и адаптация	2	1
Межгенные пространства	0	8
Всего	37	46

4.5 Вирулентность штаммов *M. tuberculosis* 267/47 и 120/26 для мышей

Выживаемость и изменение массы тела животных после заражения

Мыши линии C57BL/6, инфицированные внутривенно штаммами *M. tuberculosis* 267/47, 120/26 и H37Rv в дозе 5×10^6 КОЕ/животное начали погибать на 33-й, 22-й и 49-й день п.з., соответственно. Выживаемость мышей на 150-й день после заражения этими штаммами составила 10, 40 и 70 %, соответственно. Отмечено более ярко выраженное снижение массы тела животных с 10-го по 50-й день п.з. в группах, зараженных клиническими штаммами *M. tuberculosis* 267/47 и 120/26, по сравнению с группой животных, зараженных штаммом H37Rv. После 50-го дня п.з. масса тела животных,

зараженных штаммом 120/26, практически вернулась к исходным значениям, в то время как, масса тела животных, зараженных штаммами 267/47 и H37Rv, продолжила снижаться (рисунок 4.2).

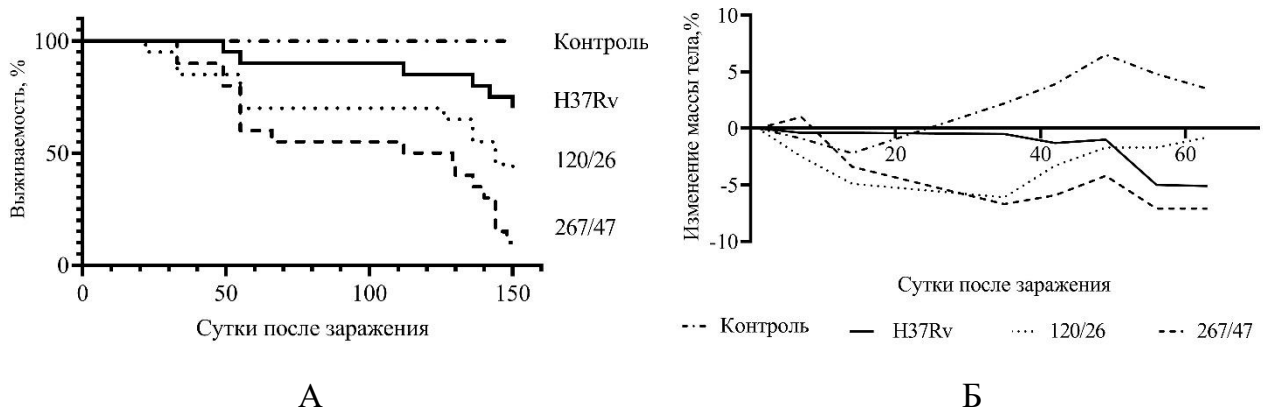


Рисунок 4.2 - Динамика выживаемости мышей линии C57BL/6, зараженных внутривенно штаммами *M. tuberculosis* 260/47, 120/26 и H37Rv в дозе 5×10^6 КОЕ/животное (А); изменение средней массы тела мышей после заражения (Б); контроль – группа животных, которым введен ЗФР

Динамика обсемененности тканей легких мышей после заражения штаммами *M. tuberculosis* 260/47, 120/26 и H37Rv

Микобактериальная нагрузка тканей легких мышей линии C57BL/6 после заражения штаммами *M. tuberculosis* 260/47, 120/26 и H37Rv увеличивалась с 14 по 60 сут во всех экспериментальных группах. На 90 сут п.з. микобактериальная нагрузка тканей легких в группах мышей, зараженных штаммами H37Rv и 120/26, снизилась до показателя обсемененности на 14 сут п.з., в отличие от аналогичного показателя в группе мышей, зараженных штаммом 267/47, который не снижался к 90 сут (рисунок 4.3).

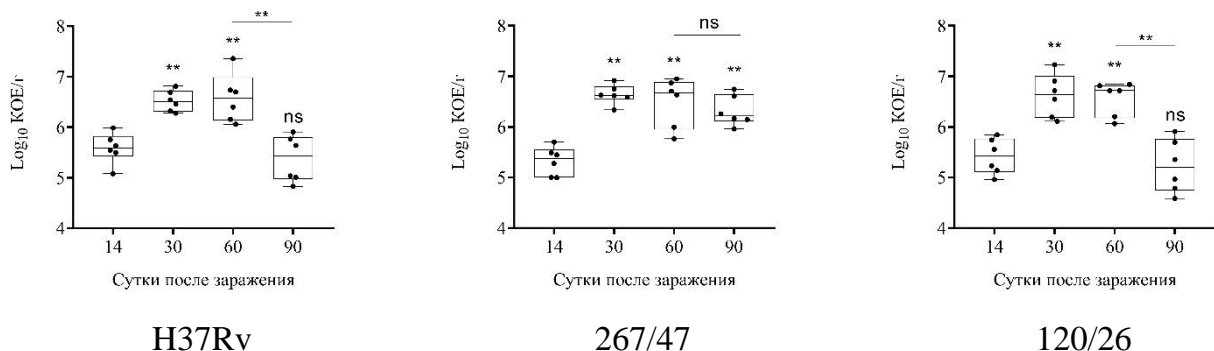


Рисунок 4.3 - Динамика микобактериальной нагрузки в тканях легких мышей линии C57BL/6, зараженных штаммами *M. tuberculosis* H37Rv, 267/47 и 120/26 в дозе 5×10^6 КОЕ/животное; ** - $p \leq 0,01$; ns - незначимые различия

Динамика обсемененности тканей селезенки мышей после заражения штаммами *M. tuberculosis* 260/47, 120/26 и H37Rv

Микобактериальная нагрузка в селезенке мышей линии C57BL/6 на 14 сут после заражения штаммами *M. tuberculosis* 260/47, 120/26 и H37Rv находилась на статистически одинаковых уровнях, затем увеличивалась до 30 сут п.з. и снижалась до 90 сут п.з. во всех группах. Однако показатель бактериальной нагрузки на 90 сут п.з. существенно различался: в группе животных, зараженных штаммом 267/47 был значительно выше, чем в группах животных, зараженных штаммами H37Rv ($p \leq 0,05$) и 120/26 ($p \leq 0,01$). (рисунок 4.4).

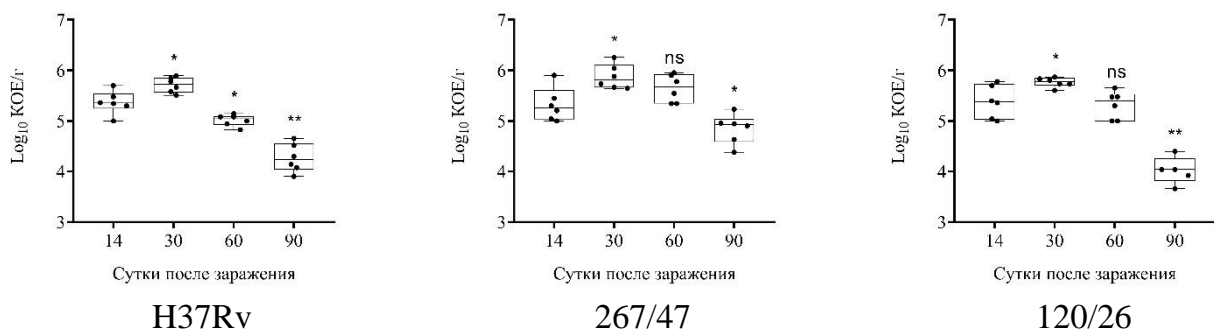


Рисунок 4.4 - Динамика микобактериальной нагрузки в тканях селезенки мышей линии C57BL/6, зараженных штаммами *M. tuberculosis* H37Rv, 267/47 и 120/26 в дозе 5×10^6 КОЕ/животное; * - $p \leq 0,05$; ** - $p \leq 0,01$; ns - незначимые различия

Динамика обсемененности тканей печени мышей после заражения штаммами *M. tuberculosis* 260/47, 120/26 и H37Rv

Динамика обсемененности тканей печени мышей линии C57BL/6 существенно различалась для трех штаммов *M. tuberculosis*. Штамм H37Rv индуцировал небольшое увеличение бактериальной нагрузки в период с 14 по 30 сут п.з., с последующим снижением к 90 сут п.з. Штамм 267/47 вызывал значительное увеличение показателя микобактериальной нагрузки с 14 по 30 сут п.з., с последующим незначительным снижением к 60 и 90 сут п.з. Напротив, бактериальная нагрузка, вызванная штаммом 120/26, не изменилась с 14 по 30 сут п.з., а затем значительно снизилась к 60 и 90 сут п.з. Примечательно, что уровень бактериальной нагрузки на 90 сут п.з., индуцированный штаммом 267/47, был значительно выше ($p \leq 0,01$), по сравнению с таковыми, вызванными штаммами H37Rv и 120/26 (рисунок 4.5).

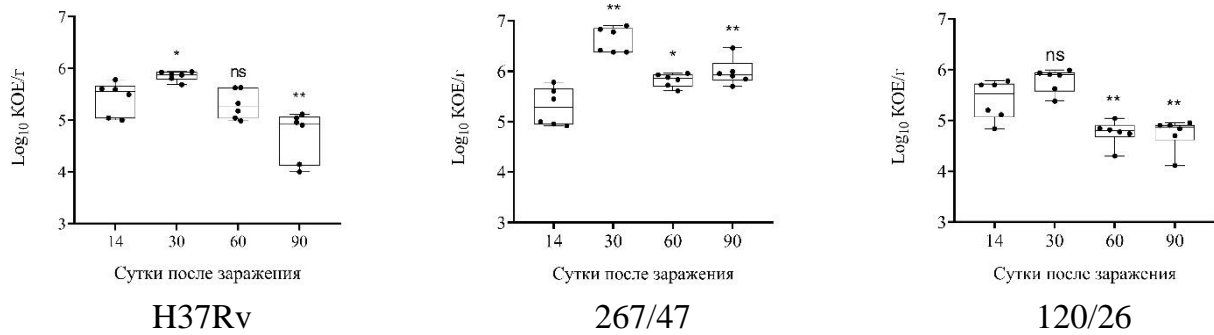


Рисунок 4.5 - Динамика микобактериальной нагрузки в тканях печени мышей линии C57BL/6, зараженных штаммами *M. tuberculosis* H37Rv, 267/47 и 120/26 в дозе 5×10^6 КОЕ/животное; * - $p \leq 0,05$; ** - $p \leq 0,01$; ns - незначимые различия

Патологические изменения в тканях легких мышей

Гистологическое исследование срезов тканей легких мышей линии C57BL/6, инфицированных внутривенно в дозе 5×10^6 КОЕ/животное штаммом *M. tuberculosis* H37Rv к 90 сут п.з., выявило типичную для мышинных моделей туберкулеза картину. Клеточный инфильтрат распространился на всю долю легкого, основными клетками инфильтрата были МФ. Отмечено уплотнение легочной ткани и исчезновение межальвеолярных перегородок. Кроме МФ в инфильтрате выявлены лимфоциты, которые образовывали крупные скопления среди МФ-инфильтрата, а также полиморфноядерные лейкоциты. Заражение штаммами *M. tuberculosis* 267/47 и 120/26 приводило к более выраженным патологическим изменениям легочной ткани к 90 сут п.з., что подтверждено результатами полуколичественной оценки гистологических срезов: 7 баллов для групп мышей, зараженных штаммами 267/47 и 120/26, и 5 баллов для группы мышей, зараженной штаммом H37Rv (рисунок 4.6, 4.7).

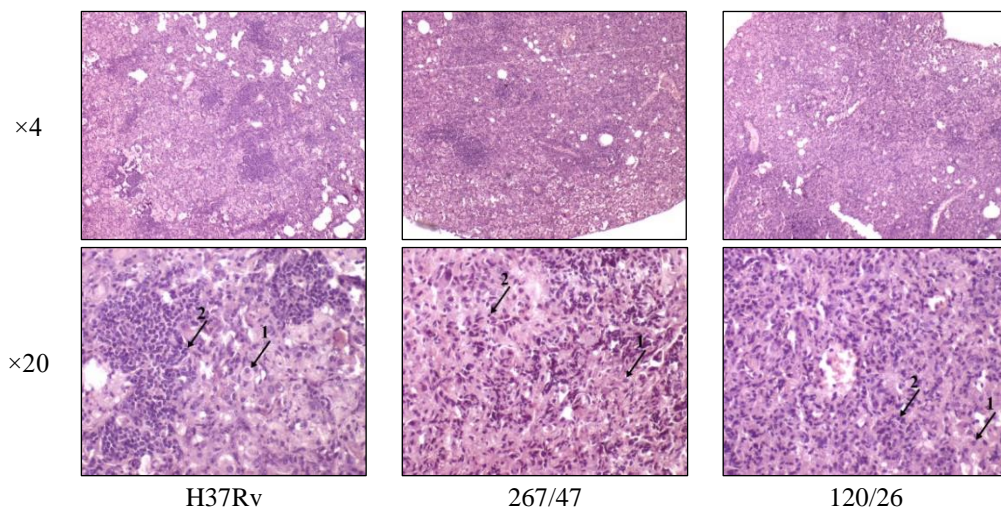


Рисунок 4.6 – Гистологические срезы тканей легких мышей линии C57BL/6 к 90 сут после внутривенного введения клеток штаммов *M. tuberculosis* H37Rv, 267/47 и 120/26. Стрелками указаны МФ (1) и лимфоциты (2)

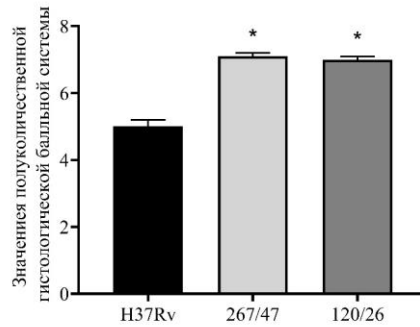


Рисунок 4.7 - Полуколичественная оценка гистологических срезов тканей легких мышей C57BL/6, зараженных штаммами *M. tuberculosis* H37Rv, 267/47 и 120/26; * - значения $p \leq 0,05$ по сравнению с группой мышей, зараженных штаммов *M. tuberculosis* H37Rv

Патологические изменения в тканях селезенки мышей

Анализ гистологической картины срезов тканей селезенки выявил многочисленные широкоплазменные МФ в красной пульпе селезенки мышей C57BL/6 к 90 сут после заражения штаммами *M. tuberculosis* H37Rv, 267/47 и 120/26, показал наличие большого количества лимфоцитов, сконцентрированных вокруг МФ, и некоторое количество полиморфноядерных лейкоцитов. Зафиксированы различия в патогистологической картине, вызванной отдельными штаммами: в белой пульпе селезенки штамм H37Rv генерировал формирование очаговых плотных скоплений широкоплазменных МФ, окруженных множеством лимфоцитов, в то время как, штамм 267/47 вызывал значительное уменьшение площади белой пульпы до отдельных мелких скоплений лимфоцитов, а штамм 120/26 индуцировал образование одиночных скоплений широкоплазменных МФ (рисунок 4.8).

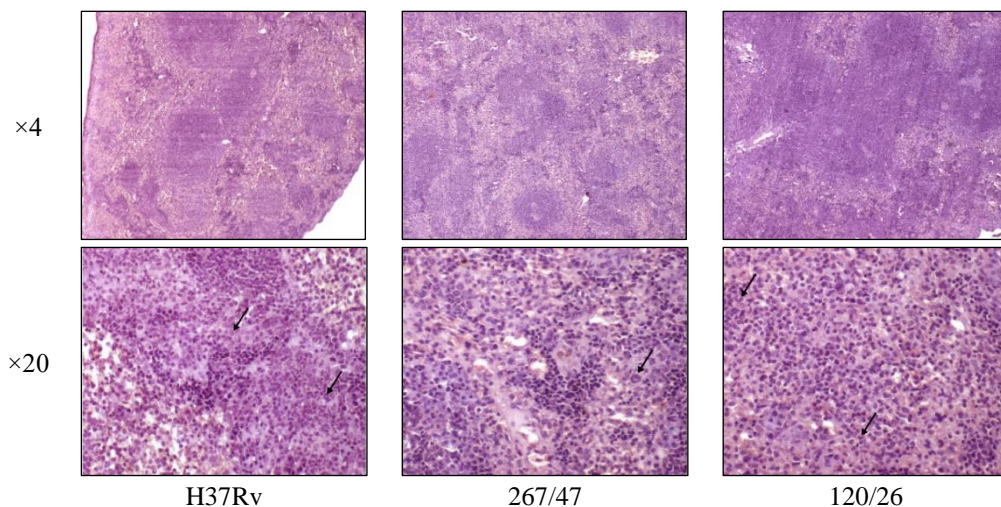


Рисунок 4.8 – Гистологические срезы тканей селезенки мышей линии C57BL/6 к 90 сут после внутривенного введения клеток штаммов *M. tuberculosis* H37Rv, 267/47 и 120/26. Стрелками указаны полиморфноядерные лейкоциты

Патологические изменения в тканях печени мышей

Ткани печени мышей линии C57BL/6, инфицированных штаммами *M. tuberculosis* H37Rv и 120/26, к 90 сут п.з. характеризовались меньшим количеством гранулем, по сравнению с данным показателем, для штамма 267/47. Гранулемы, сформированные в печеночной ткани в результате заражения тремя штаммами различались по клеточному составу: количество МФ в образцах от животных, зараженных штаммами 267/47 и 120/26 было значительно выше, чем в образцах от животных, зараженных штаммом H37Rv; количество лимфоцитов было достоверно выше в гранулемах, генерированных штаммом 120/26, а полиморфноядерные лейкоциты были идентифицированы в большем количестве в гранулемах, ассоциированных со штаммом 267/47 (рисунок 4.9).

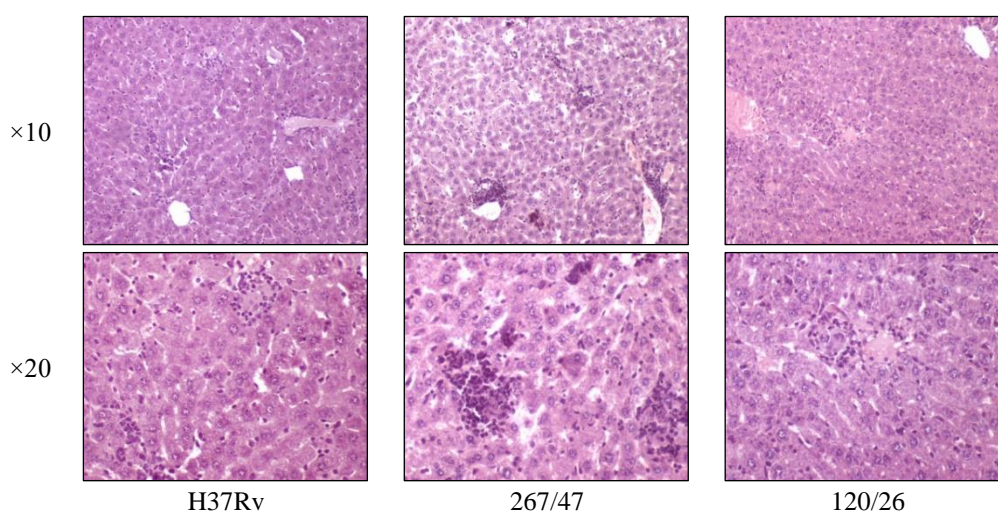


Рисунок 4.9 – Гистологические срезы тканей печени мышей линии C57BL/6 к 90 сут после внутривенного введения клеток штаммов *M. tuberculosis* H37Rv, 267/47 и 120/26. Стрелками указаны полиморфноядерные лейкоциты

Большая выраженность, патологических изменений в печени экспериментальных животных, вызванных клиническими штаммами *M. tuberculosis* 267/47 и 120/26, подтверждена результатами полуколичественной оценки гистологических срезов: 11 баллов (*M. tuberculosis* 267/47), 8 баллов (*M. tuberculosis* 120/26) и 5 баллов (*M. tuberculosis* H37Rv) (рисунок 4.10).

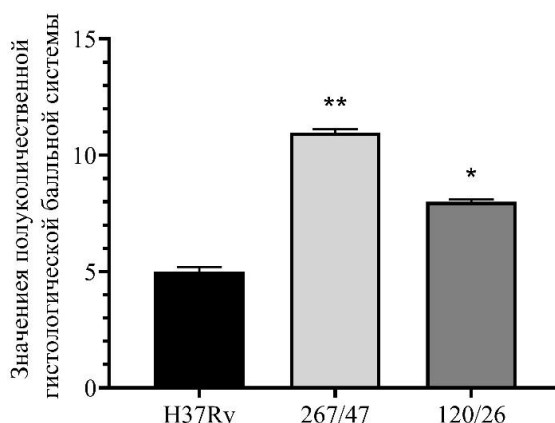


Рисунок 4.10 - Полуколичественная оценка гистологических срезов тканей печени мышей C57BL/6, зараженных штаммами *M. tuberculosis* H37Rv, 267/47 и 120/26; ** - значения $p \leq 0,01$; * - значения $p \leq 0,05$ по сравнению с группой мышей, зараженных штаммов *M. tuberculosis* H37Rv

4.6 Анализ ответа иммунной системы мышей на туберкулезную инфекцию на основании оценки изменения цитокинового профиля

Создание набора праймеров для количественной ПЦР с целью изучения представленности мРНК цитокинов мышей

Перечень генов-мишеней для детекции цитокинов, хемокинов и факторов роста мышей был выбран на основании анализа научной литературы по оценке иммунного ответа мышей на инфекционные агенты, а также учитывая набор детектируемых цитокинов в коммерческой иммунологической тест-системе MILLIPLEX MAP Mouse Cytokine/Chemokin (Merck, Дармштадт, Германия). Праймеры подобраны на последовательности изучаемых генов, размещенных в базе данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Размер амплифицируемых участков генов рассчитан в пределах 50-200 п.о. Специфичность нарабатываемых ПЦР-продуктов подтверждали с помощью анализа кривых плавления и секвенирования по Сэнгеру. Результаты экспрессии генов цитокинов, хемокинов и факторов роста нормализовали по экспрессии генов *GAPDH* и *ACTB* (таблица 4.6).

Таблица 4.6 – Специфичные праймеры для определения представленности транскриптов генов цитокинов, хемокинов и факторов роста мыши *Mus musculus*

Ген	Ссылка на ген в базе GenBank	Последовательности олигонуклеотидных праймеров (5'→3')		Размер ПЦР-продукта, п.о.
		Forward	Reverse	
<i>GAPDH</i>	NM_001289726.1	ggtgaaggtcgggtggaacggatt	aaggggtcgttgatggcaacaat	102
<i>ACTB</i>	NM_007393.5	tgacgatatcgctgctgctgg	ccacgatggaggggaataca	101
<i>Ifn-γ</i>	NM_008337.4	tcttcagcaacagcaaggcgaaa	tccgctcctgaggctggatt	147

Продолжение таблицы 4.6

Ген	Ссылка на ген в базе GenBank	Последовательности олигонуклеотидных праймеров (5'→3')		Размер ПЦР-продукта, п.о.
		Forward	Reverse	
<i>Tnf-α</i>	Y00467.1	cagaactccaggcggcgctcat	tgagtgtgagggtctgggccata	169
<i>Il-1α</i>	NM_010554.4	tgttctgaaggagtgccagaaa	ccgactttgtctttgggtgcaat	149
<i>Il-1β</i>	NM_008361.4	tctttgaagttgacggacccaaa	ggacagcccaggccaagggtt	65
<i>Il-6</i>	NM_031168.2	ttcctctgcaagagactt	ggagtggatctctgtgaa	116
<i>Il-7</i>	NM_008371.5	atgtccatgtttcttttagata	caaggatcagtgagggaatt	52
<i>Il-10</i>	NM_010548.2	cactgctatgctgcctgctcta	cgactgggaagtgggtgcagtat	93
<i>Il-12(p35)</i>	NM_008351.3	cacctcagttggccagggtcatt	cagcaggttccgggactggctaa	72
<i>Il-12(p40)</i>	NM_001303244.1	tctgctgctccacaagaaggaaaa	cacgtgaaccgtccggagtaattt	114
<i>Il-13</i>	NM_008355.3	cagtcctggctcttctgctt	gatgttgcicagctcctcaa	110
<i>Il-15</i>	NM_008357.3	ctgaggctggcattcatgtctca	ccagttggcctctgtttaggga	72
<i>Il-17</i>	NM_010552.3	gctacagtgaaggcagcagcgat	tggagctcacttttgcgcaa	130
<i>Mx1</i>	AH002046.3	ggagaaggtgcccctgtatt	ttcctgaaactctggtcccaat	111
<i>IFI44</i>	NM_133871.3	ctcgtttgacatggcagcaagaaa	gccctttcaggtacatgccaat	191
<i>Cxcl2</i>	NM_009140.2	ggccagtgaactgcgctgcaaa	ggcgtcacactcaagctctggat	81
<i>Cxcl5</i>	NM_009141.3	gcccgcctggcatttctgtt	tgaggaagggcagcttcagcta	66
<i>Cxcl9</i>	NM_008599.4	cgctgttcttttcccttgggcat	tggggcaaaactgtttgaggtctt	151
<i>Cxcl10</i>	NM_021274.2	atgaaccaagtgtcgcctcat	cccgtcatcgataggatgcagtt	114
<i>Ccl2</i>	NM_011333.3	accagcagcaggtgtcccaaa	tccttctggggtcagcacag	80
<i>Ccl3</i>	NM_011337.2	tctccaccactgcccttctgtt	tggaaacttccgctgtaggagaa	122
<i>Ccl4</i>	NM_013652.2	cgtgtctgccctctctctctt	tcagagccattggtgctgagaa	75
<i>Ccl5</i>	AL596122.14	atctctgcagctgccctcacat	agggagtgtgtccgagccata	91
<i>Ccl11</i>	NM_011330.3	tgagagctccacagcgttctat	tgggaggtgaaggaagtaccgt	58
<i>Csf1</i>	NM_007778.4	gctggcttggcttgggatgatt	tggcactgcctgggtcctctat	94
<i>Csf2</i>	NM_009969.4	tggaaagcatgtagaggccatcaa	aggcgggtctgcacacatgta	131
<i>Vegf</i>	NM_009505.4	ggtgcactggaccctggcttta	gcttcgctgtagacatccatgaa	127

Примечание: *GAPDH* – ген глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы; *ACTB* – ген бета-актина; *Ifn-γ* – ген интерферона-гамма; *Tnf-α* – ген фактора некроза опухоли-альфа; *Il-1α* – ген интерлейкина 1-альфа; *Il-1β* – ген интерлейкина 1-бета; *Il-6* – ген интерлейкина 6; *Il-7* – ген интерлейкина 7; *Il-10* – ген интерлейкина 10; *Il-12(p35)* – ген интерлейкина 12 субъединицы p35; *Il-12(p40)* – ген интерлейкина 12 субъединицы p40; *Il-13* – ген интерлейкина 13; *Il-15* – ген интерлейкина 15; *Il-17* – ген интерлейкина 17; *Mx1* – ген интерферон-индуцированного GTP-связывающего белка Mx1; *IFI44* – ген интерферон-индуцированного белка 44; *Cxcl2* – ген хемокина семейства СХС лиганд 2; *Cxcl5* – ген хемокина семейства СХС лиганд 5; *Cxcl9* – ген хемокина семейства СХС лиганд 9; *Cxcl10* – ген хемокина семейства СХС лиганд 10; *Ccl2* – ген хемокина семейства СС лиганд 2; *Ccl3* – ген хемокина семейства СС лиганд 3; *Ccl4* – ген хемокина семейства СС лиганд 4; *Ccl5* – ген хемокина семейства СС лиганд 5; *Ccl11* – ген хемокина семейства СС лиганд 11; *Csf1* – ген рецептора гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора; *Csf2* – ген гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора; *Vegf* – ген фактора роста эндотелия сосудов

Изменение цитокинового профиля в тканях легких мышей после заражения штаммами *M. tuberculosis*

Для изучения иммунного ответа мышей линии C57BL/6 на туберкулезную инфекцию, вызванную клиническими штаммами *M. tuberculosis* 267/47 (группа 267/47) и 120/26 (группа 120/26) и референс-штаммом H37Rv (группа H37Rv), оценивали паттерны экспрессии генов провоспалительных (n=10), интерферон-ассоциированных (n=7) и противовоспалительных цитокинов (n=3), а также хемокинов (n=6) и факторов роста (n=4).

Показано, что все три штамма индуцировали увеличение экспрессии генов

провоспалительных цитокинов (*Ifn-γ*, *Il-1β*, *Il-12(p35)*, *Il-12(p40)* и *Il-15*), интерферон-ассоциированных цитокинов (*Mx1*, *Cxcl9*, *Csf2* и *Ccl5*), хемокинов (*Ccl5*, *Ccl11*, *Cxcl5* и *Cxcl10*) и факторов роста (*Csf1*, *Csf2* и *Vegf*), а *Tnf-α* не изменился в течение наблюдаемого периода для всех изученных штаммов, по сравнению с соответствующими уровнями экспрессии генов в легких незараженных мышей.

Различия в уровнях экспрессии генов цитокинов, генерируемых штаммами *M. tuberculosis* H37Rv, 267/47 и 120/26, были следующими: у для мышей, зараженных штаммом H37Rv, гены *Il-1α*, *Ccl2*, *IFI-44*, *Il-6* и *Il-13* постоянно экспрессировались на повышенном уровне с 30 по 90 сут п.з., в то время как у мышей, зараженных штаммами 267/47 и 120/26, уровни экспрессии генов *Il-1α*, *IFI-44* и *Ccl2* снижались на 60 или 90 сут п.з. Уровень представленности транскриптов гена *Il-6* был снижен на 60 сут п.з. у мышей, зараженных штаммом 267/47, и повышен к 90 сут п.з. у мышей, зараженных штаммом 120/26. Уровень экспрессии гена *Il-13* был снижен на 60 и 90 сут п.з. в группе 267/47 и на 30 сут п.з. – в группе 120/26. Экспрессия гена *Il-10* была повышена на 30 и 60 сут в группах H37Rv и 267/47, но не изменялась по сравнению с исходным уровнем в группе 120/26. Уровни экспрессии генов *Il-7* и *Ccl4* не изменялись в течение всего периода наблюдения в группе H37Rv, но экспрессия гена *Il-7* снижалась на 60 сут п.з. в группе 267/47 и повышалась на 30 и 60 сут п.з. в группе 120/26, а экспрессия гена *Ccl4* снижалась на 30 сут п.з. в обеих группах 267/47 и 120/26. Представленность транскриптов гена *Il-17* незначительно снижалась на 30 сут п.з. и незначительно повышалась на 90 сут п.з. в группе H37Rv, но существенно повышалась на 60 сут п.з. и снижалась на 90 сут п.з. в группе 267/47, и слабо повышалась на 30 сут. п.з. и снижалась на 60 и 90 сут п.з. в группе 120/26. Экспрессия генов цитокинов *Cxcl2* и *Ccl3* была снижена в период с 30 по 90 сут п.з. в группе H37Rv и в период с 30 по 60 сут п.з. в группе 267/47, в то время как в группе 120/26 экспрессия гена *Cxcl2* была снижена на 30 сут п.з., а гена *Ccl3* – снижена в период с 30 по 60 сут п.з. (рисунок 4.11).

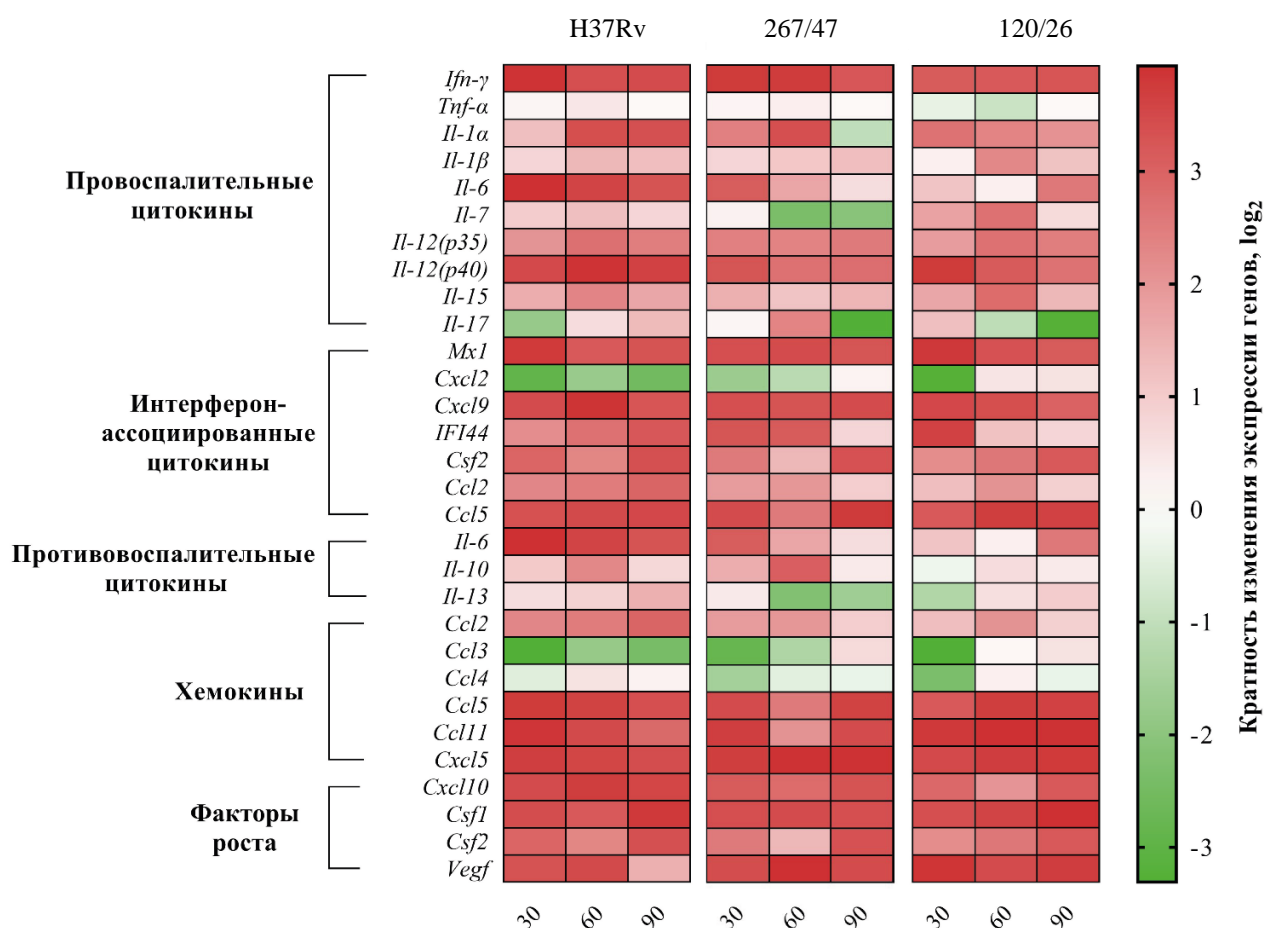


Рисунок 4.11 – Тепловая карта изменений уровней экспрессии генов цитокинов, хемокинов и факторов роста в легких мышей линии C57BL/6 на 30, 60 и 90 сут после заражения штаммами *M. tuberculosis* H37Rv, 267/47 и 120/26. Значения каждой клетки представляют собой \log_2 значений кратных изменений экспрессии генов, по сравнению, с таковыми у неинфицированных мышей (значения кратных изменений экспрессии генов от -1 до +1 являются статистически незначимыми)

4.7 Заключение по Главе 4

Клинические штаммы *M. tuberculosis* 267/47 и 120/26, выделенные от пациентов с туберкулезом легких в г. Москва в 2018 г., по результатам полногеномного секвенирования и филогенетического анализа отнесены к генотипу Beijing, кладам B0/W148 (43 специфичных SNPs) и CAO (46 специфичных SNPs), соответственно. Штамм *M. tuberculosis* 267/47 близко кластеризуется с ранее описанным в работе Беспятовых Ю.А. с соавт., 2019 [35] штаммом *M. tuberculosis* RUS_B0, выделенным в 2008 г. (Приложение Б), а штамм *M. tuberculosis* 120/26 – с описанным в Главе 3 штаммом *M. tuberculosis* Ростов, выделенным в 2013 г. на Юге России (Приложение А).

Оба изучаемых клинических штамма характеризовались меньшей скоростью роста на искусственных питательных средах, по сравнению с контрольным штаммом

M. tuberculosis H37Rv. В случае штамма 267/47 данное свойство соотносится с ростовыми характеристиками штамма RUS_B0, а в случае штамма 120/26 отличается от таковых штамма Ростов, что может быть объяснено в первом случае наличием одинаковых компенсаторных мутаций в гене *rpoC* (Gly332Ser), а во втором случае – разных компенсаторных мутаций в гене *rpoC* (Asn698Ser и Gly332Ser).

Штамм *M. tuberculosis* 267/47 отнесен к категории *M. tuberculosis* с пред-ШЛУ, на основании его устойчивости к пяти противотуберкулезным препаратам 1-го ряда (изониазиду, рифампицину, стрептомицину, этамбутолу и пипразинамиду) 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 *M. tuberculosis* с 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 5×10^6 КОЕ/животное, соответственно. Динамика бактериальной обсемененности паренхиматозных органов (легкие, селезенка и печень) у мышей линии C57BL/6, генерируемая штаммом 267/47, указывала на более вирулентный потенциал штамма 267/47, принадлежащего к кладе B0/W148, по сравнению с таковыми штаммов 120/26 и H37Rv. 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, на что указывают результаты полуколичественной гистологической оценки.

Сравнительный анализ изменений уровней транскриптов генов цитокинов, хемокинов и факторов роста в тканях легких мышей линии C57BL/6, инфицированных клиническими штаммами *M. tuberculosis* и контрольным штаммом, выявил различия в этих показателях. Показано, что уровень экспрессии гена цитокина IL-1 α , 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 α и/или IL-1 β может сопровождаться неконтролируемым ростом микобактерий *in vivo* и воспалением легких у мышей [48]. 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 [171]. 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 [132]. 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- γ вызвать эрадикацию возбудителя [198]. 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 [208]. 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 [104]. 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 [231]. 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 [195].

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.

Глава 5. «РАННИЙ» ОТВЕТ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ МАЛЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК *Mycobacterium tuberculosis* НА ИЗМЕНЕНИЕ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *IN VITRO*

5.1 Дизайн праймеров, специфичных для генов мРНК *M. tuberculosis*

Перечень генов-мишеней для определения уровней представленности транскриптов мРНК (n=10), локализованных в межгенных пространствах генома *M. tuberculosis*, был выбран на основании изучения научной литературы по результатам сравнительного транскриптомного анализа штамма *M. tuberculosis* H37Rv в разных физиологических состояниях [139]. Праймеры подобраны на последовательности изучаемых генов, представленных в базе данных Mycobrowser (<https://mycobrowser.epfl.ch/>). Размер амплифицируемых участков генов рассчитан в пределах 49-151 п.о. Специфичность нарабатываемых ПЦР-продуктов подтверждали с помощью анализа кривых плавления и секвенирования по Сэнгеру. Результаты экспрессии генов мРНК нормализовали по экспрессии гена *rrs* (16S рРНК) (таблица 5.1).

Таблица 5.1 – Специфичные праймеры для определения представленности транскриптов генов мРНК *M. tuberculosis*

Ген	Ссылка на ген в базе Mycobrowser	Последовательности олигонуклеотидных праймеров (5'→3')		Размер ПЦР-продукта, п.о.
		Forward	Reverse	
<i>rrs</i>	MTV000019	tacgtaggggtgcgagcgttg	cccgcacgctcacagtaag	104
MTS0997/Mcr11	MTV000063	gcaggcccggtagtgaccaat	tacacatgggcagaccggc	121
MTS1338/Drrs	MTV000077	tgatctgcccgaagtgcctgg	aggatgaggatctgcccgaagg	99
MTS2823/Ms1	MTV000078	cgcgagtcacatgccacgataa	aagcgtgcactctgggggt	151
B11/C6	MTV000058	ggccatagccgaggggtatca	aggcgagggctcgtcgtcat	61
Mpr5	MTV000061	cagcgggggatggcgatgt	gcactcacgcaccacgacct	65
Mcr3	MTV000064	ccattgccggattgtatta	agttctcaacaacacgctt	77
Mcr15	MTV000065	acatggcacaaccgggaatcttt	catgactggtgtgactctcgaaaa	86
Mcr7	MTV000067	gcgccatctgcatttctgt	cgatgtcgtagacggccgcg	80
Mpr11	MTV000068	gatgcagtcgacggaaccg	taaccacctgcgacccttg	51
Mpr18	MTV000071	cccgaggaacaccaggtcgc	agtctcgtgccttctgc	49

5.2 Анализ структуры и возможных мишеней мРНК *in silico*

С помощью веб-ресурса NUPACK (<http://www.nupack.org/>) рассчитана вторичная структура мРНК при температуре 37 °С, соответствующей температуре существования *M. tuberculosis* в организме хозяина и температуре культивирования *in vitro* при моделировании стрессовых условий (рисунок 5.1).

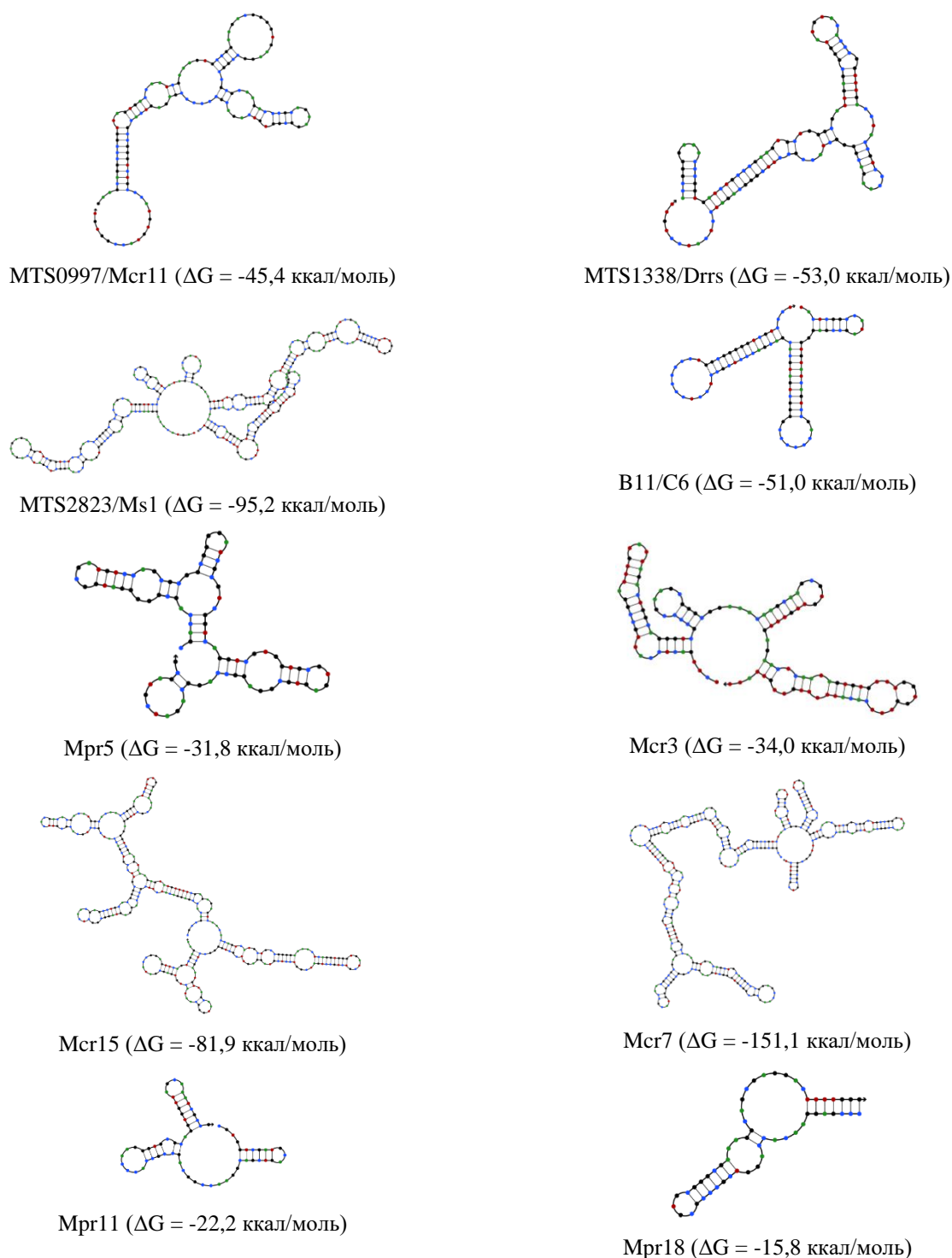


Рисунок 5.1 – Вторичная структура мнРНК, рассчитанная с помощью веб-ресурса NUPACK (<http://www.nupack.org/>) при температуре 37 °С: зеленый цвет – аденин; синий цвет – цитозин; черный цвет – гуанин; красный цвет – урацил; ΔG - свободная энергия Гиббса

Изучаемые мнРНК различаются по размеру (55-350 нуклеотидов) и локализации их генов. Гипотетические наиболее вероятные мишени мнРНК предсказаны с помощью программы CopraRNA (<https://rna.informatik.uni-freiburg.de>) (таблица 5.2).

Таблица 5.2 – Гипотетические мишени мРНК в транскриптоме *M. tuberculosis* H37Rv, рассчитанные с помощью веб-ресурса CopraRNA

мРНК	Мишень			Связь		
	Локус	Ген	Продукт	мРНК	мРНК	ΔG , ккал/моль
MTS0997/ Mcr11	Rv2166c	<i>mraZ</i>	транскрипционный регулятор	22-72	4-48	-16.2
	Rv1282c	<i>oppC</i>	пермеаза	44-155	3-129	-22.2
	Rv1963c	<i>mce3R</i>	транскрипционный репрессор	76-137	5-61	-20.6
	Rv0267	<i>narU</i>	белок экскреции нитритов	51-108	4-62	-19.5
	Rv1623c	<i>cydA</i>	убихинолоксидаза	3-94	3-91	-14.7
MTS1338/ Drrs	Rv1326c	<i>glgB</i>	гликогеновый фермент	86-119	29-69	-14.3
	Rv0009	<i>ppiA</i>	железо-зависимый циклофилин	14-42	38-69	-14.8
	Rv0957	<i>purH</i>	белок биосинтеза пуринов	196-205	107-116	-11.2
	Rv3663c	<i>dppD</i>	белок транспортер	131-147	36-55	-9.1
	Rv2447c	<i>folC</i>	фолилполиглутаматсинтаза	124-155	35-64	-8.4
MTS2823/ Ms1	Rv1030	<i>kdpB</i>	K-транспортирующая АТФаза	56-116	194-258	-20.4
	Rv2156c	<i>murX</i>	трансфераза	201-259	60-119	-22.1
	Rv1218c	N/A	белок транспортер	238-284	231-280	-23.1
	Rv1649	<i>pheS</i>	тРНК-лигаза	217-255	194-240	-18.4
	Rv2640c	-	транскрипционный регулятор	148-287	62-196	-27.5
B11/C6	Rv1307	<i>atpH</i>	АТФ-синтаза	242-254	2-14	-10.8
	Rv2166c	<i>mraZ</i>	транскрипционный регулятор	282-289	32-39	-14.9
Mpr5	Rv0946c	<i>pgi</i>	глюкозо-6-фосфатизомераза	162-241	7-90	-26.3
	Rv3063	<i>cstA</i>	белок углеродного голодания А	41-132	1-86	-25.9
	Rv3056	<i>dinP</i>	ДНК-полимераза IV 2	15-85	26-89	-28.1
	Rv1479	<i>moxR1</i>	транскрипционный регулятор	26-98	7-90	-29.4
	Rv3674c	<i>nth</i>	эндонуклеаза III	196-279	11-86	-26.7
Mcr3	Rv2500c	<i>fadE19</i>	ацил-КоА дегидрогеназа	82-191	1-121	-17.3
	Rv3082c	<i>virS</i>	транскрипционный регулятор	284-300	46-61	-10.5
	Rv0415	<i>thiO</i>	оксидоредуктаза	253-281	43-72	-15.1
	Rv3846	<i>sodA</i>	супероксиддисмутаза	6-21	90-105	-11.6
	Rv3150	<i>nuoF</i>	НАДН-хинооксидоредуктаза	54-99	3-59	-18.8
Mcr15	Rv3154	<i>nuoJ</i>	НАДН-хинооксидоредуктаза	20-98	28-111	-16.6
	Rv2756c	<i>hsdM</i>	ДНК-метилаза	83-230	1-140	-23.8
	Rv3396c	<i>guaA</i>	ГМФ-синтаза	26-62	81-111	-16.3
	Rv3331	<i>sugI</i>	транспортер сахаров	3-151	20-164	-20.3
	Rv3846	<i>sodA</i>	супероксиддисмутаза	229-256	263-289	-18.4
Mcr7	Rv2093c	<i>tatC</i>	трансмембранный белок	123-154	138-162	-16.1
	Rv2094c	<i>tatA</i>	трансмембранный белок	227-299	7-76	-20.8
	Rv2839c	<i>infB</i>	фактор инициации трансляции	186-210	158-182	-15.3
	Rv0013	<i>trpG</i>	антранилатсинтаза	6-53	55-101	-23.7
	Rv1895	-	цинк-связывающая алкогольдегидрогеназа	203-245	52-94	-21.5
Mpr11	Rv3282	-	нуклеозидтрифосфатпирофосфатаза	80-131	23-67	-20.5
	Rv0194	-	белок транспортер	202-255	1-50	-22.8
	Rv0803	<i>purL</i>	фосфорибозилформилглицинамидинс интаза	202-232	2-29	-17.7
	Rv2477c	<i>ettA</i>	энергозависимый белок трансляции	19-44	1-28	-12.2
	Rv2678c	<i>hemE</i>	уропорфириногендекарбоксилаза	251-291	2-49	-17.6
Mpr18	Rv0084	<i>hycD</i>	формиагидрогеназа	226-274	2-47	-20.1
	Rv1023	<i>eno</i>	энолаза	135-179	2-46	-28.2
	Rv2334	<i>cysK1</i>	О-ацетилсеринсульфгидрилаза	19-59	7-47	-25.1
	Rv0934	<i>pstS1</i>	липопротеин	5-58	3-55	-19.9
	Rv2701c	<i>suhB</i>	инозитол-1-монофосфатаза	251-260	37-46	-16.3

5.3 Транскрипционный ответ генов мРНК *M. tuberculosis* на стрессы, моделирующие условия в фагосомах макрофагов

«Осмотический» стресс

«Ранний» транскрипционный ответ клеток штамма *M. tuberculosis* H37Rv на «осмотический» стресс, вызванный культивированием в дистиллированной воде через 2 ч, заключался в увеличении представленности транскриптов генов мРНК, по сравнению с контролем: MTS0997/Mcr11, B11/C6, Mpr5, Mcr15, и Mpr11 и в снижении транскриптов генов мРНК: MTS2823/Ms1 и Mpr18. Для большинства генов отмечено снижение экспрессии через 15 и 24 ч инкубирования в стрессовых условиях: MTS0997/Mcr11, B11/C6, Mpr5, Mcr3, Mcr15, Mcr7, Mpr11 и Mpr18, однако для двух генов (MTS1338/Drrs и MTS2823/Ms1) отмечено увеличение экспрессии (рисунок 5.2).

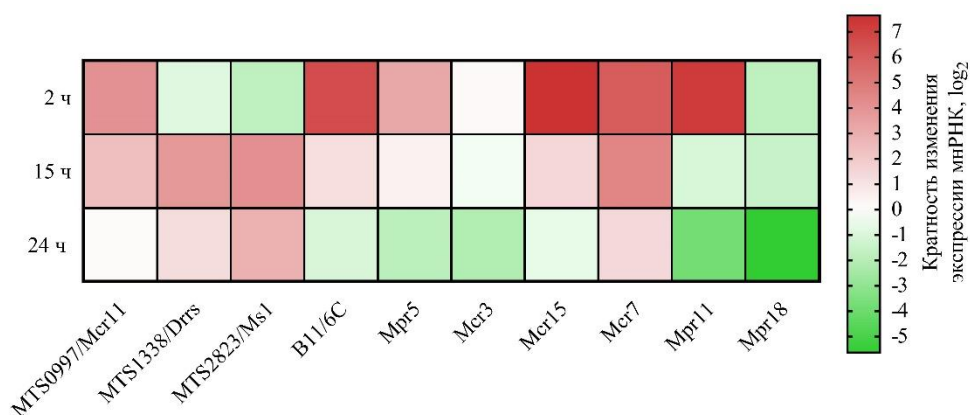


Рисунок 5.2 - Тепловая карта изменений уровней экспрессии генов мРНК в клетках *M. tuberculosis* H37Rv при культивировании в дистиллированной воде, моделирующем осмотический стресс в фагосомах МФ, через 2, 15 и 24 ч. Значения каждой клетки представляют собой \log_2 значений кратных изменений экспрессии генов, по сравнению с контролем. Значения кратных изменений экспрессии генов от -1 до +1 являются статистически незначимыми

«Голодание»

«Голодание», характерное для выживания клеток возбудителя туберкулеза в фагосомах эукариотических клеток, моделировали с помощью культивирования клеток в супернатанте стационарной культуры *M. tuberculosis* H37Rv. Зафиксировано увеличение уровней представленности транскриптов через 2 ч культивирования в стрессовых условиях для 2 генов мРНК (Mpr5 и Mcr3) и снижение – для 2 генов (MTS1338/Drrs и Mpr11). Интересно, что «голодание» вызвало активацию большего количества ($n=5$) генов через 15 ч: MTS0997/Mcr11, Mcr15, Mcr7, Mpr11 и Mpr18 и инактивацию 2 генов: Mpr5 и Mcr3. На 24 ч инкубирования в условиях «голодания» транскрипция практически всех

генов снизилась, за исключением гена MTS2823/Ms1, который не изменял уровня транскрипции в течение всего периода наблюдения, по сравнению с контролем (рисунок 5.3).

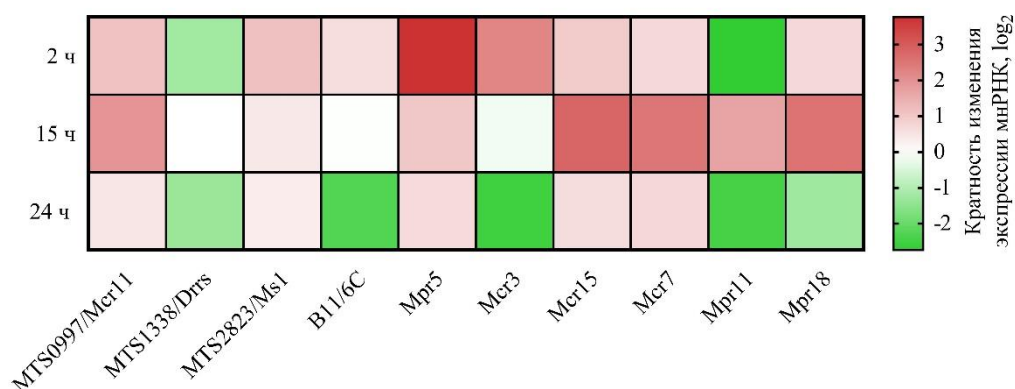


Рисунок 5.3 - Тепловая карта изменений уровней экспрессии генов мРНК в клетках *M. tuberculosis* H37Rv при культивировании в супернатанте стационарной культуры *M. tuberculosis* H37Rv, моделирующем недостаток питательных веществ в фагосомах МФ, через 2, 15 и 24 ч. Значения каждой клетки представляют собой \log_2 значений кратных изменений экспрессии генов, по сравнению с контролем. Значения кратных изменений экспрессии генов от -1 до +1 являются статистически незначимыми

Гипоксический стресс

Показан «ранний» транскрипционный ответ (2 ч) клеток штамма *M. tuberculosis* H37Rv на гипоксический стресс, моделированный культивированием в бескислородных условиях: увеличение транскрипции для 4 генов мРНК (MTS2823/Ms1, Mcr3, Mcr15 и Mcr7) и снижение для 2 генов (Mpr11 и Mpr18). Дальнейшее продолжение культивирования в условиях гипоксического стресса приводило к угнетению транскрипции практически всех изучаемых генов мРНК, кроме MTS2823/Ms1, который через 15 ч транскрибировался на повышенном уровне, по сравнению с контролем (рисунок 5.4).

«Кислотный» стресс

Культивирование клеток *M. tuberculosis* H37Rv в питательной среде с pH=5,4, моделирующей среду внутри фагосом МФ, приводило через 2 ч к индукции транскрипции двух генов мРНК (Mpr5 и Mcr7) и подавлению транскрипции двух генов мРНК (Mpr11 и Mpr18). Дальнейшее культивирование в условиях «кислотного» стресса существенно не влияло на уровни экспрессии всех изучаемых генов мРНК (рисунок 5.5).

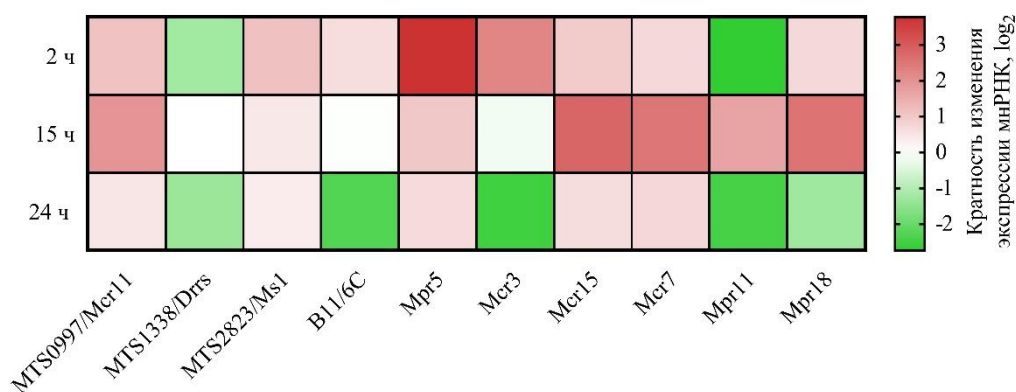


Рисунок 5.4 - Тепловая карта изменений уровней экспрессии генов мРНК в клетках *M. tuberculosis* H37Rv при культивировании в бескислородных условиях, моделирующих гипоксию в фагосомах МФ, через 2, 15 и 24 ч. Значения каждой клетки представляют собой \log_2 значений кратных изменений экспрессии генов, по сравнению с контролем. Значения кратных изменений экспрессии генов от -1 до +1 являются статистически незначимыми

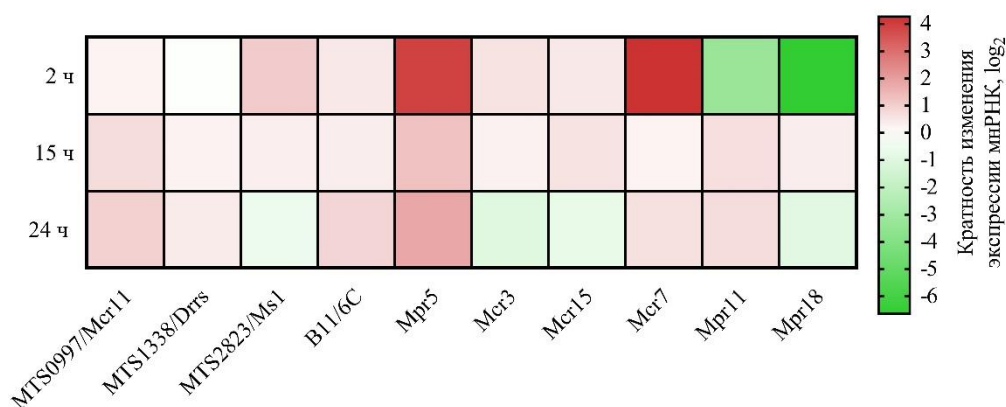


Рисунок 5.5 - Тепловая карта изменений уровней экспрессии генов мРНК в клетках *M. tuberculosis* H37Rv при культивировании в кислотных условиях, моделирующих агрессивную среду в фагосомах МФ, через 2, 15 и 24 ч. Значения каждой клетки представляют собой \log_2 значений кратных изменений экспрессии генов, по сравнению с контролем. Значения кратных изменений экспрессии генов от -1 до +1 являются статистически незначимыми

Оксидативный стресс, вызванный H_2O_2

Экспрессия генов мРНК при культивировании в питательных средах с концентрациями H_2O_2 от 0,5 до 5 mM в течение 40 мин увеличивалась, по сравнению с контролем, для большинства изучаемых генов мРНК: MTS0997/Mcr11, MTS1338/Drrs, B11/6C, Mcr15, Mpr11 и Mpr18. Для одного гена (Mcr7) отмечено существенное снижение транскрипции в данных стрессовых условиях (рисунок 5.6).

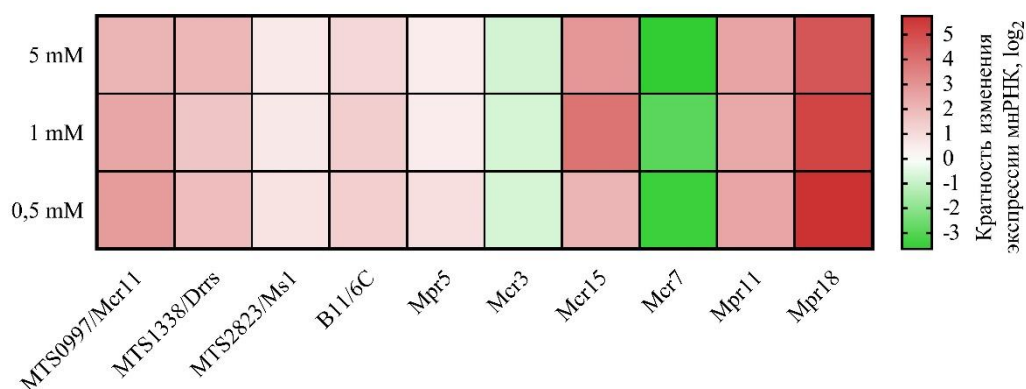


Рисунок 5.6 - Тепловая карта изменений уровней экспрессии генов мРНК в клетках *M. tuberculosis* H37Rv при культивировании в течение 40 мин в условиях оксидативного стресса, вызванного H_2O_2 , моделирующего стрессовые условия в фагосомах МФ. Значения каждой клетки представляют собой \log_2 значений кратных изменений экспрессии генов, по сравнению с контролем. Значения кратных изменений экспрессии генов от -1 до +1 являются статистически незначимыми

Оксидативный стресс, вызванный NO

В отличие от влияния H_2O_2 , оксидативный стресс, вызванный NO, активировал экспрессию только одного гена мРНК (MTS1338/Drrs) при всех использованных концентрациях и подавлял экспрессию 6 генов мРНК (Mpr5, Mcr3, Mcr15, Mcr7, Mpr11 и Mpr18) (рисунок 5.7).

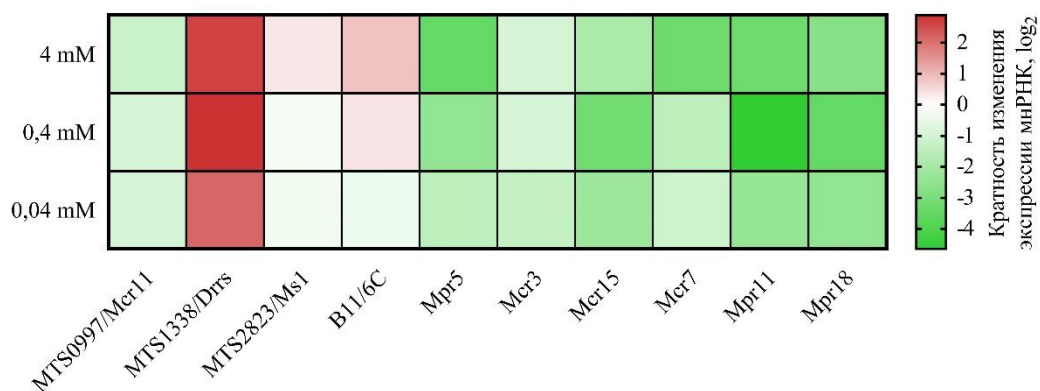


Рисунок 5.7 - Тепловая карта изменений уровней экспрессии генов мРНК в клетках *M. tuberculosis* H37Rv при культивировании в течение 40 мин в условиях оксидативного стресса, вызванного NO, моделирующего стрессовые условия в фагосомах МФ. Значения каждой клетки представляют собой \log_2 значений кратных изменений экспрессии генов, по сравнению с контролем. Значения кратных изменений экспрессии генов от -1 до +1 являются статистически незначимыми

5.9 Заключение по Главе 5

Выявлены различия в характере экспрессионного ответа генов мнРНК штамма *M. tuberculosis* H37Rv: 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 и 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 оксидативных (H₂O₂ 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 H₂O₂ 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 - у 5 генов (Mpr5, Mcr15, Mcr7, Mpr11 и Mpr18) (таблица 5.3).

Таблица 5.3 – 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	Стресс, вызывающий изменение экспрессии генов мнРНК					
			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_PGERS41	■	■	■	■	■	■
Mpr11	2881252-2881320 (+)	Rv2560-Rv2561	■	■	■	■	■	■
Mpr18	4093468-4093522 (+)	Rv3651-PE_PGERS60	■	■	■	■	■	■

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 H₂O₂ 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 [76]. Новизной данной работы является исследование «раннего» ответа экспрессии 6 генов мРНК: 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 H₂O₂ 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 H₂O₂ и NO стрессов. Представленность транскриптов Mpr11 увеличивалась в условиях «осмотического» и оксидативного H₂O₂ стрессов, а транскриптов Mpr18 - в условиях «голодания» и оксидативного H₂O₂ стресса, в условиях остальных стрессов эти мРНК транскрибировались на пониженном уровне, чем в контроле. Полученные данные позволяют высказать предположение о важности перечисленных выше мРНК в обеспечении адаптационных возможностей туберкулезного микроба в стрессовых условиях.

Глава 6. ОЦЕНКА ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТА «ПОЛИАНТИГЕННАЯ ВАКЦИНА ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ВСПОМОГАТЕЛЬНОГО ЛЕЧЕНИЯ ТУБЕРКУЛЕЗА ЛТБВАК» НА ЖИВОТНЫХ МОДЕЛЯХ

6.1 Профилактическая эффективность на модели острой туберкулезной инфекции у мышей линии C57BL/6

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, вызванной аэрозольным заражением штаммом *M. tuberculosis* H37Rv в дозе 50-100 КОЕ/животное, как описано в разделе 2.5.3. Было показано, что данная модель адекватно отображает патогенез туберкулезной инфекции у мышей. В качестве препарата сравнения использовали кандидатную противотуберкулезную БЦЖ-бустерную субъединичную рекомбинантную вакцину «ГамТБвак», эффективность которой была доказана ранее [294]. Контролями в данном эксперименте служили группы животных, не подвергавшихся иммунизации противотуберкулезными вакцинами «БЦЖ», «ЛТБвак» и «ГамТБвак», а также обработанные адьювантом, который используется в составе препарата «ЛТБвак» (СРG-олигонуклеотид и мурамилдипептид, иммобилизованные на частицах носителя PLGA, сополимера молочной и гликолевой кислот). Критериями оценки патологического процесса у зараженных мышей служили следующие показатели: динамика выживаемости животных в течение эксперимента, патоморфология и микробная нагрузка в паренхиматозных органах.

Схема эксперимента включала следующие этапы: (1) - подкожная иммунизация мышей вакциной «БЦЖ» в дозе 5×10^6 КОЕ/животное; (2) – первая (подкожная) иммунизация препаратом «ЛТБвак» в дозе 5 мкг/животное на 3 неделе эксперимента; (3) – вторая (интраназальная) иммунизация препаратом «ЛТБвак» в дозе 5 мкг/животное на 5 неделе эксперимента; (4) – аэрозольное заражение вирулентным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv в дозе 100 КОЕ/животное на 10 неделе эксперимента; (5) – эвтаназия на 11, 15, 19 и 35 неделях эксперимента (рисунок 6.1, таблица 6.1).

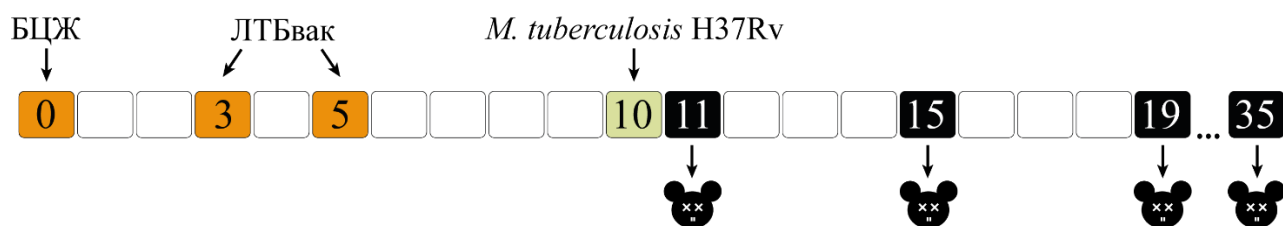


Рисунок 6.1 – Схема эксперимента по оценке протективности препарата «ЛТБвак» на модели острой туберкулезной инфекции у мышей линии C57BL/6. Арабскими цифрами обозначены недели после начала эксперимента; оранжевый цвет – иммунизация; фиштакшковый цвет – заражение; черный цвет - эвтаназия

Таблица 6.1 – Группы мышей линии C57BL/6 и дозы иммунизации в эксперименте по оценке протективности препарата «ЛТБвак»

Группа	Кол-во мышей, шт.	Подкожная иммунизация живым вакцинным штаммом «БЦЖ», 0 неделя, КОЕ/мышь	Первая иммунизация (подкожная), 3 неделя, мкг/мышь	Вторая иммунизация (интраназальная), 5 неделя, мкг/мышь
«Контроль»	40	0,9 % NaCl	0,9 % NaCl	0,9 % NaCl
«Адьювант»	40	0,9 % NaCl	«Адьювант»	«Адьювант»
«БЦЖ»	40	5×10^6	0,9 % NaCl	0,9 % NaCl
«ГамТБвак»	40	5×10^6	«ГамТБвак», 10	«ГамТБвак», 10
«ЛТБвак»	40	5×10^6	«ЛТБвак», 5	«ЛТБвак», 5

Примечание: «Контроль» - группа мышей, которым вместо вакцины «БЦЖ» и бустерных вакцин вводили равный объем 0,9 % NaCl; «БЦЖ» - группа мышей, иммунизированных вакциной «БЦЖ», которым вместо бустерных вакцин вводили равный объем 0,9 % NaCl; «Адьювант» - группа мышей, которым вместо вакцины «БЦЖ» вводили равный объем 0,9 % NaCl, а вместо прототипов вакцин – адьювант препарата «ЛТБвак»; «ГамТБвак» - группа мышей, иммунизированных вакциной «БЦЖ» и кандидатной бустерной вакциной «ГамТБвак» в дозе 10 мкг/мышь; «ЛТБвак» - группа мышей, иммунизированных вакциной «БЦЖ» и препаратом «ЛТБвак» в дозе 5 мкг/мышь

Выживаемость мышей

За период наблюдения (35 недель) в группах «БЦЖ», «ГамТБвак», «ЛТБвак» выжило 100 % животных, в группе «Контроль» - 45 %, а в группе «Адьювант» - 36 % (рисунок 6.2).

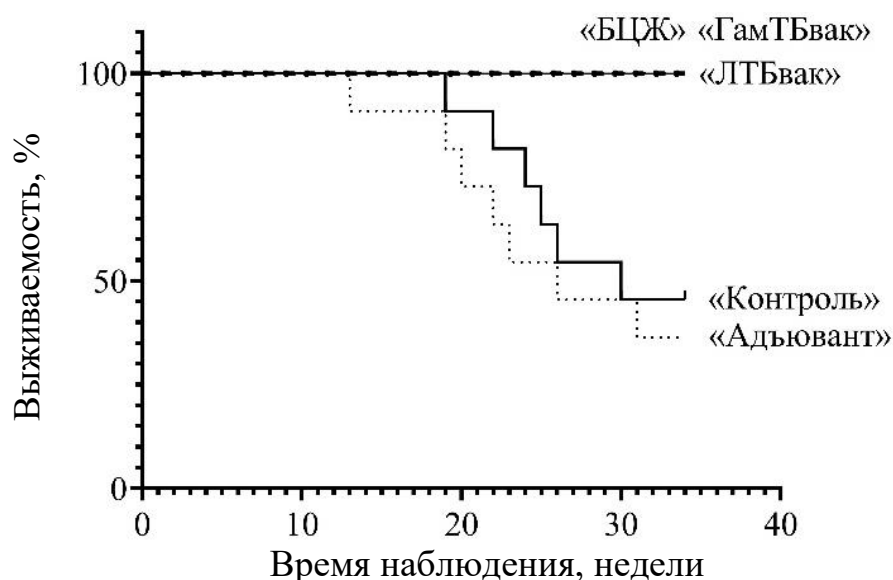


Рисунок 6.2 – Динамика выживаемости мышей линии C57BL/6 после заражения штаммом *M. tuberculosis* H37Rv в эксперименте по оценке протективной активности препарата «ЛТБвак»

Патологические изменения легких и селезенки мышей

Оценка патологических изменений внутренних органов при вскрытии зараженных животных на 1, 15, 19 и 35 неделях после начала эксперимента показала, что в группах животных «Контроль» и «Адьювант» отмечены поражения органов характерные для острой туберкулезной инфекции у мышей. В группе животных «БЦЖ» поражения органов выражены в меньшей степени. Наименее пораженными были органы в группах «ГамТБвак» и «ЛТБвак», при этом отмечено улучшение состояние органов в период времени к 35 и с 15 по 35 недели наблюдения после начала эксперимента, соответственно (таблица 6.2).

Таблица 6.2 – Характеристика патологических изменений легких и селезенки мышей линии C57BL/6 после заражения штаммом *M. tuberculosis* H37Rv в эксперименте по оценке протективности препарата «ЛТБвак»

Группа	Неделя после начала эксперимента			
	1	15	19	35
«Контроль»	Гиперемия легких; увеличение селезенки	Увеличенный объем и гиперемия легких; кровенаполненность селезенки	Гиперемия и воспалительные узелковые образования в легких; кровенаполненность селезенки	Увеличенный объем, множественные участки казеозных некрозов, и множественных кровоизлияний в легких; увеличение и кровенаполненность селезенки
«Адьювант»	Гиперемия легких; увеличение селезенки	Увеличенный объем и гиперемия легких; кровенаполненность селезенки	Кровоизлияния в легких; увеличение селезенки	Казеозные некрозы в легких; Увеличенный объем с очагами кровоизлияния и увеличение селезенки

Продолжение таблицы 6.2

Группа	Неделя после начала эксперимента			
	1	15	19	35
«БЦЖ»	Гиперемия легких; увеличение селезенки	Очаговая гиперемия легких; увеличение селезенки	Очаговая гиперемия и единичные узелковые образования в легких; увеличение селезенки	Очаговая гиперемия легких; увеличение и кровенаполненность селезенки
«ГамТБвак»	Гиперемия легких; увеличение селезенки	Очаговая гиперемия легких; увеличение селезенки	Очаговая гиперемия и единичные узелковые образования в легких; увеличение селезенки	Органы в пределах нормы
«ЛТБвак»	Гиперемия легких; увеличение селезенки	Органы в пределах нормы	Органы в пределах нормы	Органы в пределах нормы

Обсемененность микобактериями легких и селезенки мышей

Анализ динамики обсемененности тканей легких мышей линии C57BL/6 в экспериментальных группах после заражения штаммом *M. tuberculosis* H37Rv показал, что во всех группах отмечалось постепенное нарастание микобактериальной нагрузки с максимальными значениями на 35 неделе эксперимента, но уровень нагрузки существенно отличался в разных группах: в группе «Контроль» максимальное значение составило $\sim 2,7 \times 10^6$ КОЕ/г, в группе «Адьювант» - $\sim 3,2 \times 10^5$ КОЕ/г, в группе «БЦЖ» - $\sim 4,3 \times 10^4$ КОЕ/г, в группе «ГамТБвак» - $\sim 1,7 \times 10^4$ КОЕ/г, в группе «ЛТБвак» - $\sim 0,8 \times 10^4$ КОЕ/г (рисунок 6.3 А). Таким образом, двукратная БЦЖ-бустерная иммунизация препаратом «ЛТБвак» в дозе 5 мкг/животное обеспечила статистически достоверное снижение микобактериальной нагрузки в легких мышей линии C57BL/6 после аэрозольного заражения штаммом *M. tuberculosis* H37Rv в >300 раз, по сравнению с аналогичным показателем в группе «Контроль» и в 4 раза – в группе «БЦЖ». Микобактериальная нагрузка в селезенке мышей после аэрозольного заражения штаммом *M. tuberculosis* H37Rv также отличалась в разных экспериментальных группах: на 35 неделе в группе «Контроль» зафиксировано значение $\sim 4,6 \times 10^5$ КОЕ/г, в группе «Адьювант» - $\sim 5,5 \times 10^4$ КОЕ/г, в группе «БЦЖ» - $\sim 5,5 \times 10^3$ КОЕ/г, в группе «ГамТБвак» - $\sim 3,9 \times 10^3$ КОЕ/г, в группе «ЛТБвак» - $\sim 1,1 \times 10^3$ КОЕ/г (рисунок 6.3 Б).

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что БЦЖ-бустерная иммунизация препаратом «ЛТБвак» в дозе 5 мкг/животное обеспечивала статистически значимое снижение микобактериальной нагрузки в селезенке по сравнению с данным показателем в группе «Контроль» и группе «БЦЖ» в >400 и в 5 раз, соответственно.

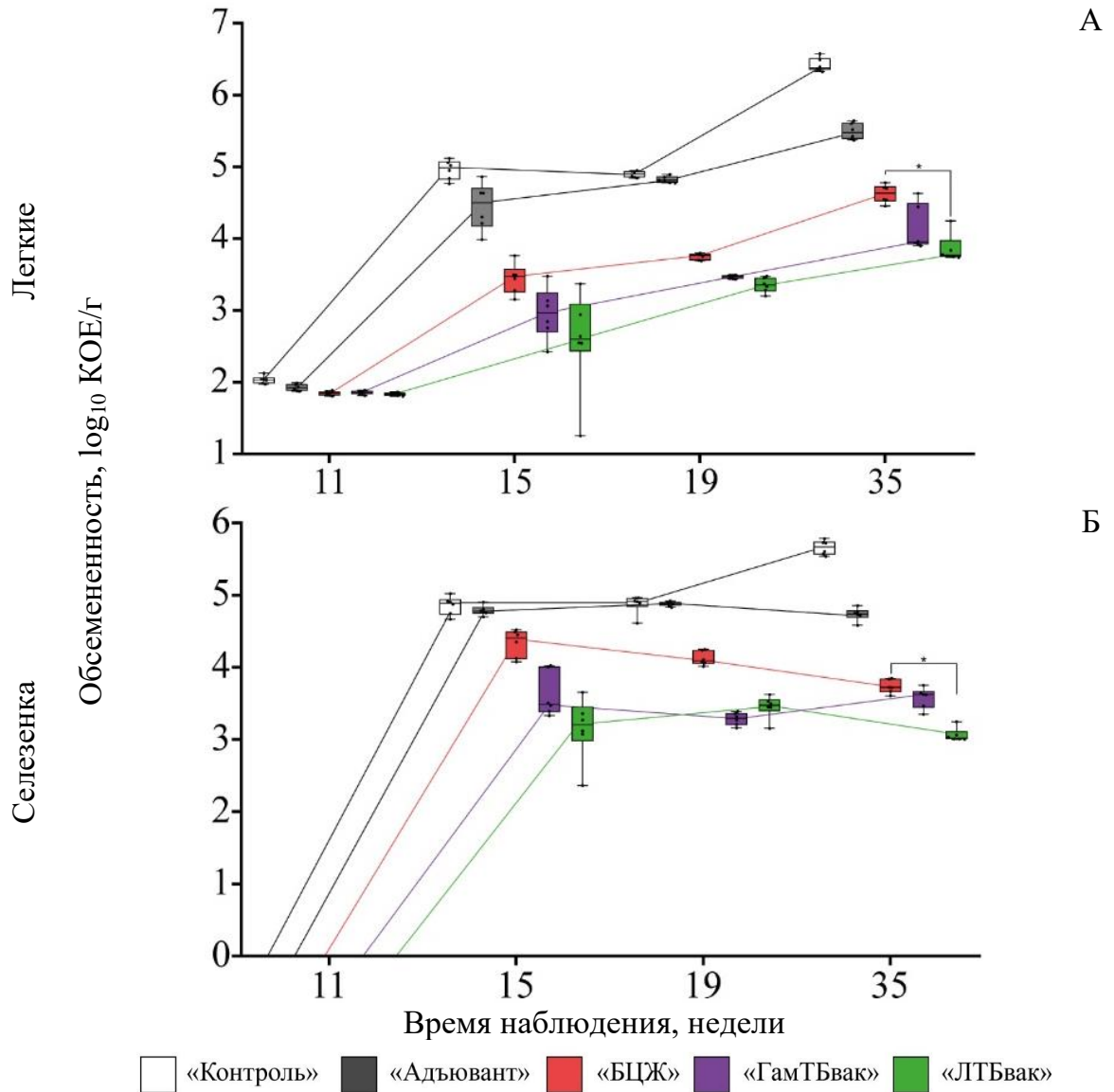


Рисунок 6.3 – Динамика микобактериальной нагрузки в тканях легких (А) и селезенки (Б) мышей линии C57BL/6 после аэрозольного заражения штаммом *M. tuberculosis* H37Rv в дозе 100 КОЕ/животное в эксперименте по определению протективности препарата «ЛТБвак». * - $p < 0,05$

Патогистологические изменения легких мышей

При изучении гистологической картины тканей легких зараженных животных группы «Контроль» на 15 неделе после начала эксперимента обнаружены единичные туберкулезные гранулемы небольших размеров. Межальвеолярные перегородки имели нормальное строение. Гранулемы состояли, преимущественно, из МФ, иногда с разрушенной цитоплазмой. По краям гранул обнаружено небольшое количество лимфоцитов. Через 19 недель от начала эксперимента отмечено увеличение площади патологически измененной ткани и количества гранул в легких. Прилежащие к гранулемам межальвеолярные перегородки были утолщены в результате инфильтрации

МФ. Гранулемы состояли из плотных скоплений МФ. Отмечено наличие единичных многоядерных клеток, локализованных периваскулярно широких инфильтратов из лимфоцитов и плазматических клеток. На 35 неделе эксперимента выявлены множественные обширные гранулемы, которые соединяются между собой, образуя сплошной клеточный инфильтрат, нарушающий альвеолярное строение респираторного отдела легких. Основу гранулем и инфильтрата, окружающих гранулемы межальвеолярных перегородок, составляли МФ. В отдельных участках гранулем отмечены очаги некроза с накоплением некротического детрита и очаговые скопления лизированных МФ. В периваскулярной области имелись плазматические клетки. Лимфоциты выявлены в небольшом количестве среди МФ гранулемы (рисунок 6.4).

В группе «Адьювант» через 15 недель после начала эксперимента в легких выявлены гранулемы небольших размеров. В центральной части гранулем обнаружены МФ, располагающиеся вокруг плотного инфильтрата из лимфоцитов и плазматических клеток. Некоторые МФ имели широкую рыхлую цитоплазму. Через 19 недель патологические изменения в легких были выражены в большей степени. Основную массу клеток инфильтрата составляли широкоплазменные МФ и эпителиоидные клетки, нарушающие альвеолярное строение легочной паренхимы. Плазматические клетки образовывали периваскулярные обширные скопления среди МФ клеток, совместно с лимфоцитами. Лимфатические сосуды были плотно заполнены лимфоцитами. Через 25 недель выявлены гранулемы, занимающие большие участки легких, в которых отмечалось разрушение и лизис МФ и мелкие скопления ядерного детрита (рисунок 6.5).

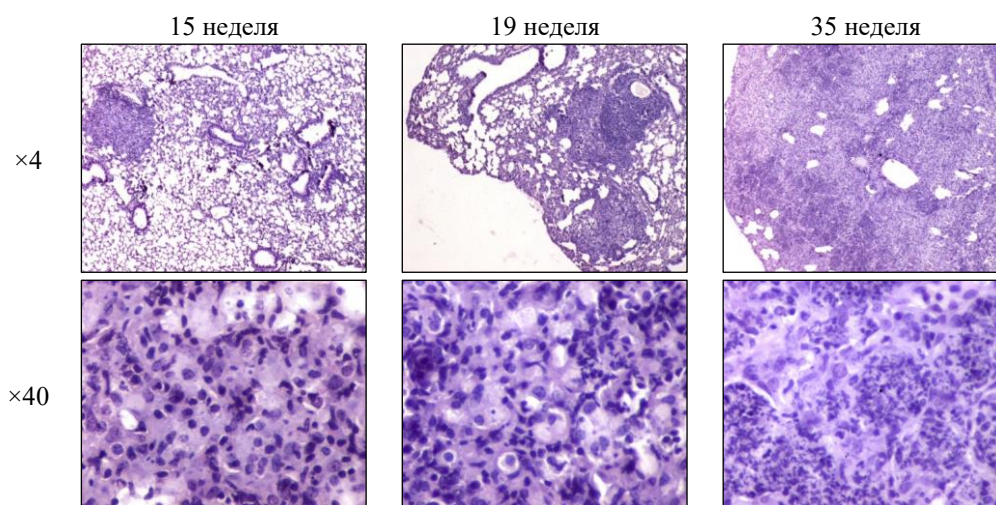


Рисунок 6.4 – Гистологические срезы тканей легких мышей линии C57BL/6 группы «Контроль» через 15, 19 и 35 недель после начала эксперимента

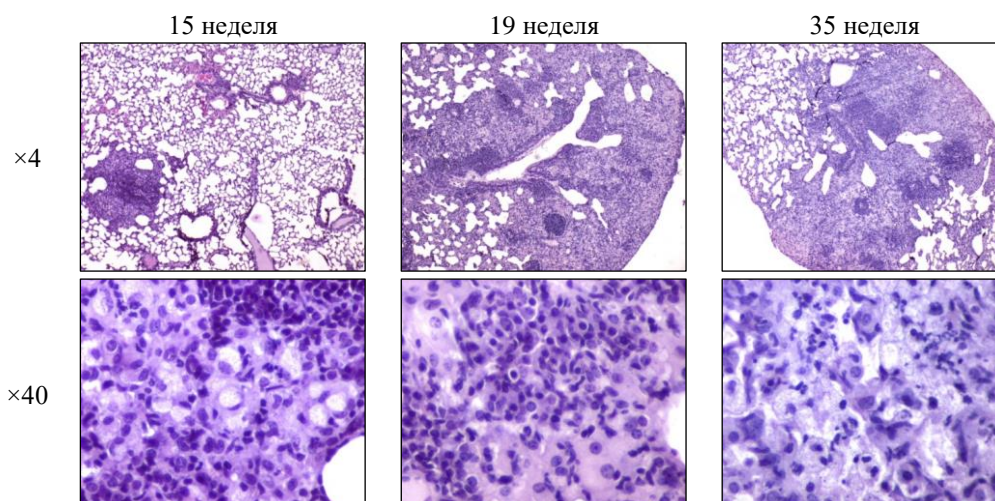


Рисунок 6.5 – Гистологические срезы тканей легких мышей линии C57BL/6 группы «Адьювант» через 15, 19 и 35 недель после начала эксперимента

В ходе анализа гистологической картины тканей легких животных в группе «БЦЖ» через 15 недель после начала эксперимента обнаружены единичные, небольших размеров гранулемы. В гранулемах преобладали лимфоциты, которые множественными скоплениями располагались между МФ. В препаратах обнаружены единичные плазматические клетки. В отдельных участках легочной паренхимы наблюдали утолщение межальвеолярных перегородок, которое образовалось в результате инфильтрации МФ и лимфоцитами. Через 19 недель в легких выявлены крупные гранулемы. МФ имели разную величину, большинство из них с широким слоем цитоплазмы. Большое количество лимфоцитов было диффузно распределено между МФ. Отмечено небольшое количество плазматических клеток. Межальвеолярные перегородки были в пределах нормы. Через 35 недель наблюдали МФ в гранулемах, которые разделялись на участки многоклеточными скоплениями лимфоцитов или плазматических клеток. Лимфоциты и плазматические клетки формировали широкие плотные периваскулярные инфильтраты (рисунок 6.6).

В тканях легких мышей группы «ГамТБвак» выявлены небольшие единичные гранулемы, образовавшиеся через 15 недель после начала эксперимента. В центре гранулем наблюдали плотное скопление лимфоцитов. Края гранулем были образованы широкоплазменными и узкоплазменными МФ, в том числе с плотным ядром. Отмечена инфильтрация межальвеолярных перегородок МФ на небольших участках паренхимы. Через 19 недель обнаружены изменения в структуре гранулем: увеличилось количество лимфоцитов, которые диффузно распределились среди МФ; в скоплениях лимфоцитов

зафиксированы плазматические клетки. Основу гранулем составляли узкоплазменные МФ. Через 35 недель отмечена инфильтрация легочной паренхимы МФ, которая диффузно распространялась по всему легкому, не ограничиваясь локальными гранулемами. МФ инфильтрата имели разнообразное строение: от небольших узкоплазменных с маленьким ядром до больших широкоплазменных с крупным ядром. Отмечена гибель отдельных МФ. Выявлены гранулы ядерного детрита. Лимфоциты и плазматические клетки образовали обособленные плотные периваскулярные скопления (рисунок 6.7).

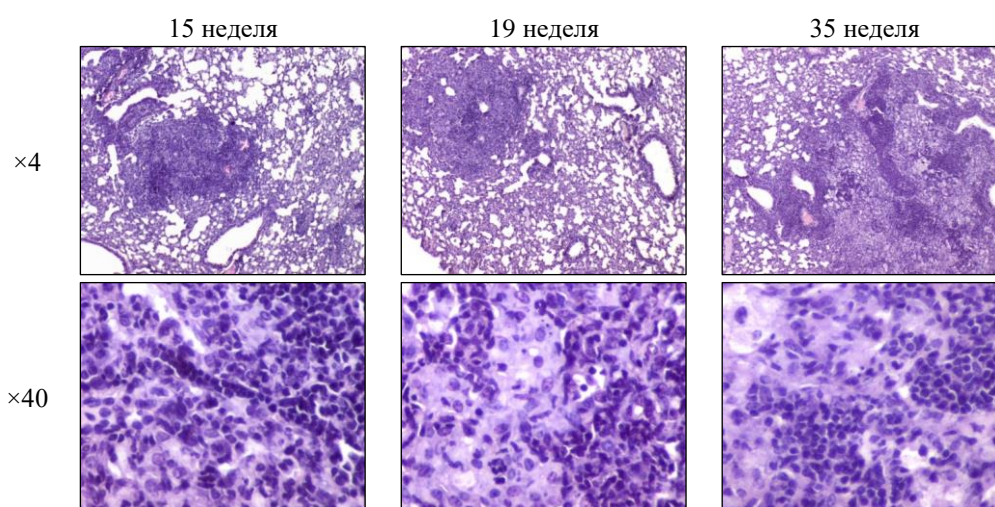


Рисунок 6.6 – Гистологические срезы тканей легких мышей линии C57BL/6 группы «БЦЖ» через 15, 19 и 35 недель после начала эксперимента

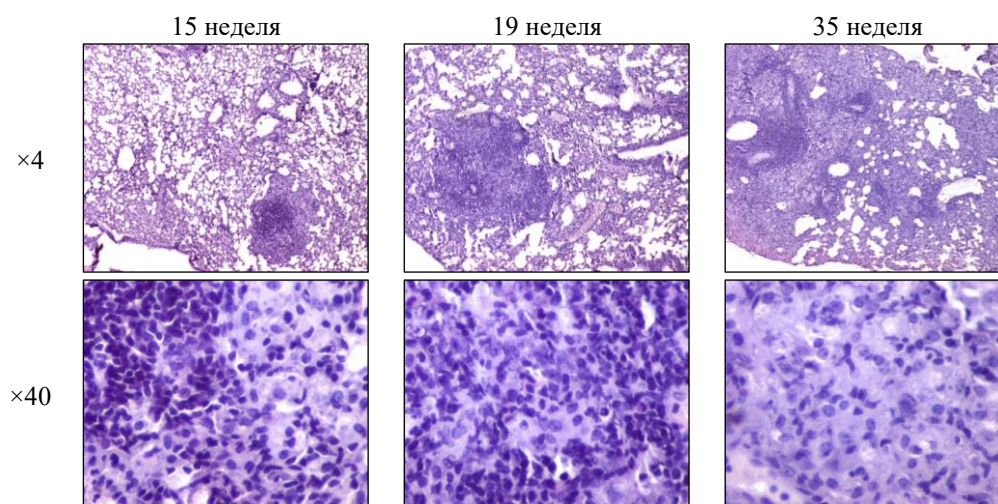


Рисунок 6.7 – Гистологические срезы тканей легких мышей линии C57BL/6 группы «ГамТБвак» через 15, 19 и 35 недель после начала эксперимента

В тканях легких животных группы «ЛТБвак» через 15 недель после начала эксперимента выявлено диффузное утолщение межальвеолярных перегородок по всей

площади среза. Межалвеолярные перегородки были утолщены в результате инфильтрации большим количеством МФ, наблюдалось небольшое количество лимфоцитов, обнаруживались множественные микроскопические клеточные скопления, содержащие МФ. Кроме того, отмечены микроскопические очаги плотных скоплений фиброцитов. Через 19 недель зафиксировано образование крупных гранул с большим количеством лимфоцитов в центре. В периферической части гранул преобладали МФ. Образование гранул происходило на фоне значительного уменьшения инфильтрации и возвращения к нормальному состоянию межалвеолярных перегородок на большей части легочной ткани. Среди МФ были обнаружены лизированные клетки. В местах образования некротического субстрата, в гранулах и утолщенных межалвеолярных перегородках присутствовали фиброциты. Фиброциты в межалвеолярных перегородках образовывали плотные округлые узелки. Через 35 недель выявлены четко ограниченные от окружающей паренхимы гранулемы. Межалвеолярные перегородки имели нормальное строение, на них не распространялась МФ инфильтрация. В гранулах присутствовало много лимфоцитов, которые образовывали скопления и диффузно располагались между МФ. Отмечен лизис отдельных МФ (рисунок 6.8).

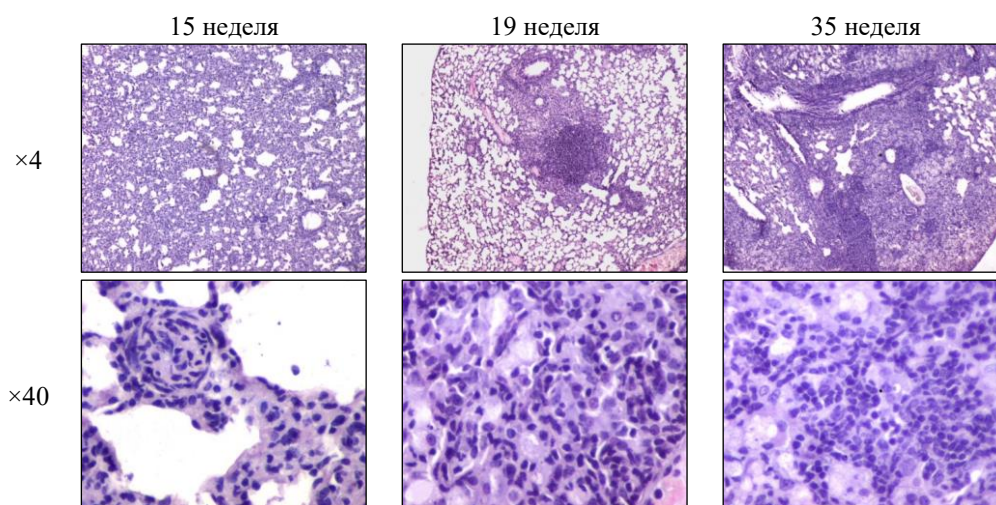


Рисунок 6.8 – Гистологические срезы тканей легких мышей линии C57BL/6 группы «ЛТБвак» через 15, 19 и 35 недель после начала эксперимента

На основании результатов, полученных на модели острой туберкулезной инфекции у мышей линии C57BL/6, можно сделать вывод, что БЦЖ-бустерный препарат «ЛТБвак» обеспечивал защиту экспериментальных животных против инфекции, вызванной штаммом *M. tuberculosis* H37Rv, усиливая защитное действие живой противотуберкулезной вакцины «БЦЖ». Протективный эффект БЦЖ-бустерного

препарата «ЛТБвак» находился приблизительно на таком же уровне с таковым, обеспечиваемым препаратом сравнения кандидатной БЦЖ-бустерной противотуберкулезной вакциной «ГамТБвак».

6.2 Профилактическая эффективность на модели туберкулезной инфекции у морских свинок альбиносов

Профилактическую эффективность препарата «ЛТБвак» оценивали на модели туберкулезной инфекции у морских свинок альбиносов, вызванной аэрозольным заражением штаммом *M. tuberculosis* H37Rv в дозе 50-100 КОЕ/животное, как описано в разделе 2.5.3. Ранее было показано, что данная модель адекватно отображает патогенез туберкулезной инфекции у морских свинок [294]. Контролями в данном эксперименте служили группы животных, не подвергавшихся иммунизации противотуберкулезными вакцинами «БЦЖ» и «ЛТБвак», а также обработанные адьювантом, который входит в состав препарата «ЛТБвак». Критериями оценки патологического процесса у зараженных морских свинок служили следующие показатели: выживаемость животных, патоморфология внутренних органов, микобактериальная обсемененность паренхиматозных органов.

Схема эксперимента включала следующие этапы: (1) - подкожная иммунизация морских свинок вакциной «БЦЖ» в дозе 5×10^6 КОЕ/животное; (2) – первая (подкожная) иммунизация препаратом «ЛТБвак» в дозе 5 мкг/животное на третьей неделе эксперимента; (3) – вторая (подкожная) иммунизация препаратом «ЛТБвак» в дозе 5 мкг/животное на пятой неделе эксперимента; (4) – аэрозольное заражение вирулентным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv в дозе 50-100 КОЕ/животное на 11 неделе эксперимента; (5) – эвтаназия на 19 и 38 неделях эксперимента (рисунок 6.9, таблица 6.3).

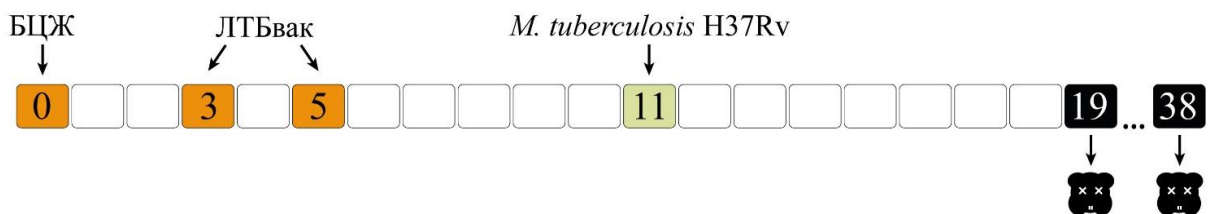


Рисунок 6.9 – Схема эксперимента по оценке протективности препарата «ЛТБвак» на модели туберкулезной инфекции у морских свинок альбиносов. Арабскими цифрами обозначены недели после начала эксперимента; оранжевый цвет – иммунизация; фисташковый цвет – заражение; черный цвет – эвтаназия

Таблица 6.3 – Группы морских свинок альбиносов и дозы иммунизации в эксперименте по оценке протективности препарата «ЛТБвак»

Группа	Кол-во мышей, шт.	Подкожная иммунизация живым вакцинным штаммом «БЦЖ», 0 неделя, КОЕ/животное	Первая иммунизация (подкожная), 3 неделя, мкг/животное	Вторая иммунизация (подкожная), 5 неделя, мкг/животное
«Контроль»	10	0,9 % NaCl	0,9 % NaCl	0,9 % NaCl
«Адьювант»	10	0,9 % NaCl	«Адьювант»	«Адьювант»
«БЦЖ»	10	5×10^6	0,9 % NaCl	0,9 % NaCl
«ЛТБвак»	10	5×10^6	«ЛТБвак», 5	«ЛТБвак», 5

Примечание: «Контроль» - группа морских свинок, которым вместо вакцины «БЦЖ» и бустерной препарата «ЛТБвак» вводили равный объем 0,9 % NaCl; «Адьювант» - группа мышей, которым вместо вакцины «БЦЖ» вводили равный объем 0,9 % NaCl, а вместо вакцины «ЛТБвак» – адьювант препарата «ЛТБвак»; «БЦЖ» - группа мышей, иммунизированных вакциной «БЦЖ», которым вместо бустерного препарата «ЛТБвак» вводили равный объем 0,9 % NaCl; «ЛТБвак» - группа мышей, иммунизированных вакциной «БЦЖ» и препаратом «ЛТБвак» в дозе 5 мкг/мышь

Выживаемость морских свинок

За период наблюдения (38 недель) в группах «БЦЖ» и «ЛТБвак» выжило 100 % животных, в группе «Адьювант» - 90%, а в группе «Контроль» - 80 % (рисунок 6.10).

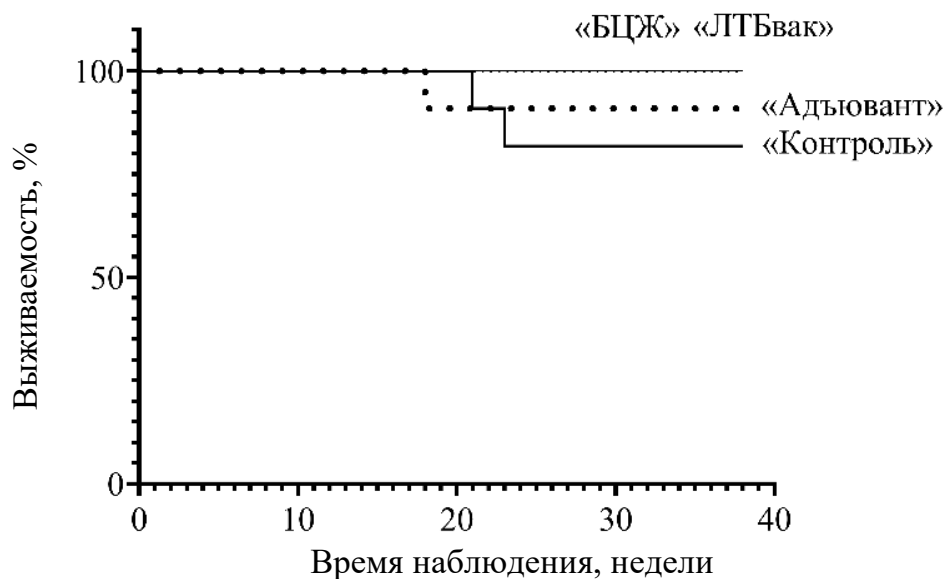


Рисунок 6.10 – Динамика выживаемости морских свинок альбиносов после заражения штаммом *M. tuberculosis* H37Rv в дозе 50-100 КОЕ/животное в эксперименте по оценке протективной активности препарата «ЛТБвак»

Патологические изменения легких и селезенки морских свинок

Оценка патологических изменений внутренних органов при вскрытии зараженных животных на 19 и 38 неделях после начала эксперимента показала, что в группах животных «Контроль» и «Адьювант» имеют место поражения органов, характерные для

туберкулезной инфекции у морских свинок альбиносов. В группе животных «БЦЖ» на 38 неделе после начала эксперимента отмечены патологические изменения в паренхиматозных органах, в отличие от группы «ЛТБвак», где состояние органов не отличалось от нормы у здоровых животных (таблица 6.4).

Таблица 6.4 – Характеристика патологических изменений легких и селезенки морских свинок альбиносов после аэрозольного заражения штаммом *M. tuberculosis* H37Rv в эксперименте по оценке протективности препарата «ЛТБвак»

Группа	Неделя после начала эксперимента	
	19	38
«Контроль»	Увеличенный объем и очаговая гиперемия легких; кровенаполненность селезенки	Множественные участки неспецифических некрозов по типу инфарктов легкого на фоне признаков отека и множественных кровоизлияний; увеличение и кровенаполненность селезенки
«Адьювант»	Увеличенный объем и гиперемия легких; увеличение селезенки	Увеличенный объем легких с участками некрозов и множественных очаговых кровоизлияний; увеличение и кровенаполненность селезенки
«БЦЖ»	Видимых изменений не выявлено	Очаговая гиперемия и единичные узелковые образования в легких; увеличение селезенки
«ЛТБвак»	Незначительные изменения паренхиматозных органов	Незначительные изменения паренхиматозных органов

Обсемененность микобактериями легких и селезенки морских свинок

Анализ динамики обсемененности тканей легких морских свинок альбиносов в экспериментальных группах после заражения штаммом *M. tuberculosis* H37Rv показал, что во всех группах отмечалось постепенное нарастание микобактериальной нагрузки с максимальными значениями на 38 неделе эксперимента, но уровень нагрузки существенно отличался в разных группах: в группе «Контроль» максимальное значение составило $\sim 2,1 \times 10^5$ КОЕ/г, в группе «Адьювант» - $\sim 1,2 \times 10^5$ КОЕ/г, в группе «БЦЖ» - $\sim 0,8 \times 10^3$ КОЕ/г, в группе «ЛТБвак» - $\sim 1,1 \times 10^2$ КОЕ/г (рисунок 6.11 А). Таким образом, двукратная БЦЖ-бустерная иммунизация морских свинок альбиносов препаратом «ЛТБвак» в дозе 5 мкг/животное обеспечила статистически достоверное снижение микобактериальной нагрузки в легких животных после аэрозольного заражения штаммом *M. tuberculosis* H37Rv на 3 порядка, по сравнению с аналогичным показателем в группе «Контроль» и на порядок - относительно результатов, полученных в группе «БЦЖ».

Микобактериальная нагрузка в селезенке морских свинок альбиносов после аэрозольного заражения штаммом *M. tuberculosis* H37Rv также отличалась в разных экспериментальных группах: на 38 неделе после начала эксперимента в группе «Контроль» зафиксировано значение $\sim 0,7 \times 10^5$ КОЕ/г, в группе «Адьювант» -

$\sim 1,3 \times 10^5$ КОЕ/г, в группе «БЦЖ» - $\sim 5,1 \times 10^2$ КОЕ/г, в группе «ЛТБвак» - $\sim 4,3 \times 10^1$ КОЕ/г (рисунок 6.11 Б). Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что двукратная бустерная иммунизация морских свинок альбиносов препаратом «ЛТБвак» в дозе 5 мкг/животное обеспечивала протективный противотуберкулезный эффект, что выражалось в статистически значимом снижении микобактериальной нагрузки в селезенке после заражения штаммом *M. tuberculosis* H37Rv, по сравнению с аналогичным показателем в группе «Контроль» и группе «БЦЖ» на 4 и на 1 порядок, соответственно.

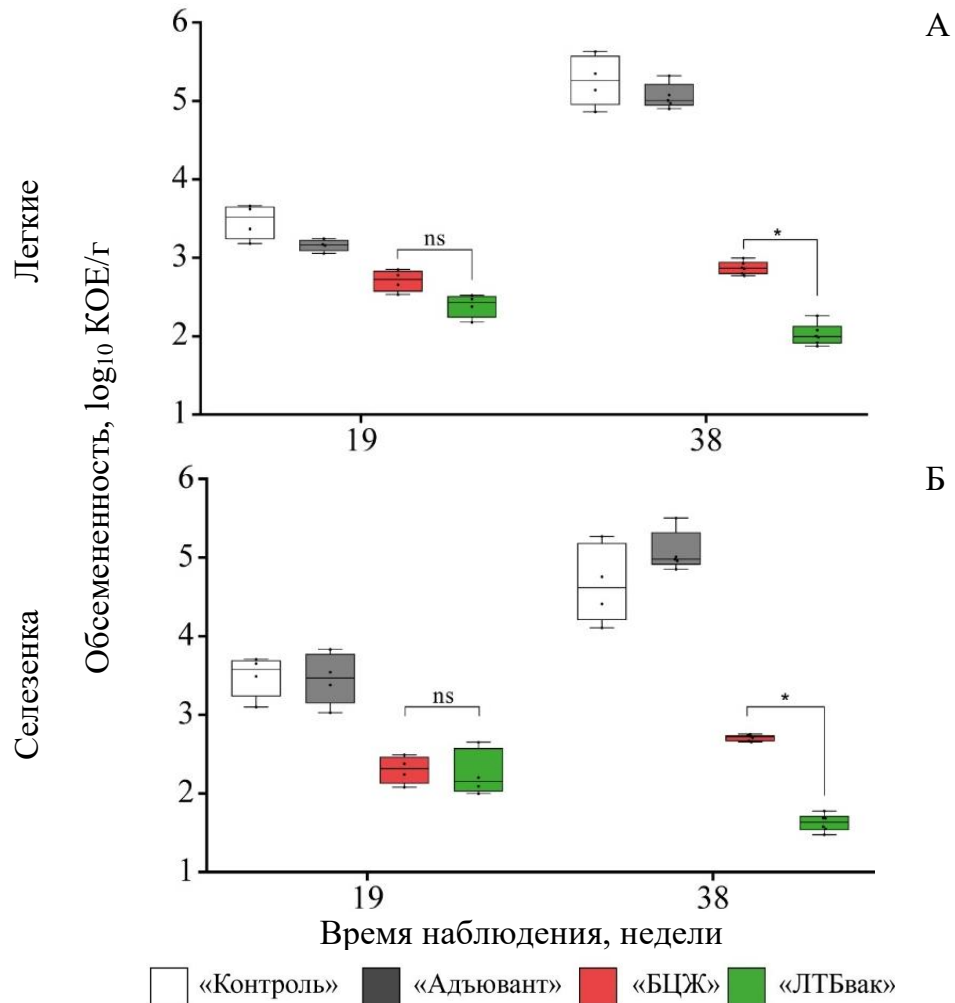


Рисунок 6.11 – Динамика микобактериальной нагрузки в тканях легких (А) и селезенки (Б) морских свинок альбиносов после аэрозольного заражения штаммом *M. tuberculosis* H37Rv в дозе 50-100 КОЕ/животное в эксперименте по определению протективности препарата «ЛТБвак». ns – $p > 0,05$; * - $p \leq 0,05$

Патогистологические изменения легких морских свинок

При изучении гистологической картины тканей легких инфицированных животных группы «Контроль» на 19 неделе после начала эксперимента обнаружены обширные участки интенсивной клеточной инфильтрации. Это приводило к уплотнению легочной паренхимы и образованию множественных гранул небольшого размера. Инфильтрат состоял из узкоплазменных МФ. Лимфоцитарная инфильтрация не наблюдалась. На большей части тканей легких сохранялось альвеолярное строение. Наблюдалось некоторое утолщение межальвеолярных перегородок в результате увеличения количества МФ. Через 38 недель от начала эксперимента отмечено образование обширных, сливающихся между собой плотных клеточных инфильтратов, утрата альвеолярного строения респираторного отдела легких. В клеточный состав инфильтрата входили МФ, лимфоциты и плазматические клетки. МФ имели разнообразное строение, преимущественно они были представлены широкоплазменными МФ. Лимфоциты и плазматические клетки находились в гранулах приблизительно в равных количествах. В отдельных участках гранулам присутствовали очаги некроза с накоплением некротического детрита и очаговые скопления лизированных МФ (рисунок 6.12).

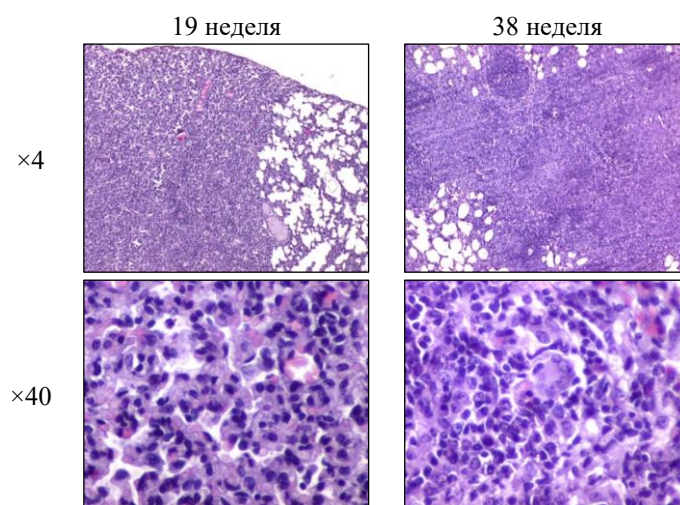


Рисунок 6.12 – Гистологические срезы тканей легких морских свинок альбиносов группы «Контроль» через 19 и 38 недель после начала эксперимента

В группе «Адьювант» через 19 недель после начала эксперимента в паренхиме легких присутствовали очаги формирования гранул небольшого размера с инфильтрацией МФ, частично сохранялось альвеолярное строение. Было отмечено наличие в инфильтрате большого количества иммунокомпетентных клеток: лимфоцитов и плазмоцитов, расположенных между макрофагами. Через 38 недель в паренхиме легких

отмечали множественные обширные гранулемы, состоящие из нескольких соединенных между собой участков. Основная площадь данных участков в гранулемах представляла собой плотные скопления широкоплазменных МФ и не содержала лимфоцитов и плазмоцитов. Центральная часть некоторых участков подвергалась некрозу, в этих участках наблюдали скопление детрита с большим количеством базофильно окрашенных частиц (рисунок 6.13).

В ходе анализа гистологической картины тканей легких морских свинок альбиносов в группе «БЦЖ» через 19 недель после заражения обнаружены небольшие гранулемы, состоящие преимущественно из лимфоцитов, между которыми обнаружено некоторое количество МФ. Через 38 недель в легких зараженных животных выявлены крупные гранулемы, состоящие, в основном, из широкоплазменных МФ. Обнаружено большое количество лимфоцитов, которые располагались между МФ и по краю гранулемы. Зафиксирован некроз клеток в центре некоторых гранулем, а также некротический субстрат из частиц с базофильной окраской (рисунок 6.14).

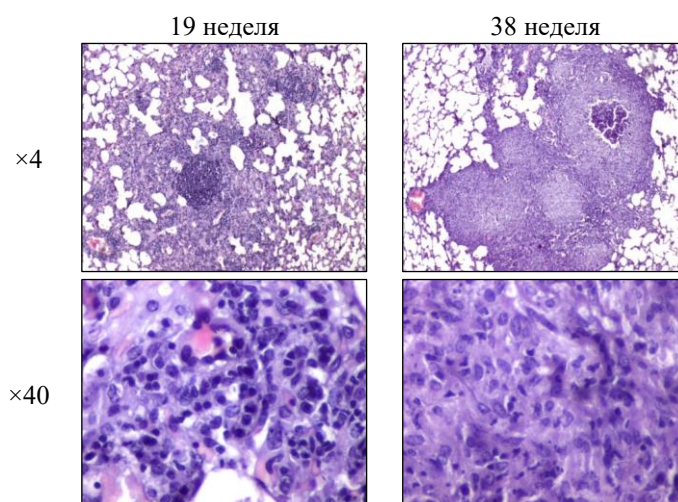


Рисунок 6.13 – Гистологические срезы тканей легких морских свинок альбиносов группы «Адьювант» через 19 и 38 недель после начала эксперимента

Анализ гистологических срезов тканей легких животных группы «ЛТБвак» через 19 недель после заражения выявил в легких мелкие гранулемы, которые состояли, преимущественно, из лимфоцитов. Зафиксировано незначительное количество МФ. Через 38 недель после заражения обнаружены небольшой величины гранулемы, которые стали плотнее из-за увеличения в них количества лимфоцитов. Нормальное строение паренхимы не было нарушено (рисунок 6.15).

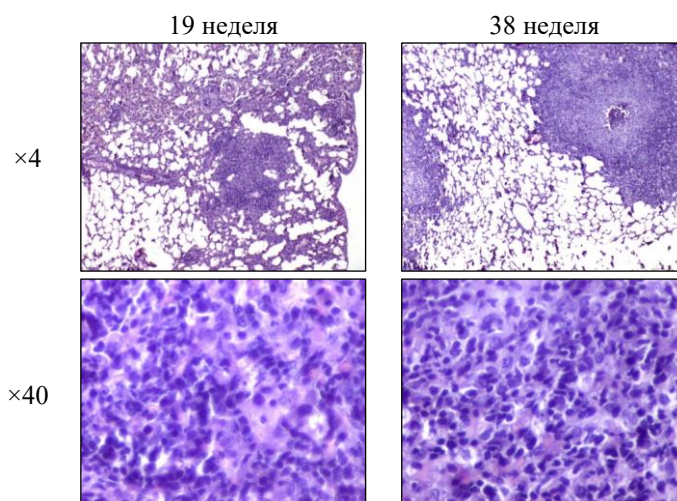


Рисунок 6.14 – Гистологические срезы тканей легких морских свинок альбиносов группы «БЦЖ» через 19 и 38 недель после начала эксперимента

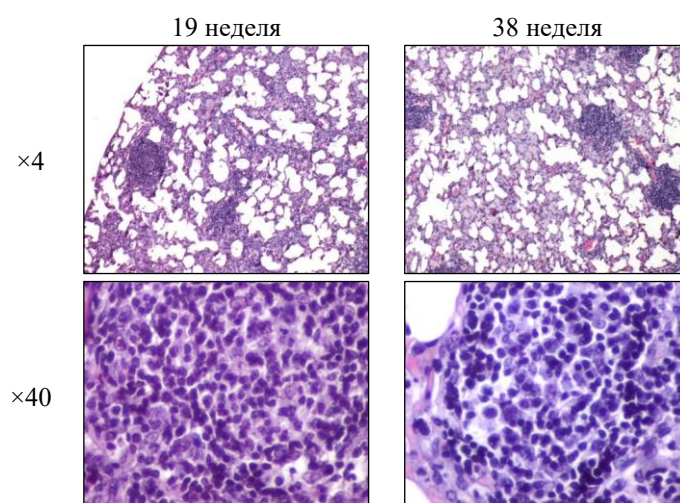


Рисунок 6.15 – Гистологические срезы тканей легких морских свинок альбиносов группы «ЛТБвак» через 19 и 38 недель после начала эксперимента

6.3 Терапевтическая эффективность на модели хронической туберкулезной инфекции у мышей линии C57BL/6

Терапевтическую эффективность препарата «ЛТБвак» оценивали на модели хронической туберкулезной инфекции у мышей линии C57BL/6, вызванной внутрибрюшинным заражением в дозе 1×10^4 КОЕ/мышь штаммом *M. tuberculosis* H37Rv, как описано в разделе 2.5.3. Было показано, что данная модель адекватно отображает патогенез хронической туберкулезной инфекции у мышей [13]. В качестве препарата сравнения использовали противотуберкулезную субъединичную рекомбинантную вакцину «ГамТБвак», эффективность которой была доказана ранее [294]. Контролями в данном эксперименте служили группы животных, не подвергавшихся лечению

препаратами «ЛТБвак» и «ГамТБвак», а также обработанные адьювантом, который используется в составе препарата «ЛТБвак» (CPG-олигонуклеотид и мурамилдипептид, иммобилизованные на частицах носителя PLGA, сополимера молочной и гликолевой кислот). Критериями оценки патологического процесса у зараженных мышей служили следующие показатели: патоморфология и микробная нагрузка в паренхиматозных органах.

Схема эксперимента включала следующие этапы: (1) – внутрибрюшинное заражение мышей линии C57BL/6 в дозе 1×10^4 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 (рисунок 6.16, таблица 6.5).

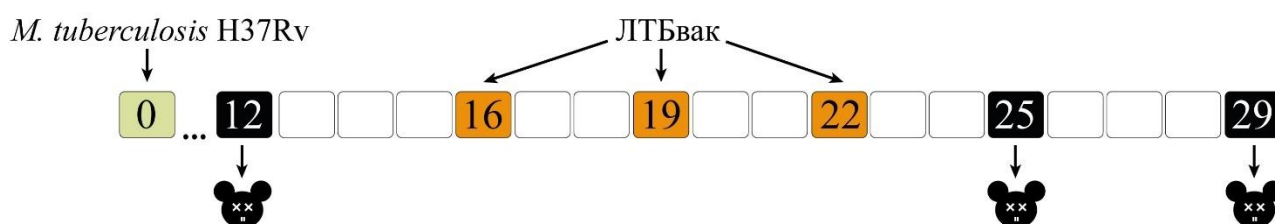


Рисунок 6.16 – Схема эксперимента по оценке терапевтической эффективности препарата «ЛТБвак» на модели хронической туберкулезной инфекции у мышей линии C57BL/6. Арабскими цифрами обозначены недели после начала эксперимента; оранжевый цвет – терапевтические инъекции вакциной «ЛТБвак» в дозе 5 мкг/животное; фиштакшковый цвет – заражение; черный цвет - эвтаназия

Таблица 6.5 – Группы мышей линии C57BL/6 и дозы препаратов «ГамТБвак» и «ЛТБвак» в эксперименте по оценке терапевтической эффективности

Группа	Кол-во мышей, шт.	Внутрибрюшинное заражение штаммом <i>M. tuberculosis</i> H37Rv 0 неделя (доза на мышь)	Первая инъекция (подкожная) вакцины, 16 неделя, мкг/мышь	Вторая инъекция (подкожная) вакцины, 19 неделя, мкг/мышь	Третья инъекция (подкожная) вакцины, 22 неделя, мкг/мышь
«Контроль»	20	10^4 КОЕ	0,9 % NaCl	0,9 % NaCl	0,9 % NaCl

Продолжение таблицы 6.5

«Адьювант»	20	10 ⁴ КОЕ	«Адьювант»	«Адьювант»	«Адьювант»
«ГамТБвак»	20	10 ⁴ КОЕ	«ГамТБвак», 10	«ГамТБвак», 10	«ГамТБвак», 10
«ЛТБвак»	20	10 ⁴ КОЕ	«ЛТБвак», 5	«ЛТБвак», 5	«ЛТБвак», 5

Примечание: «Контроль» - группа мышей, которым вместо препаратов «ЛТБвак» и «ГамТБвак» вводили равный объем 0,9 % NaCl; «Адьювант» - группа мышей, которым вместо препаратов «ЛТБвак» и «ГамТБвак» эквивалентное количество адьюванта препарата «ЛТБвак»; «ГамТБвак» - группа сравнения мышей, которым вместо препарата «ЛТБвак» вводили кандидатную вакцину «ГамТБвак» в дозе 10 мкг/мышь; «ЛТБвак» - группа мышей, которым вводили препарат «ЛТБвак» в дозе 5 мкг/мышь

Патологические изменения легких и селезенки мышей

Оценка патологических изменений внутренних органов при вскрытии зараженных животных на 12, 25 и 29 неделях после начала эксперимента показала, что в группах животных «Контроль» и «Адьювант» отмечены поражения органов характерные для хронической туберкулезной инфекции у мышей. В группе животных «ГамТБвак» на 29 неделе отмечены патологические изменения в паренхиматозных органах, в отличие от группы «ЛТБвак», где состояние органов не отличалось от нормы (таблица 6.6).

Таблица 6.6 – Характеристика патологических изменений легких и селезенки мышей линии C57BL/6 после внутрибрюшинного заражения штаммом *M. tuberculosis* H37Rv в эксперименте по оценке терапевтической эффективности препарата «ЛТБвак»

Группа	Неделя после начала эксперимента		
	12	25	29
«Контроль»	Увеличенный объем и гиперемия легких; кровенаполненность селезенки	Увеличенный объем, гиперемия легких и единичные узелковые образования; кровенаполненность селезенки	Гиперемия легких, множественные узелковые образования; кровенаполненность селезенки
«Адьювант»	Увеличенный объем и гиперемия легких; кровенаполненность селезенки	Увеличенный объем, гиперемия легких и единичные узелковые образования; кровенаполненность селезенки	Гиперемия легких, множественные узелковые образования; кровенаполненность селезенки
«ГамТБвак»	Увеличенный объем и гиперемия легких; кровенаполненность селезенки	Незначительные патологические изменения паренхиматозных органов	Гиперемия и единичные узелковые образования в легких; увеличение селезенки
«ЛТБвак»	Увеличенный объем и гиперемия легких; кровенаполненность селезенки	Незначительные патологические изменения паренхиматозных органов	Незначительные патологические изменения паренхиматозных органов

Обсемененность микобактериями легких и селезенки мышей

Анализ динамики обсемененности тканей легких мышей линии C57BL/6 после внутрибрюшинного заражения штаммом *M. tuberculosis* H37Rv показал, что во всех экспериментальных группах отмечалось постепенное нарастание микобактериальной нагрузки к 12 неделе, после чего снижался к 25 неделе и возрастал к 29 неделе, но уровень

нагрузки существенно отличался в разных группах: в группе «Контроль» максимальное значение составило $\sim 2,3 \times 10^2$ КОЕ/г, в группе «Адьювант» - $\sim 5,1 \times 10^2$ КОЕ/г, в группе «ГамТБвак» - $\sim 2,2 \times 10^2$ КОЕ/г, в группе «ЛТБвак» - $\sim 3,1 \times 10^1$ КОЕ/г (рисунок 6.17 А). Таким образом, был показан терапевтический эффект препарата «ЛТБвак» в дозе 5 мкг/животное, который обеспечивал статистически достоверное снижение микобактериальной нагрузки в легких мышей линии C57BL/6 после внутрибрюшинного заражения штаммом *M. tuberculosis* H37Rv на порядок, по сравнению с аналогичным показателем в группах «Контроль» и «ГамТБвак».

Микобактериальная нагрузка в селезенке мышей после внутрибрюшинного заражения штаммом *M. tuberculosis* H37Rv также отличалась в разных экспериментальных группах: на 29 неделе в группе «Контроль» зафиксировано значение $\sim 1,2 \times 10^2$ КОЕ/г, в группе «Адьювант» - $\sim 1,8 \times 10^2$ КОЕ/г, в группе «ГамТБвак» - $\sim 1,0 \times 10^1$ КОЕ/г, в группе «ЛТБвак» - $\sim 0,5 \times 10^1$ КОЕ/г (рисунок 6.17 Б).

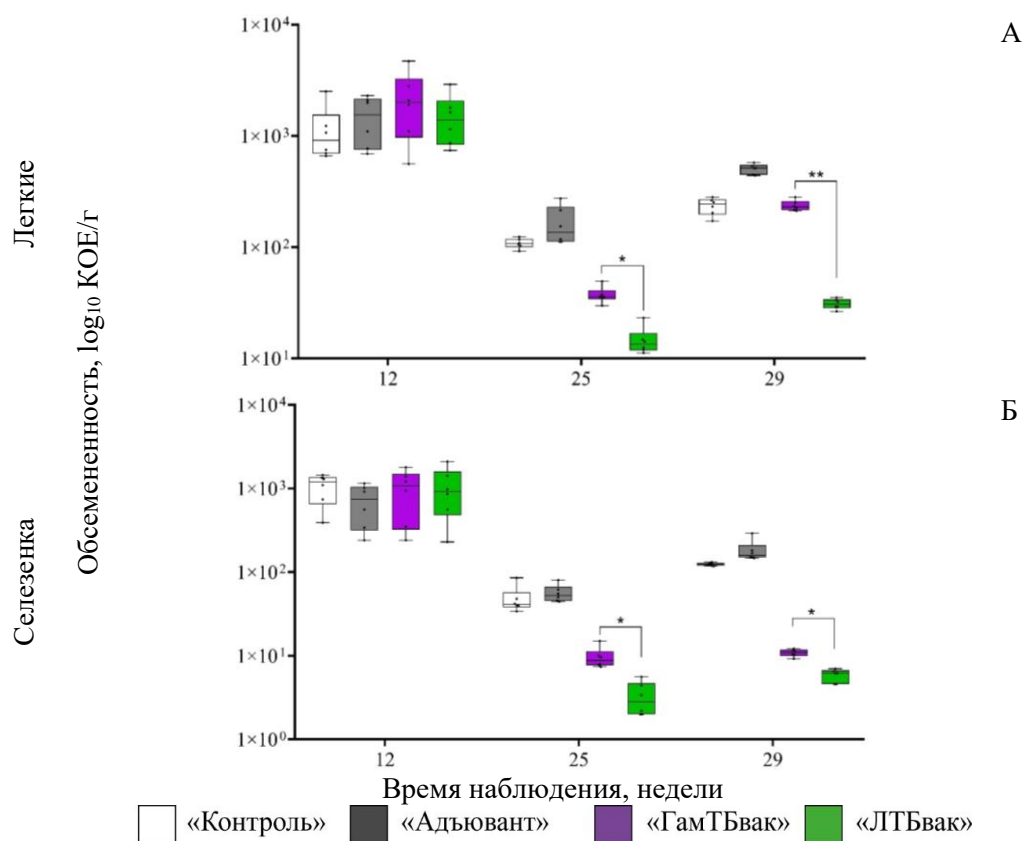


Рисунок 6.17 – Динамика микобактериальной нагрузки в тканях легких (А) и селезенки (Б) мышей линии C57BL/6 после внутрибрюшинного заражения штаммом *M. tuberculosis* H37Rv в дозе 1×10^4 КОЕ/животное в эксперименте по определению терапевтической эффективности препарата «ЛТБвак». * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что терапия препаратом «ЛТБвак» в дозе 5 мкг/животное обеспечивала статистически значимое снижение микобактериальной нагрузки в селезенке, по сравнению с данным показателем в группах «Контроль» и «ГамТБвак» в >20 раз и в 2 раза, соответственно.

Патогистологические изменения легких мышей

При изучении гистологической картины тканей легких животных на 12 неделе после внутрибрюшинного заражения штаммом *M. tuberculosis* H37Rv обнаружены единичные туберкулезные гранулемы небольших размеров. Межалвеолярные перегородки имели нормальное строение. Гранулемы состояли, преимущественно, из МФ, иногда с разрушенной цитоплазмой. По краям гранул обнаружено небольшое количество лимфоцитов. Описанная картина характерна для моделирования хронического туберкулеза у мышей.

Через 25 недель после заражения в легких мышей группы «Контроль» отмечено разрушение структуры респираторного и воздухоносного отделов. Альвеолы были заполнены МФ, межалвеолярные перегородки не определялись. Среди плотного инфильтрата из МФ были обнаружены разной величины скопления полиморфноядерных лейкоцитов. Вокруг кровеносных сосудов выявлены скопления плазматических клеток. На 29 неделе после заражения в легких животных этой группы были выявлены широкие периваскулярные скопления из лимфоцитов и плазматических клеток. Паренхима между ними была плотно инфильтрирована МФ, сохранялись небольшие участки паренхимы, имеющей альвеолярное строение (рисунок 6.18).

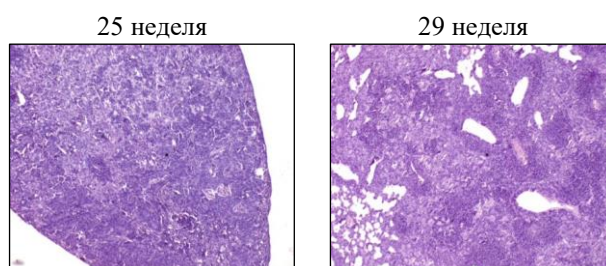


Рисунок 6.18 – Гистологические срезы ($\times 4$) тканей легких мышей линии C57BL/6 группы «Контроль» через 25 и 29 недель после заражения штаммом *M. tuberculosis* H37Rv в дозе 1×10^4 КОЕ/животное и последующих инъекций ЗФР

В ходе анализа гистологической картины тканей легких животных в группе «Адьювант» через 25 недель после заражения обнаружены множественные гранулемы разной величины, часто сливающиеся между собой. Зафиксированы широкие плотные клеточные периваскулярные инфильтраты из лимфоцитов и плазмоцитов, вокруг которых

расположены обширные, заполненные МФ участки паренхимы. Через 29 недель легкие экспериментальных животных были плотно инфильтрированы МФ, альвеолярное строение было полностью разрушено, бронхи не выявлялись. На этом фоне были зафиксированы относительно небольшие очаговые клеточные скопления из лимфоцитов и плазматических клеток (рисунок 6.19).

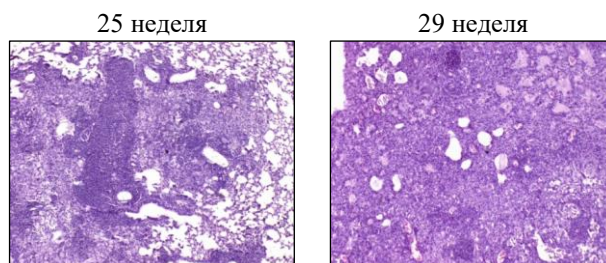


Рисунок 6.19 – Гистологические срезы ($\times 4$) тканей легких мышей линии C57BL/6 группы «Адьювант» через 25 и 29 недель после заражения штаммом *M. tuberculosis* H37Rv в дозе 1×10^4 КОЕ/животное и последующих инъекций адьюванта кандидатной вакцины «ЛТБвак»

Изучение гистологической картины тканей легких животных группы «ГамТБвак» показало, что через 25 недель после внутрибрюшинного заражения в срезах выявлены гранулемы, ограниченные от окружающей паренхимы нормального строения, периваскулярные инфильтраты были незначительно выражены. Лимфоциты и плазматические клетки диффузно располагались между МФ внутри гранулем, образуя лимфоцитарно-макрофагальные узелки. Через 29 недель отмечали наличие нескольких крупных гранул, состоящих из МФ, между которыми были расположены скопления лимфоцитов. Паренхима, окружающая гранулемы, сохраняла альвеолярное строение. Межалвеолярные перегородки были утолщены в результате инфильтрации МФ (рисунок 6.20).

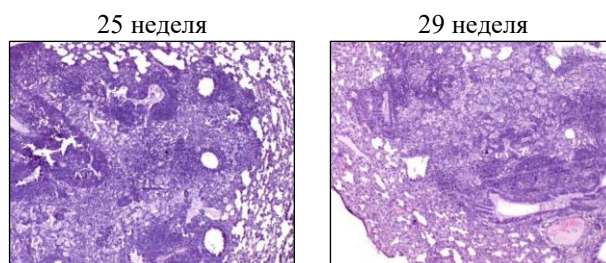


Рисунок 6.21 – Гистологические срезы ($\times 4$) тканей легких мышей линии C57BL/6 группы «ГамТБвак» через 25 и 29 недель после заражения штаммом *M. tuberculosis* H37Rv в дозе 1×10^4 КОЕ/животное и лечения препаратом «ГамТБвак» в дозе 10 мкг/животное

При анализе гистологических срезов тканей легких животных группы «ЛТБвак»

через 25 недель после заражения возбудителем туберкулеза были обнаружены крупные единичные гранулёмы, в которых наблюдалось большое количество лимфоцитов и плазматических клеток. Окружающая паренхима была без отклонений от нормы. Лимфоциты и плазмоциты, в основном, распределились среди МФ, по всей площади гранулём, образуя густые скопления. Через 29 недель было обнаружено диффузное утолщение межальвеолярных перегородок в результате инфильтрации МФ и единичные периваскулярные и перибронхиальные скопления лимфоцитов (рисунок 6.22).

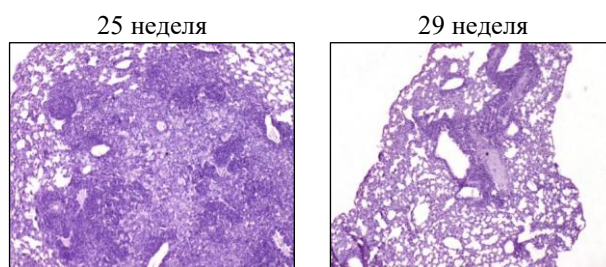


Рисунок 6.22 – Гистологические срезы ($\times 4$) тканей легких мышей линии C57BL/6 группы «ЛТБвак» через 25 и 29 недель после заражения штаммом *M. tuberculosis* H37Rv в дозе 1×10^4 КОЕ/животное и лечения препаратом «ЛТБвак» в дозе 5 мкг/животное

На основании результатов, полученных на модели хронической туберкулезной инфекции у мышей линии C57BL/6, можно сделать вывод, что препарат «ЛТБвак» проявлял терапевтическую противотуберкулезную активность, которая выражалась в снижении показателя обсемененности внутренних органов, а также в постепенной нормализации гистологической картины тканей легких мышей.

6.4 Заключение по Главе 6

Профилактическая противотуберкулезная активность препарата «ЛТБвак» продемонстрирована на моделях острой туберкулезной инфекции, генерированной аэрозольным заражением штаммом *M. tuberculosis* H37Rv в дозе 50-100 КОЕ/животное, у мышей линии C57BL/6 и у морских свинок альбиносов. На основании полученных данных можно сделать вывод, что испытуемый препарат «ЛТБвак» усиливал защитное действие живой вакцины «БЦЖ» на указанных животных моделях. Это проявлялось в статистически достоверном снижении микобактериальной нагрузки на 35 неделе в легких мышей на 2 порядка, по сравнению с аналогичным показателем в группе «Контроль» и в 4 раза – в группе «БЦЖ», а также в селезенке мышей на 2 порядка по сравнению с этим показателем в группе «Контроль» и в 5 раз - в группе «БЦЖ». Ранее в литературе был

описан протективный эффект кандидатной векторной противотуберкулезной БЦЖ-бустерной вакцины DAR-901, который заключался в снижении обсемененности микобактериями паренхиматозных органов мышей линии C57BL/6 приблизительно на 1 порядок [161].

Протективный эффект препарата «ЛТБвак» подтвержден также на модели острого туберкулеза у морских свинок альбиносов: отмечено статистически достоверное снижение микобактериальной нагрузки в легких животных 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 морских свинок на 4 порядка, по сравнению с этим показателем в группе «Контроль», и на 1 порядок - в группе «БЦЖ». Таким образом уровень протективности препарата «ЛТБвак» был выше, чем у описанной ранее кандидатной субъединичной рекомбинантной БЦЖ-бустерной вакцины «ГамТБвак» [294].

Данные экспериментов по оценке выживаемости животных, морфологии внутренних органов и гистологических срезов паренхиматозных органов подтвердили наличие протективного эффекта препарата «ЛТБвак» против туберкулезной инфекции у мышей линии C57BL/6 и морских свинок альбиносов.

Терапевтический эффект препарата «ЛТБвак» продемонстрирован на модели хронической туберкулезной инфекции у мышей линии C57BL/6, моделированной путем внутрибрюшинного заражения штаммом *M. tuberculosis* H37Rv в дозе 1×10^4 КОЕ/животное. Трехкратное введение данного препарата мышам, больным хроническим туберкулезом, на 16, 19 и 22 неделях после заражения обеспечивало статистически достоверное снижение микобактериальной обсемененности легких мышей на 1 порядок, по сравнению с аналогичным показателем в контрольных группах, а также в селезенке мышей – на 1 порядок, по сравнению с группой «Контроль» и в 2 раза - по сравнению с этим показателем для препарата сравнения «ГамТБвак». Изучение морфологии внутренних органов и гистологических срезов паренхиматозных органов подтвердило наличие терапевтического эффекта препарата «ЛТБвак» против хронической туберкулезной инфекции у мышей линии C57BL/6.

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 изучаемые 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 β -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 пиразинамиду) 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 В0/W148 и САО, 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 В0/W148 и САО, на иммунную систему животных, который выражался в изменении 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*) в тканях легких. Различия в динамике изменений уровней транскрипции этих генов, по-видимому, свидетельствовали о различиях в механизмах вирулентности как клинических штаммов генетических клад В0/W148 и САО 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 C57BL/6 и у морских свинок альбиносов. Это проявлялось в статистически достоверном снижении микобактериальной нагрузки в легких и селезенке животных в результате двукратной иммунизации препаратом «ЛТБвак» 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 C57BL/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 селезенок мышей, по сравнению с аналогичным показателем в контрольных группах, что подтверждено изучением морфологии внутренних органов и гистологических срезов паренхиматозных органов животных.

Полученные данные вносят вклад в понимание механизмов формирования фенотипа МЛУ и вирулентности современных генетических сублиний возбудителя туберкулеза; особенностей влияния *M. tuberculosis* на иммунную систему организма-хозяина, связанных с изменениями экспрессии генов цитокинов в тканях легких; механизмов адаптации патогена к стрессовым условиям окружающей среды внутри клеток макроорганизма, в том числе за счет изменения уровней экспрессии мнРНК; возможности эффективного использования бустерных рекомбинантных вакцин для совершенствования схем профилактики и терапии туберкулеза у человека.

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 C57BL/6, показателей обсемененности и гистологической картины срезов паренхиматозных органов. Определена их принадлежность к широко распространенным в РФ генетическим кладам CAO и B0/W148 генотипа Beijing. Штаммы депонированы в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск», 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 C57BL/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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БЦЖ	Бацилла Кальметта-Герена
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ЗФР	Забуференный физиологический раствор
ЛТБИ	Латентная туберкулезная инфекция
МЛУ	Множественно лекарственно-устойчивый туберкулез
мнРНК	Малые некодирующие РНК
МПК	Минимальные подавляющие концентрации
мРНК	Матричная РНК
МФ	Макрофаг
нкРНК	Некодирующие РНК
НТО	Нетранслируемая область
п.з.	После заражения
п.о.	Пар оснований
пред-ШЛУ	Туберкулез с пред-широкой лекарственной устойчивостью
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
рРНК	Рибосомальные РНК
РФ	Российская Федерация
СС	Клональные комплексы
ТБ	Туберкулез
ТБИ	Туберкулезная инфекция
ШЛУ	Туберкулез с широкой лекарственной устойчивостью
АМК	Амикацин
САР	Капреомицин
СІР	Ципрофлоксацин
COVID-19	Коронавирусная инфекция
СТАВ	Бромид цетилтриметиламмония
DMSO	Диметилсульфоксид
dNTP	Дезоксинуклеозидтрифосфат
EDTA	Этилендиаминтетрауксусная кислота

EMB	Этамбутол
INH	Изониазид
KAN	Канамицин
LVX	Левофлоксацин
LZD	Линезолид
MFX	Моксифлоксацин
OFX	Офлоксацин
PZA	Пиразинамид
RIF	Рифампицин
SDS	Додецилсульфата натрия
SNPs	Однонуклеотидные полиморфизмы (от англ. single nucleotide polymorphisms)
STR	Стрептомицин
VNTR	Вариабельное количество tandemных повторов (от англ. variable number of tandem repeats)
WGS	Полногеномное секвенирование (от англ. whole genome sequencing)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреевская, С.Н. Трансмиссия штаммов микобактерий туберкулеза, обусловленная миграционными процессами в Российской Федерации (на примере миграции населения из Кавказского региона в Москву и Московскую область) / С.Н. Андреевская, Л.Н. Черноусова, Т.Г. Смирнова, Е.Е. Ларионова, А.В. Кузьмин // Пробл. Туб. Бол. Легк. – 2006. – №. 1. – С. 29-35.
2. Беспярых, Ю.А. Вирулентность *Mycobacterium tuberculosis* генотипа Beijing в условиях *in vivo* / Ю.А. Беспярых, Т.И. Виноградова, О.А. Маничева, Н.В. Заболотных, М.З. Догондзе, М.Л. Витовская, А.С. Гуляев, В.Ю. Журавлев, Е.А. Шитиков, Е.Н. Ильина // Инф. Иммуно. - 2019. – N. 9, №1. – С. 173-182.
3. Богун, А.Г. Филогенетический анализ клинических изолятов *Mycobacterium tuberculosis* с использованием 35 вариабельных тандемных повторов и шести однонуклеотидных полиморфизмов / А.Г. Богун, С.А. Благодатских, Т.Н. Мухина, Н.В. Майская, И.Г. Шемякин // Туб. Соц.-Значим. Забол. - 2013. – Т. 2. - С. 5-11.
4. Домотенко, Л.В. Определение чувствительности *M. tuberculosis* к противотуберкулезным препаратам второго ряда с использованием XDR-теста в клинических исследованиях и в международных циклах профессионального тестирования / Л.В. Домотенко, Т.П. Морозова, М.В. Храмов, А.П. Шепелин // Туб. Бол. Легк. – 2021. – Т. 99, № 8. – С. 13-20.
5. 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 // Бактериол. – 2017. – Т. 2, № 1. - С. 35–45.
6. Методические рекомендации Департамента здравоохранения г. Москвы «Алгоритм молекулярно-генетической и микробиологической диагностики туберкулеза», Москва, 2018 г. <https://mosgorzdrav.ru/ru-RU/science/default/download/556.html>
7. Нарвская, О.В. Характеристика циркулирующих на Северо-Западе России штаммов *Mycobacterium tuberculosis* с использованием сполиготипирования / О.В.

Нарвская, И.В. Мокроусов, Е.В. Лимещенко, Л.Н. Стеклова, Т.Ф. Оттен, Б.И. Вишневский // Пробл. Туб. - 2002. – Т. 4. - С. 44-48.

8. Нечаева, О.Б. Эпидемическая ситуация по туберкулезу в России / О.Б. Нечаева // Туб. Бол. Легк. – 2018. – Т. 96, № 8. – С. 15-24.

9. Севастьянова, Э.В. Культуральный метод исследования микобактерий. Жидкие питательные среды и автоматизированные системы / Э.В. Севастьянова, Т.Г. Смирнова, Е.Е. Ларионова, Л.Н. Черноусова // Вест. ЦНИИТ. – 2020. - № 4. - С. 88–95.

10. Старшинова, А.А. Результаты применения иммунологических тестов нового поколения у детей в условиях массовой вакцинации против туберкулеза / А.А. Старшинова, С.М. Ананьев, Ю.Э. Овчинникова, Н.В. Корнева, И.Ф. Довгалюк // Туб. Бол. Легк. – 2017. – Т. 95, № 5. – С. 46-52.

11. Федеральные клинические рекомендации по организации и проведению микробиологической и молекулярно-генетической диагностики туберкулеза. Российское общество фтизиатров, Москва, 2014 г. http://roftb.ru/netcat_files/doks/rm.pdf

12. Черноусова, Л.Н. Биологические свойства штаммов *M. tuberculosis* кластера W / Л.Н. Черноусова, С.Н. Андреевская, Т.Г. Смирнова, З.С. Земскова, Е.Е. Ларионова // Проб. Туб. Бол. Легк. - 2008. – Т. 10. - С. 45-50.

13. Шрамко, П.А. Моделирование хронической туберкулёзной инфекции у мышей методом внутрибрюшинного заражения и анализ активации аминогуанидином мутантов штамма H37RV с делециями по генам RPF / П.А. Шрамко, Н.С. Грищенко, Т.И. Рудницкая, В.Д. Потапов, А.С. Капрельянц, С.Ф. Бикетов // Туб. Бол. Легк. – 2010. – Т. 87, № 4. – С. 47-50.

14. Aagaard, C. Detection of bovine tuberculosis in herds with different disease prevalence and influence of paratuberculosis infection on PPDB and ESAT-6/CFP10 specificity / C. Aagaard, M. Govaerts, V. Meikle, J.A. Gutiérrez-Pabello, J. McNair, P. Andersen, F. Suárez-Güemes, J. Pollock, C. Espitia, A. Cataldi // Prev. Vet. Med. – 2010. – Vol. 96, N 3-4. – P. 161-169.

15. Abdallah, A.M. Mycobacterial secretion systems ESX-1 and ESX-5 play distinct roles in host cell death and inflammasome activation / A.M. Abdallah, J. Bestebroer, N.D. Savage, K. de Punder, M. van Zon, L. Wilson, C.J. Korbee, A.M. van der Sar, T.H. Ottenhoff, N.N. van der Wel, W. Bitter, P.J. Peters // J. Immunol. – 2011. – Vol. 187, N 9. – P. 4744-4753.

16. Abdallah, A.M. Type VII secretion--mycobacteria show the way / A.M. Abdallah, N.C. Gey van Pittius, P.A. Champion, J. Cox, J. Luirink, C.M. Vandenbroucke-Grauls, B.J. Appelmek, W. Bitter // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2007. – Vol. 5, N 11. – P. 883-891.
17. Abomoelak, B. Characterization of a novel heat shock protein (Hsp22.5) involved in the pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis* / B. Abomoelak, S.A. Marcus, S.K. Ward, P.C. Karakousis, H. Steinberg, A.M. Talaat // *J. Bacteriol.* – 2011. – Vol. 193, N 14. – P. 3497-3505.
18. Abramovitch, R.B. aprABC: a *Mycobacterium tuberculosis* complex-specific locus that modulates pH-driven adaptation to the macrophage phagosome / R.B. Abramovitch, K.H. Rohde, F.F. Hsu, D.G. Russell // *Mol. Microbiol.* – 2011. – Vol. 80, N 3. – P. 678-694.
19. Agarwal, N. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* sigma factor SigM by assessment of virulence and identification of SigM-dependent genes / N. Agarwal, S.C. Woolwine, S. Tyagi, W.R. Bishai // *Infect. Immun.* – 2007. – Vol. 75, N 1. – P. 452-461.
20. Aguilar-Ayala, D.A. The transcriptome of *Mycobacterium tuberculosis* in a lipid-rich dormancy model through RNAseq analysis / D.A. Aguilar-Ayala, L. Tilleman, F. Van Nieuwerburgh, D. Deforce, J.C. Palomino, P. Vandamme, J.A. Gonzalez-Y-Merchand, A. Martin // *Sci. Rep.* – 2017. – Vol. 7, N 1. – P. 17665.
21. Al-Saeedi, M. Diversity and evolution of drug resistance mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis* / M. Al-Saeedi, Al-Hajoj S // *Infect. Drug Resist.* – 2017. – Vol. 13, N 10. – P. 333-342.
22. Ami, V.K.G. Genome-wide identification of the context-dependent sRNA expression in *Mycobacterium tuberculosis* / V.K.G. Ami, R. Balasubramanian, S.R. Hegde // *BMC Genom.* – 2020. – Vol. 21, N 1. – P. 167.
23. Arnvig, K.B. Identification of small RNAs in *Mycobacterium tuberculosis* / K.B. Arnvig, D.B. Young // *Mol. Microbiol.* – 2009. – Vol. 73, N 3. – P. 397-408.
24. Arnvig, K.B. The mechanism of upstream activation in the *rrnB* operon of *Mycobacterium smegmatis* is different from the *Escherichia coli* paradigm / K.B. Arnvig, B. Gopal, K.G. Papavinasasundaram, R.A. Cox, M.J. Colston // *Microbiol.* – 2005. – Vol. 151. – P. 467–473.
25. Arora, G. Understanding the role of PknJ in *Mycobacterium tuberculosis*: biochemical characterization and identification of novel substrate pyruvate kinase A / G. Arora,

A. Sajid, M. Gupta, A. Bhaduri, P. Kumar, S. Basu-Modak, Y. Singh // PLoS One. – 2010. – Vol. 5, N 5. – P. e10772.

26. Arrey, F. Humanized Mouse Model Mimicking Pathology of Human Tuberculosis for *in vivo* Evaluation of Drug Regimens / F. Arrey, D. Löwe, S. Kuhlmann, P. Kaiser, P. Moura-Alves, G. Krishnamoorthy, L. Lozza, J. Maertzdorf, T. Skrahina, A. Skrahina, M. Gengenbacher, G. Nouailles, S.H.E. Kaufmann // Front. Immunol. – 2019. – Vol. 10. – P. 89.

27. Arruda, S. Cloning of an *M. tuberculosis* DNA fragment associated with entry and survival inside cells / S. Arruda, G. Bomfim, R. Knights, T. Huima-Byron, L.W. Riley // Science. – 1993. – Vol. 261, N 5127. – P. 1454-1457.

28. 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 // Biochem. (Mosc). – 2015. – Vol. 80, N 13. – P. 1633-1646.

29. Bacon, J. Non-replicating *Mycobacterium tuberculosis* elicits a reduced infectivity profile with corresponding modifications to the cell wall and extracellular matrix / J. Bacon, L.J. Alderwick, J.A. Allnut, E. Gabasova, R. Watson, K.A. Hatch, S.O. Clark, R.E. Jeeves, A. Marriott, E. Rayner, H. Tolley, G. Pearson, G. Hall, G.S. Besra, L. Wernisch, A. Williams, P.D. Marsh // PLoS One. – 2014. – Vol. 9, N 2. – P. e87329.

30. Baker, J.J. Genetic and metabolic regulation of *Mycobacterium tuberculosis* acid growth arrest / J.J. Baker, R.B. Abramovitch // Sci. Rep. – 2018. – Vol. 8, N 1. P4168.

31. Bansal, R. *Mycobacterium tuberculosis* virulence-regulator PhoP interacts with alternative sigma factor SigE during acid-stress response / R. Bansal, V. Anil Kumar, R.R. Sevalkar, P.R. Singh, D. Sarkar // Mol. Microbiol. – 2017. – Vol. 104, N 3. – P. 400–411.

32. Barry, C.E. 3rd, Interpreting cell wall virulence factors of *Mycobacterium tuberculosis* / C.E. 3rd Barry // Trends Microbiol. – 2001. – Vol. 9. – P. 237-241.

33. Be, N.A. Role of *Mycobacterium tuberculosis* *pknD* in the pathogenesis of central nervous system tuberculosis / N.A. Be, W.R. Bishai, S.K. Jain // BMC Microbiol. – 2012. – Vol. 12. – P. 7.

34. Belisle, J.T. Isolation of genomic DNA from mycobacteria / J.T. Belisle, M.G. Sonnenberg // Meth. Mol. Biol. – 1998. – Vol. 101. – P. 31-44.

35. Bespyatykh, J. System OMICs analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing B0/W148 cluster / J. Bespyatykh, E. Shitikov, A. Guliaev, A. Smolyakov, K. Klimina, V.

Veselovsky, M. Malakhova, G. Arapidi, M. Dogonadze, O. Manicheva, D. Bespiatykh, I. Mokrousov, V. Zhuravlev, E. Ilina, V. Govorun // *Sci. Rep.* – 2019. – Vol. 9, N 1. – P. 19255.

36. Betts, J.C. Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling / J.C. Betts, P.T. Lukey, L.C. Robb, R.A. McAdam, K. Duncan // *Mol. Microbiol.* – 2002. – Vol. 3. – P. 717-731.

37. Bhatt, A. Deletion of *kasB* in *Mycobacterium tuberculosis* causes loss of acid-fastness and subclinical latent tuberculosis in immunocompetent mice / A. Bhatt, N. Fujiwara, K. Bhatt, S.S. Gurucha, L. Kremer, B. Chen, J. Chan, S.A. Porcelli, K. Kobayashi, G.S. Besra, W.R. Jr. Jacobs // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2007. – Vol. 104, N 12. – P. 5157-5162.

38. Bigi, F. Mutation in the P36 gene of *Mycobacterium bovis* provokes attenuation of the bacillus in a mouse model / F. Bigi, A. Gioffré, L. Klepp, M.P. Santangelo, C.A. Velicovsky, G.H. Giambartolomei, C.A. Fossati, M.I. Romano, T. Mendum, J.J. McFadden, A. Cataldi // *Tubercul. (Edinb.)*. – 2005. – Vol. 85, N 4. – P. 221-226.

39. Bikandi, J. In silico analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR, and endonuclease restriction / J. Bikandi, R. San Millán, A. Rementeria, J. Garaizar // *Bioinform.* – 2004. – Vol. 20. – P. 798-799.

40. Biketov, S. Culturability of *Mycobacterium tuberculosis* cells isolated from murine macrophages: a bacterial growth factor promotes recovery / S. Biketov, G.V. Mukamolova, V. Potapov, E. Gilenkov, G. Vostroknutova, D.B. Kell, M. Young, A.S. Kaprelyants // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* – 2000. – Vol. 29, N 4. – P. 233-240.

41. Biketov, S. The role of resuscitation promoting factors in pathogenesis and reactivation of *Mycobacterium tuberculosis* during intra-peritoneal infection in mice / S. Biketov, V. Potapov, E. Ganina, K. Downing, B.D. Kana, A. Kaprelyants // *BMC Infect. Dis.* – 2007. – Vol. 7. – P. 146.

42. Biswas, T. Structural insight into serine protease Rv3671c that Protects *M. tuberculosis* from oxidative and acidic stress / T. Biswas, J. Small, O. Vandal, T. Odaira, H. Deng, S. Ehrt, O.V. Tsodikov // *Structure.* – 2010. – Vol. 18, N 10. – P. 1353-1363.

43. Blomgran, R. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits neutrophil apoptosis, leading to delayed activation of naive CD4 T cells / R. Blomgran, L. Desvignes, V. Briken, J.D. Ernst // *Cell Host Microbe.* – 2012. – Vol. 11, N 1. – P. 81-90.

44. Boon, C. *Mycobacterium bovis* BCG response regulator essential for hypoxic dormancy / C. Boon, T. Dick // *J. Bacteriol.* – 2002. – Vol. 184, N 24. – P. 6760-6767.

45. Botella, H. Mycobacterial p(1)-type ATPases mediate resistance to zinc poisoning in human macrophages / H. Botella, P. Peyron, F. Levillain, R. Poincloux, Y. Poquet, I. Brandli, C. Wang, L. Tailleux, S. Tilleul, G.M. Charrière, S.J. Waddell, M. Foti, G. Lugo-Villarino, Q. Gao, I. Maridonneau-Parini, P.D. Butcher, P.R. Castagnoli, B. Gicquel, C. de Chastellier, O. Neyrolles // *Cell Host Microbe*. – 2011. – Vol. 10, N 3. – P. 248-259.
46. Bottai, D. Disruption of the ESX-5 system of *Mycobacterium tuberculosis* causes loss of PPE protein secretion, reduction of cell wall integrity and strong attenuation / D. Bottai, M. Di Luca, L. Majlessi, W. Frigui, R. Simeone, F. Sayes, W. Bitter, M.J. Brennan, C. Leclerc, G. Batoni, M. Campa, R. Brosch, S. Esin // *Mol. Microbiol.* – 2012. – Vol. 83, N 6. – P. 1195-1209.
47. Bottai, D. TbD1 deletion as a driver of the evolutionary success of modern epidemic *Mycobacterium tuberculosis* lineages / D. Bottai, W. Frigui, F. Sayes, M. Di Luca, D. Spadoni, A. Pawlik, M. Zoppo, M. Orgeur, V. Khanna, D. Hardy, S. Mangenot, V. Barbe, C. Medigue, L. Ma, C. Bouchier, A. Tavanti, G. Larrouy-Maumus, R. Brosch // *Nat. Commun.* – 2020. – Vol. 11, N 1. – P. 684.
48. Bourigault, M.L. Relative contribution of IL-1 α , IL-1 β and TNF to the host response to *Mycobacterium tuberculosis* and attenuated *M. bovis* BCG / M.L. Bourigault, N. Segueni, S. Rose, N. Court, R. Vacher, V. Vasseur, F. Erard, M. Le Bert, I. Garcia, Y. Iwakura, M. Jacobs, B. Ryffel, V.F. Quesniaux // *Immun. Inflamm. Dis.* – 2013. - Vol. 1, N 1. – P. 47-62.
49. Brazier, B. Towards new TB vaccines / B. Brazier, H. McShane // *Semin. Immunopathol.* – 2020. – Vol. 42, N 3. – P. 315-331.
50. Bretl, D.J. Adaptation to environmental stimuli within the host: two-component signal transduction systems of *Mycobacterium tuberculosis* / D.J. Bretl, C. Demetriadou, T.C. Zahrt // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2011. – Vol. 75, N 4. – P. 566-582.
51. Brites, D. Co-evolution of *Mycobacterium tuberculosis* and *Homo sapiens* / D. Brites, S. Gagneux // *Immunol. Rev.* – 2015. – Vol. 264, N 1. – P. 6-24.
52. Burian, J. The mycobacterial antibiotic resistance determinant WhiB7 acts as a transcriptional activator by binding the primary sigma factor SigA (RpoV) / J. Burian, G. Yim, M. Hsing, P. Axerio-Cilies, A. Cherkasov, G.B. Spiegelman, C.J. Thompson // *Nucl. Acids Res.* – 2013. – Vol. 41, N 22. – P. 10062-10076.

53. Butler, S.M. Self-compartmentalized bacterial proteases and pathogenesis / S.M. Butler, R.A. Festa, M.J. Pearce, K.H. Darwin // *Mol. Microbiol.* – 2006. – Vol. 60, N 3. – P. 553-562.
54. Bychenko, O. *Mycobacterium tuberculosis* Small RNA MTS1338 Confers Pathogenic Properties to Non-Pathogenic *Mycobacterium smegmatis* / O. Bychenko, Y. Skvortsova, R. Ziganshin, A. Grigorov, L. Aseev, A. Ostrik, A. Kaprelyants, E.G. Salina, T. Azhikina // *Microorganisms.* – 2021. – Vol. 9, N 2. – P. 414.
55. Calamita, H. The *Mycobacterium tuberculosis* SigD sigma factor controls the expression of ribosome-associated gene products in stationary phase and is required for full virulence / H. Calamita, C. Ko, S. Tyagi, T. Yoshimatsu, N.E. Morrison, W.R. Bishai // *Cell Microbiol.* – 2005. – Vol. 7, N 2. – P. 233-244.
56. Capuano, S.V. Experimental *Mycobacterium tuberculosis* infection of *cynomolgus macaques* closely resembles the various manifestations of human *M. tuberculosis* infection / S.V. Capuano, D.A. Croix, S. Pawar, A. Zinovik, A. Myers, P.L. Lin, S. Bissel, C. Fuhrman, E. Klein, J.L. Flynn // *Infect. Immun.* – 2003. – Vol. 10. – P. 5831-5844.
57. Casali, N. Evolution and transmission of drug-resistant tuberculosis in a Russian population / N. Casali, V. Nikolayevskyy, Y. Balabanova, S.R. Harris, O. Ignatyeva, I. Kontsevaya, J. Corander, J. Bryant, J. Parkhill, S. Nejentsev, R.D. Horstmann, T. Brown, A. Drobniewski // *Nat. Genet.* – 2014. - Vol. 46, N 3. - P. 279–286.
58. Chan, E.D. Animal Models of Mycobacteria Infection / E.D. Chan, D. Verma, D.J. Ordway // *Curr. Protoc. Immunol.* – 2020. – Vol. 129, N 1. – P. e98.
59. Chang, D.P.S. Metabolic Versatility of *Mycobacterium tuberculosis* during Infection and Dormancy / D.P.S. Chang, X.L. Guan // *Metabolites.* – 2021. – Vol. 11, N 2. – P. 88.
60. Chang, J.C. *igr* Genes and *Mycobacterium tuberculosis* cholesterol metabolism / J.C. Chang, M.D. Miner, A.K. Pandey, W.P. Gill, N.S. Harik, C.M. Sasseti, D.R. Sherman // *J. Bacteriol.* – 2009. – Vol. 191, N 16. – P. 5232-5239.
61. Chao, J.D. Convergence of Ser/Thr and two-component signaling to coordinate expression of the dormancy regulon in *Mycobacterium tuberculosis* / J.D. Chao, K.G. Papavinasundaram, X. Zheng, A. Chávez-Steenbock, X. Wang, G.Q. Lee, Y. Av-Gay // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285, N 38. – P. 29239-29246.

62. Cheruvu, M. The acid-induced operon Rv3083-Rv3089 is required for growth of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages / M. Cheruvu, B.B. Plikaytis, T.M. Shinnick // *Tubercul. (Edinb.)*. – 2007. – Vol. 87, N 1. – P. 12-20.
63. Cho, H.Y. Structural insight into the heme-based redox sensing by DosS from *Mycobacterium tuberculosis* / H.Y. Cho, H.J. Cho, Y.M. Kim, J.I. Oh, B.S. Kang // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284, N 19. – P. 13057-13067.
64. Cho, S.H. Low-oxygen-recovery assay for high-throughput screening of compounds against nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis* / S.H. Cho, S. Warit, B. Wan, C.H. Hwang, G.F. Pauli, S.G. Franzblau // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2007. – Vol. 51. – P. 1380-1385.
65. Chopra, P. Cytotoxic activity of nucleoside diphosphate kinase secreted from *Mycobacterium tuberculosis* / P. Chopra, A. Singh, A. Koul, S. Ramachandran, K. Drlica, A.K. Tyagi, Y. Singh // *Eur. J. Biochem.* – 2003. – Vol. 270, N 4. – P. 625-634.
66. Cilloni, L. The potential impact of the COVID-19 pandemic on the tuberculosis epidemic a modelling analysis / L. Cilloni, H. Fu, J.F. Vesga, D. Dowdy, C. Pretorius, S. Ahmedov, S.A. Nair, A. Mosneaga, E. Masini, S. Sahu, N. Arinaminpathy // *EClinicalMedicine*. – 2020. – Vol. 28. – P. 100603.
67. Cirillo, S.L. Protection of *Mycobacterium tuberculosis* from reactive oxygen species conferred by the mel2 locus impacts persistence and dissemination / S.L. Cirillo, S. Subbian, B. Chen, T.R. Weisbrod, W.R. Jr Jacobs, J.D. Cirillo // *Infect. Immun.* – 2009. – Vol. 77, N 6. – P. 2557-2567.
68. Cohen-Gonsaud, M. The *Mycobacterium tuberculosis* Ser/Thr kinase substrate Rv2175c is a DNA-binding protein regulated by phosphorylation / M. Cohen-Gonsaud, P. Barthe, M.J. Canova, C. Stagier-Simon, L. Kremer, C. Roumestand, V. Molle // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284, N 29. – P. 19290-192300.
69. Colditz, G.A. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis: meta-analysis of the published literature / G.A. Colditz, T.F. Brewer, C.S. Berkey, M.E. Wilson, E. Burdick, H.V. Fineberg, F. Mosteller // *JAMA*. – 1994. – Vol. 271, N 9. – P. 698–702.
70. Cole, S.T. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence / S.T. Cole, R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S.V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C.E. 3rd Barry, F. Tekaia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N.

Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh, J. McLean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M.A. Quail, M.A. Rajandream, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, J.E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead, B.G. Barrell // *Nature*. – 1998. – Vol. 393, N. 6685. P. 537-544.

71. Collaborative Cross Consortium. The genome architecture of the Collaborative Cross mouse genetic reference population / Collaborative Cross Consortium // *Genetics*. – 2012. – Vol. 190, N 2. – P. 389-401.

72. Comas, I. Whole-genome sequencing of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains identifies compensatory mutations in RNA polymerase genes / I. Comas, S. Borrell, A. Roetzer, G. Rose, B. Malla, M. Kato-Maeda, J. Galagan, S. Niemann, S. Gagneux // *Nat. Genet.* – 2011. – Vol. 44, N 1. – P. 106-110.

73. Commandeur, S. Zebrafish Embryo Model for Assessment of Drug Efficacy on Mycobacterial Persisters / S. Commandeur, N. Iakobachvili, M. Sparrius, M.M. Nur, G.V. Mukamolova, W. Bitter // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2020. – Vol. 64, N 10. – P. e00801-20.

74. Conradie, F. Nix-TB Trial Team. Treatment of Highly Drug-Resistant Pulmonary Tuberculosis / F. Conradie, A.H. Diacon, N. Ngubane, P. Howell, D. Everitt, A.M. Crook, C.M. Mendel, E. Egizi, J. Moreira, J. Timm, T.D. McHugh, G.H. Wills, A. Bateson, R. Hunt, C. Van Niekerk, M. Li, M. Olugbosi, M. Spigelman // *N. Engl. J. Med.* – 2020. – Vol. 382, N 10. – P. 893-902.

75. Corper, H.J. The virulence of tubercle bacilli and the fallacy of assuming the grade of virulence from arbitrary designations / H.J. Corper, M.L. Cohn // *Am. Rev. Tuberc.* – 1933. – Vol. 28. – P. 856-874.

76. Coskun, F.S. Small RNAs Asserting Big Roles in Mycobacteria / F.S. Coskun, P. Płociński, N.S.C. van Oers // *Noncod. RNA*. – 2021. – Vol. 7, N 4. – P. 69.

77. Cowley, S.C. Expression and localization of the *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase PtpA / S.C. Cowley, R. Babakaiff, Y. Av-Gay // *Res. Microbiol.* – 2002. – Vol. 153, N 4. – P. 233-241.

78. Dainese, E. Posttranslational regulation of *Mycobacterium tuberculosis* extracytoplasmic-function sigma factor sigma L and roles in virulence and in global regulation of gene expression / E. Dainese, S. Rodrigue, G. Delogu, R. Provvedi, L. Laflamme, R.

Brzezinski, G. Fadda, I. Smith, L. Gaudreau, G. Palù, R. Manganeli // *Infect. Immun.* – 2006. – Vol. 74, N 4. – P. 2457-2461.

79. Danelishvili, L. Secreted *Mycobacterium tuberculosis* Rv3654c and Rv3655c proteins participate in the suppression of macrophage apoptosis / L. Danelishvili, Y. Yamazaki, J. Selker, L.E. Bermudez // *PLoS One.* – 2010. – Vol. 5, N 5. – P. e10474.

80. Darwin, K.H. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* proteasomal ATPase homologue / K.H. Darwin, G. Lin, Z. Chen, H. Li, C.F. Nathan // *Mol. Microbiol.* – 2005. – Vol. 55, N 2. – P. 561-571.

81. Darwin, K.H. The proteasome of *Mycobacterium tuberculosis* is required for resistance to nitric oxide / K.H. Darwin, S. Ehrt, J.C. Gutierrez-Ramos, N. Weich, C.F. Nathan // *Science.* – 2003. – Vol. 302, N 5652. – P. 1963-1966.

82. de Mendonça-Lima, L. Erp, an extracellular protein family specific to mycobacteria / L. de Mendonça-Lima, M. Picardeau, C. Raynaud, J. Rauzier, Y.O. Goguet de la Salmonière, L. Barker, F. Bigi, A. Cataldi, B. Gicquel, J.M. Reyat // *Microbiology (Reading).* – 2001. – Vol. 147, N 8. – P. 2315-2320.

83. De Voss, J.J. Iron acquisition and metabolism by mycobacteria // J.J. De Voss, K. Rutter, B.G. Schroeder, C.E. 3rd Barry // *J. Bacteriol.* – 1999. – Vol. 181, N 15. – P. 4443-4451.

84. De Voss, J.J. The salicylate-derived mycobactin siderophores of *Mycobacterium tuberculosis* are essential for growth in macrophages / J.J. De Voss, K. Rutter, B.G. Schroeder, H. Su, Y. Zhu, C.E. 3rd Barry // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2000. – Vol. 97, N 3. – P. 1252-1257.

85. Deb, C. A novel *in vitro* multiple-stress dormancy model for *Mycobacterium tuberculosis* generates a lipid-loaded, drug-tolerant, dormant pathogen / C. Deb, C.M. Lee, V. Dubey, J. Daniel, B. Abomoelak, T. Sirakova, S. Pawar, L. Rogers, P.E. Kolattukudy // *PLoS One.* – 2009. – Vol. 4. – P. e6077.

86. DeJesus, M.A. Comprehensive Essentiality Analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Genome via Saturating Transposon Mutagenesis / M.A. DeJesus, E.R. Gerrick, W. Xu, S.W. Park, J.E. Long, C.C. Boutte, E.J. Rubin, D. Schnappinger, S. Ehrt, S.M. Fortune, C.M. Sassetti, T.R. Ioerger // *mBio.* – 2017. – Vol. 8, N 1. – P. e02133-16.

87. Deol, P. Role of *Mycobacterium tuberculosis* Ser/Thr kinase PknF: implications in glucose transport and cell division / P. Deol, R. Vohra, A.K. Saini, A. Singh, H. Chandra, P. Chopra, T.K. Das, A.K. Tyagi, Y. Singh // *J. Bacteriol.* – 2005. – Vol. 187, N 10. – P. 3415-3420.

88. Divangahi, M. Are tolerance and training required to end TB? / M. Divangahi // Nat. Rev. Immunol. – 2018. – Vol. 18, N 11. – P. 661-663.
89. Dookie, N. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a review on the molecular determinants of resistance and implications for personalized care / N. Dookie, S. Rambaran, N. Padayatchi, S. Mahomed, K. Naidoo // J. Antimicrob. Chemother. – 2018. – Vol. 73, N 5. – P. 1138-1151.
90. Dos Vultos, T. Evolution and Diversity of Clonal Bacteria: The Paradigm of *Mycobacterium tuberculosis* / T. Dos Vultos, O. Mestre, J. Rauzier, M. Golec, N. Rastogi, V. Rasolofo, T. Tonjum, C. Sola, I. Matic, B. Gicquel // PLoS ONE. - 2008. – Vol. 3. –P. e1538.
91. Dubnau, E. Oxygenated mycolic acids are necessary for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice / E. Dubnau, J. Chan, C. Raynaud, V.P. Mohan, M.A. Lanéelle, K. Yu, A. Quémard, I. Smith, M. Daffé // Mol. Microbiol. – 2000. – Vol. 36, N 3. – P. 630-637.
92. Dutta, N.K. Latent tuberculosis infection: myths, models, and molecular mechanisms / N.K Dutta, P.C. Karakousis // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2014. – Vol. 78, N 3. – P. 343-371.
93. Dutta, N.K. The stress-response factor SigH modulates the interaction between *Mycobacterium tuberculosis* and host phagocytes / N.K. Dutta, S. Mehra, A.N. Martinez, X. Alvarez, N.A. Renner, L.A. Morici, B. Pahar, A.G. Maclean, A.A. Lackner, D. Kaushal // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, N 1. – P. e28958.
94. Dymova, M.A. Highest prevalence of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype isolates in patients newly diagnosed with tuberculosis in the Novosibirsk oblast, Russian Federation / M.A. Dymova, V.N. Kinsht, A.G. Cherednichenko, E.A. Khrapov, A.V. Svistelnik, M.L. Filipenko // J. Med. Microbiol. – 2011. – Vol. 60, N 7. – P. 1003-1009.
95. Eldholm, V. Evolution of extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* from a susceptible ancestor in a single patient / V. Eldholm, G. Norheim, B. von der Lippe, W. Kinander, U.R. Dahle, D.A. Caugant, T. Mannsåker, A.T. Mengshoel, A.M. Dyrhol-Riise, F. Balloux // Genome. Biol. – 2014. – Vol. 15, N 11. – P. 490.
96. Elwood, R.L. Characterization of late tuberculosis infection in *Sigmodon hispidus* / R.L. Elwood, M. Rajnik, S. Wilson, K. Yim, J.C. Blanco, B. Nikonenko, V.G. Hemming // Tubercul. (Edinb). – 2009. – Vol. 89, N 2. – P. 183-188.

97. Eoh, H. Metabolic anticipation in *Mycobacterium tuberculosis* / H. Eoh, Z. Wang, E. Layre, P. Rath, R. Morris, D. Branch Moody, K.Y. Rhee // *Nat. Microbiol.* – 2017. – Vol. 2. – P. 17084.
98. Fallow, A. Strains of the East Asian (W/Beijing) lineage of *Mycobacterium tuberculosis* are DosS/DosT-DosR two-component regulatory system natural mutants / A. Fallow, P. Domenech, M.B. Reed // *J. Bacteriol.* – 2010. – Vol. 192, N 8. – P. 2228-2238.
99. Farhana, A. Mechanistic insights into a novel exporter-importer system of *Mycobacterium tuberculosis* unravel its role in trafficking of iron / A. Farhana, S. Kumar, S.S. Rathore, P.C. Ghosh, N.Z. Ehtesham, A.K. Tyagi, S.E. Hasnain // *PLoS One.* – 2008. – Vol. 3, N 5. – P. e2087.
100. Feldman, W.H. Frequency of administration of streptomycin; its influence on results of treatment of tuberculosis in guinea pigs / W.H. Feldman, H.C. Hinshaw, A.G. Karlson // *Am. Rev. Tuberc.* – 1947. – Vol. 55, N 5. – P. 435–443.
101. Feng, L. The pentapeptide-repeat protein, MfpA, interacts with mycobacterial DNA gyrase as a DNA T-segment mimic / L. Feng, J.E.A. Mundy, C.E.M. Stevenson, L.A. Mitchenall, D.M. Lawson, K. Mi, A. Maxwell // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2021. – Vol. 118, N 11. – P. e2016705118.
102. Forbes, B.A. Practice Guidelines for Clinical Microbiology Laboratories: Mycobacteria / B.A. Forbes, G.S. Hall, M.B. Miller, S.M. Novak, M.C. Rowlinson, M. Salfinger, A. Somoskövi, D.M. Warshauer, M.L. Wilson. // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2018. -Vol. 31, N 2. – P. e00038-17.
103. Forrellad, M.A. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex / M.A. Forrellad, L.I. Klepp, A. Gioffré, J. Sabio y García, H.R. Morbidoni, M. de la Paz Santangelo, A.A. Cataldi, F. Bigi // *Virulence.* – 2013. – Vol. 4, N 1. – P. 63-66.
104. Freeman, S. *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra and H37Rv differential growth and cytokine/chemokine induction in murine macrophages *in vitro* / S. Freeman, F.A. Post, L.G. Bekker, R. Harbacheuski, L.M. Steyn, B. Ryffel, N.D. Connell, B.N. Kreiswirth, G. Kaplan // *J. Inter. Cyt. Res.* – 2006. – Vol. 26. – P. 27–33.
105. Fridovich, I. Superoxide radical and superoxide dismutases / I. Fridovich // *Annu. Rev. Biochem.* – 1995. – Vol. 64. – P. 97-112.
106. Frieden, T.R. / Tuberculosis // T.R. Frieden, T.R. Sterling, S.S. Munsiff, C.J. Watt, C. Dye // *Lancet.* – 2003. – Vol. 362. – P. 887-899.

107. Frota, C.C. The AraC family transcriptional regulator Rv1931c plays a role in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* / C.C. Frota, K.G. Papavinasasundaram, E.O. Davis, M.J. Colston // *Infect. Immun.* – 2004. – Vol. 72, N 9. – P. 5483-5486.
108. Fu, L.M. Is *Mycobacterium tuberculosis* a closer relative to Gram-positive or Gram-negative bacterial pathogens? / L.M. Fu, C.S. Fu-Liu // *Tubercul. (Edinb.)*. – 2002. – Vol. 82, N 2-3. – P. 85-90.
109. Fursov, M.V. In vitro models of *Mycobacterium tuberculosis* dormancy, and in vivo models of latent tuberculosis infection / M.V. Fursov, I.A. Dyatlov, V.D. Potapov // *Klin. Lab. Diagn.* – 2019. – Vol. 64, N 5. – P. 299-307.
110. 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 // *Microorganisms.* – 2021. – Vol. 9, N 8. – P. 1792.
111. Galagan, J.E. The *Mycobacterium tuberculosis* regulatory network and hypoxia / J.E. Galagan, K. Minch, M. Peterson, A. Lyubetskaya, E. Azizi, L. Sweet, A. Gomes, T. Rustad, G. Dolganov, I. Glotova, T. Abeel, C. Mahwinney, A.D. Kennedy, R. Allard, W. Brabant, A. Krueger, S. Jaini, B. Honda, W.H. Yu, M.J. Hickey, J. Zucker, C. Garay, B. Weiner, P. Sisk, C. Stolte, J.K. Winkler, Y. Van de Peer, P. Iazzetti, D. Camacho, J. Dreyfuss, Y. Liu, A. Dorhoi, H.J. Mollenkopf, P. Drogaris, J. Lamontagne, Y. Zhou, J. Piquenot, S.T. Park, S. Raman, S.H. Kaufmann, R.P. Mohny, D. Chelsky, D.B. Moody, D.R. Sherman, G.K. Schoolnik // *Nature.* – 2013. – Vol. 499, N 7457. – P.178-83.
112. Gerrick, E.R. Fortune, Small RNA profiling in *Mycobacterium tuberculosis* identifies MsrI as necessary for an anticipatory iron sparing response / E.R. Gerrick, T. Barbier, M.R. Chase, R. Xu, J. Francois, V.H. Lin, M.J. Szucs, J.M. Rock, R. Ahmed, B. Tjaden, J. Livny, // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2018. - Vol. 115, N 25. - P. 6464–6469.
113. Ghosh, A. Survey of drug resistance associated gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis*, ESKAPE and other bacterial species / A. Ghosh, N. S. Saha // *Sci. Rep.* – 2020. – Vol. 10, N 1. – P. 8957.
114. Girardin, R.C. Small RNA Mcr11 requires the transcription factor AbmR for stable expression and regulates genes involved in the central metabolism of *Mycobacterium*

tuberculosis / R.C. Girardin, K.A. McDonough // Mol. Microbiol. – 2020. – Vol. 113, N 2. – P. 504-520.

115. Glickman, M.S. A novel mycolic acid cyclopropane synthetase is required for cording, persistence, and virulence of *Mycobacterium tuberculosis* / M.S. Glickman, J.S. Cox, W.R. Jr. Jacobs // Mol. Cell. – 2000. – Vol. 5, N. 4 – P. 717-727.

116. Global tuberculosis report 2017. Geneva: World Health Organization; 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. ISBN 978-92-4-156551-6

117. Global tuberculosis report 2019. Geneva: World Health Organization; 2019. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. ISBN 978-92-4-156571-4.

118. Global tuberculosis report 2020. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. ISBN 978-92-4-001314-8.

119. Global tuberculosis report 2021. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. ISBN 978-92-4-003702-1

120. Gonzalo-Asensio, J. PhoP: a missing piece in the intricate puzzle of *Mycobacterium tuberculosis* virulence / J. Gonzalo-Asensio, S. Mostowy, J. Harders-Westerveen, K. Huygen, R. Hernández-Pando, J. Thole, M. Behr, B. Gicquel, C. Martín // PLoS One. – 2008. – Vol. 3, N 10. – P. e3496.

121. Gopinath, V. Profiling the Proteome of *Mycobacterium tuberculosis* during Dormancy and Reactivation / V. Gopinath, S. Raghunandan, R.L. Gomez, L. Jose, A. Surendran, R. Ramachandran, A.R. Pushparajan, S. Mundayoor, A. Jaleel, R.A. Kumar // Mol. Cell Proteom. – 2015. – Vol. 14, N 8. – P. 2160-2176.

122. Gordillo, S. Usefulness of *acr* expression for monitoring latent *Mycobacterium tuberculosis* bacilli in 'in vitro' and 'in vivo' experimental models / S. Gordillo, E. Guirado, O. Gil, J. Díaz, I. Amat, S. Molinos, C. Vilaplana, V. Ausina, P.J. Cardona // Scand. J. Immunol. – 2006. – Vol. 64, N 1. – P. 30-39.

123. Gupta, M. Forkhead-associated domain-containing protein Rv0019c and polyketide-associated protein PapA5, from substrates of serine/threonine protein kinase PknB to interacting proteins of *Mycobacterium tuberculosis* / M. Gupta, A. Sajid, G. Arora, V. Tandon, Y. Singh // J. Biol. Chem. – 2009. – Vol. 284, N 50. – P. 34723-34734.

124. Gupta, R. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications / R. Gupta, Q.K. Beg, P. Lorenz // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2002. – Vol. 59, N 1. – P. 15-32.

125. Gupta, S. Transcriptional autoregulation by *Mycobacterium tuberculosis* PhoP involves recognition of novel direct repeat sequences in the regulatory region of the promoter / S. Gupta, A. Sinha, D. Sarkar // FEBS Lett. – 2006. – Vol. 580, N 22. – P. 5328–5338.
126. Gutierrez, M.C. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis* / M.C. Gutierrez, S. Brisse, R. Brosch, M. Fabre, B. Omais, M. Marmiesse, P. Supply, V. Vincent // PLoS Pathog. – 2005. – Vol. 1. – P. e5.
127. Gygli, S.M. Antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: mechanistic and evolutionary perspectives / S.M. Gygli, S. Borrell, A. Trauner, and S. Gagneux // FEMS Microbiol. Rev. – 2017. – Vol. 41. – P. 354–373.
128. Hanekom, M. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: a template for success / M. Hanekom, N.C. Gey van Pittius, C. McEvoy, T.C. Victor, P.D. Van Helden, R.M. Warren // Tubercul. (Edinb). – 2011. – Vol. 91, N 6. – P. 510-523.
129. Houben, R.M. The global burden of latent tuberculosis infection: a re-estimation using mathematical modelling / R.M. Houben, P.J. Dodd // PLoS Med. – 2016. – Vol. 13, N 10. – P. e1002152.
130. Houghton, J. A small RNA encoded in the Rv2660c locus of *Mycobacterium tuberculosis* is induced during starvation and infection / J. Houghton, T. Cortes, O. Schubert, G. Rose, A. Rodgers, M.D.X. Croix, A. Aebersold, D.B. Young, K.B. Arnvig // PLoS One. – 2013. – Vol. 8, N 12. – P. e80047.
131. Houghton, J.L. Chemical and structural insights into the regioversatility of the aminoglycoside acetyltransferase Eis / J.L. Houghton, T. Biswas, W. Chen, O.V. Tsodikov, S. Garneau-Tsodikova // Chembiochem. – 2013. – Vol. 14, N 16. – P. 2127-2135.
132. Hu, S. IL-17 Production of Neutrophils Enhances Antibacteria Ability but Promotes Arthritis Development During *Mycobacterium tuberculosis* Infection / S. Hu, W. He, X. Du, J. Yang, Q. Wen, X.P. Zhong, L. Ma // EBioMedicine. – 2017. – Vol. 23. – P. 88–99.
133. Hu, Y. Acute and persistent *Mycobacterium tuberculosis* infections depend on the thiol peroxidase Tpx / Y. Hu, A.R. Coates // PLoS One. – 2009. – Vol. 4, N 4. – P. e5150.
134. Hu, Y. Detection of mRNA transcripts and active transcription in persistent *Mycobacterium tuberculosis* induced by exposure to rifampin or pyrazinamide / Y. Hu, J.A. Mangan, J. Dhillon, K.M. Sole, D.A. Mitchison, P.D. Butcher, A.R. Coates // J. Bacteriol. – 2000. – Vol. 182. – P. 6358-6365.

135. Hu, Y. *Mycobacterium* RbpA cooperates with the stress-response sigmaB subunit of RNA polymerase in promoter DNA unwinding / Y. Hu, Z. Morichaud, A.S. Perumal, F. Roquet-Baneres, K. Brodolin // *Nucleic. Acids Res.* – 2014. – Vol. 42, N 16. – P. 10399–10408.
136. Hu, Y. The *Mycobacterium tuberculosis* sigJ gene controls sensitivity of the bacterium to hydrogen peroxide / Y. Hu, S. Kendall, N.G. Stoker, A.R. Coates // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2004. – Vol. 237, N 2. – P. 415-423.
137. Hu, Y. $\sigma(E)$ -dependent activation of RbpA controls transcription of the furA-katG operon in response to oxidative stress in mycobacteria / Y. Hu, Z. Wang, L. Feng, Z. Chen, C. Mao, Y. Zhu, S. Chen // *Mol. Microbiol.* – 2016. – Vol. 102, N 1. – P. 107-120.
138. Iantomasi, R. PE_PGRS30 is required for the full virulence of *Mycobacterium tuberculosis* / R. Iantomasi, M. Sali, A. Cascioferro, I. Palucci, A. Zumbo, S. Soldini, S. Rocca, E. Greco, G. Maulucci, M. De Spirito, M. Fraziano, G. Fadda, R. Manganelli, G. Delogu // *Cell Microbiol.* – 2012. – Vol. 14, N 3. – P. 356-367.
139. Ignatov, D.V. Dormant non-culturable *Mycobacterium tuberculosis* retains stable low-abundant mRNA / D.V. Ignatov, E.G. Salina, M.V. Fursov, T.A. Skvortsov, T.L. Azhikina, A.S. Kaprelyants // *BMC Genomics.* – 2015. – Vol. 16. – P. 954.
140. James, B.W. *In vitro* gene expression dissected: chemostat surgery for *Mycobacterium tuberculosis* / B.W. James, J. Bacon, T. Hampshire, K. Morley, P.D. Marsh // *Comp. Funct. Genomics.* – 2002. – Vol. 3. – P. 345-347.
141. Jastrab, J.B. An adenosine triphosphate-independent proteasome activator contributes to the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* / J.B. Jastrab, T. Wang, J.P. Murphy, L. Bai, K. Hu, R. Merks, J. Huang, C. Chatterjee, H. Ova, S.P. Gygi, H. Li, K.H. Darwin // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2015. – Vol. 112, N 14. – P. E1763–E1772.
142. Jayakumar, D. Protein kinase E of *Mycobacterium tuberculosis* has a role in the nitric oxide stress response and apoptosis in a human macrophage model of infection / D. Jayakumar, W.R. Jr. Jacobs, S. Narayanan // *Cell Microbiol.* – 2008. – Vol. 10, N 1. – P. 365-374.
143. Joshi, S.M. Characterization of mycobacterial virulence genes through genetic interaction mapping / S.M. Joshi, A.K. Pandey, N. Capite, S.M. Fortune, E.J. Rubin, C.M. Sassetti // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2006. – Vol. 103, N 31. – P. 11760-11765.
144. Kamerbeek, J. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology / J. Kamerbeek, L. Schouls, A. Kolk, M. van

Agterveld, D. van Soolingen, S. Kuijper, A. Bunschoten, H. Molhuizen, R. Shaw, M. Goyal, J. van Embden // *J. Clin. Microbiol.* – 1997. – Vol. 35. – P. 907–914.

145. Kapoor, N. Human granuloma in vitro model, for TB dormancy and resuscitation / N. Kapoor, S. Pawar, T.D. Sirakova, C. Deb, W.L. Warren, P.E. Kolattukudy // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8, N 1. – P. e53657.

146. Kaprelyants, A.S. Dormancy in non-sporulating bacteria / A.S. Kaprelyants, J.C. Gottschal, D.B. Kell // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1993. – Vol. 10, N 3-4. – P. 271–285.

147. Karakousis, P.C. Altered expression of isoniazid-regulated genes in drug-treated dormant *Mycobacterium tuberculosis* / P.C. Karakousis, E.P. Williams, W.R. Bishai // *Antimicrob. Chemother.* – 2008. – Vol 61, N 2. – P. 323–331.

148. Karakousis, P.C. Dormancy phenotype displayed by extracellular *Mycobacterium tuberculosis* within artificial granulomas in mice / P.C. Karakousis, T. Yoshimatsu, G. Lamichhane, S.C. Woolwine, E.L. Nuermberger, J. Grosset, W.R. Bishai // *J. Exp. Med.* – 2004. – Vol. 200, N 5. – P. 647-657.

149. Karls, R.K. Examination of *Mycobacterium tuberculosis* sigma factor mutants using low-dose aerosol infection of guinea pigs suggests a role for SigC in pathogenesis / R.K. Karls, J. Guarner, D.N. McMurray, K.A. Birkness, F.D. Quinn // *Microbiology.* – 2006. – Vol. 152, N 6. – P. 1591-1600.

150. Kashino, S.S. Guinea pig model of *Mycobacterium tuberculosis* latent/dormant infection / S.S. Kashino, D.R. Napolitano, Z. Skobe, A. Campos-Neto // *Microb. Infect.* – 2008. – Vol. 10, N 14-15. – P. 1469-1476.

151. Kashino, S.S. Unique model of dormant infection for tuberculosis vaccine development / S.S. Kashino, P. Owendale, A. Izzo, A. Campos-Neto // *Clin. Vaccine Immunol.* – 2006. – Vol. 9. – P. 1014-1021.

152. Kazlauskienė, M. A cyclic oligonucleotide signaling pathway in type III CRISPR-Cas systems / M. Kazlauskienė, G. Kostiuk, Č. Venclovas, G. Tamulaitis, V. Siksnyš // *Science.* – 2017. – Vol. 357, N 6351. – P. 605-609.

153. Khan, S. Phosphorylation of enoyl-acyl carrier protein reductase InhA impacts mycobacterial growth and survival / S. Khan, S.N. Nagarajan, A. Parikh, S. Samantaray, A. Singh, D. Kumar, R.P. Roy, A. Bhatt, V.K. Nandicoori // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285, N 48. – P. 37860-37871.

154. Khoshnood, S. Novel vaccine candidates against *Mycobacterium tuberculosis* / S. Khoshnood, M. Heidary, M. Haeili, M. Drancourt, D. Darban-Sarokhalil, M.J. Nasiri, V. Lohrasbi // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2018. – Vol. 120, N A. – P. 180-188.
155. Kim, D.Y. Structure and function of HtrA family proteins, the key players in protein quality control / D.Y. Kim, K.K. Kim // *J. Biochem. Mol. Biol.* – 2005. – Vol. 38, N 3. – P. 266-274.
156. Koonin, E.V. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems / E.V. Koonin, K.S. Makarova, F. Zhang // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2017. – Vol. 37. – P. 67-78.
157. Koonin, E.V. Mobile Genetic Elements and Evolution of CRISPR-Cas Systems: All the Way There and Back / E.V. Koonin, K.S. Makarova // *Genome. Biol. Evol.* – 2017. – Vol. 9, N 10. – P. 2812-2825.
158. Kramnik, I. Mouse models of human TB pathology: roles in the analysis of necrosis and the development of host-directed therapies / I. Kramnik, G. Beamer // *Semin. Immunopathol.* – 2016. – Vol. 38, N 2. – P. 221–237.
159. Kumari, P. Sustained expression of DevR/DosR during long-term hypoxic culture of *Mycobacterium tuberculosis* / P. Kumari, K. Sikri, K. Kaur, U.D. Gupta, J.S. Tyagi // *Tubercul. (Edinb).* – 2017. – Vol. 106. - P. - 33-37.
160. Laederach, J. Pupylated proteins are subject to broad proteasomal degradation specificity and differential depupylation / J. Laederach, H. Cui, E. Weber-Ban // *PLoS One.* – 2019. – Vol. 14, N 4. – P. e0215439.
161. Lahey, T. Immunogenicity and Protective Efficacy of the DAR-901 Booster Vaccine in a Murine Model of Tuberculosis / T. Lahey, D. Laddy, K. Hill, J. Schaeffer, A. Hogg, J. Keeble, B. Dagg, M.M. Ho, R.D. Arbeit, C.F. von Reyn // *PLoS One.* – 2016. – Vol. 11, N 12. – P. e0168521.
162. Lee, J.H. Role of stress response sigma factor SigG in *Mycobacterium tuberculosis* / J.H. Lee, D.E. Geiman, W.R. Bishai // *J. Bacteriol.* – 2008. – Vol. 190, N 3. – P. 1128-1133.
163. Li, A.H. Contrasting transcriptional responses of a virulent and an attenuated strain of *Mycobacterium tuberculosis* infecting macrophages / A.H. Li, S.J. Waddell, J. Hinds, C.A. Malloff, M. Bains, R.E. Hancock, W.L. Lam, P.D. Butcher, R.W. Stokes // *PLoS One.* – 2010. – Vol. 5, N 6. – P. e11066.

164. Li, L. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens / L. Li, N. Mendis, H. Trigui, J.D. Oliver, S.P. Faucher // *Front. Microbiol.* – 2014. – Vol. 5 – P. 258.
165. Ligon, L.S. The ins and outs of *Mycobacterium tuberculosis* protein export / L.S. Ligon, J.D. Hayden, M. Braunstein // *Tubercul. (Edinb).* – 2012. – Vol. 92, N 2. – P. 121-132.
166. Lin, P.L. Quantitative comparison of active and latent tuberculosis in the *cynomolgus macaque* model / P.L. Lin, M. Rodgers, L. Smith, M. Bigbee, A. Myers, C. Bigbee, I. Chiosea, S.V. Capuano, C. Fuhrman, E. Klein, J.L. Flynn // *Infect. Immun.* – 2009. – Vol. 10. – P. 4631-4642.
167. Liu, K. pckA-deficient *Mycobacterium bovis* BCG shows attenuated virulence in mice and in macrophages / K. Liu, J. Yu, D.G. Russell // *Microbiology.* – 2003. – Vol. 149, N 7. – P. 1829-1835.
168. Livak, K.J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-DDCT method / K.J. Livak, T.D. Schmittgen // *Methods.* - 2001. Vol. 25. – P. 402–408.
169. López, B. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes / B. López, D. Aguilar, H. Orozco, M. Burger, C. Espitia, V. Ritacco, L. Barrera, K. Kremer, R. Hernandez-Pando, K. Huygen, D. van Soolingen // *Clin. Exp. Immunol.* – 2003. – Vol. 133, N 1. – P. 30-37.
170. Lun, S. Characterization of a novel cell wall-anchored protein with carboxylesterase activity required for virulence in *Mycobacterium tuberculosis* / S. Lun, W.R. Bishai // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282, N 25. – P. 18348-18356.
171. Maeurer, M.J. Interleukin-7 or interleukin-15 enhances survival of *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice / M.J. Maeurer, P. Trinder, G. Hommel, W. Walter, K. Freitag, D. Atkins, S. Störkel // *Infect. Immun.* – 2000. – Vol. 68. – P. 2962–2970.
172. Makinoshima, H., Site-2 proteases in prokaryotes: regulated intramembrane proteolysis expands to microbial pathogenesis / H. Makinoshima, M.S. Glickman // *Microb. Infect.* – 2006. – Vol. 8, N 7. – P. 1882-1888.
173. Malhotra, V. *Mycobacterium tuberculosis* protein kinase K confers survival advantage during early infection in mice and regulates growth in culture and during persistent infection: implications for immune modulation / V. Malhotra, L.T. Arteaga-Cortés, G. Clay, J.E. Clark-Curtiss // *Microbiology (Reading).* – 2010. – Vol. 156, N 9. – P. 2829-2841.

174. Manabe, Y.C. The aerosol rabbit model of TB latency, reactivation and immune reconstitution inflammatory syndrome / Y.C. Manabe, A.K. Kesavan, J. Lopez-Molina, C.L. Hatem, M. Brooks, R. Fujiwara, K. Hochstein, M.L. Pitt, J. Tufariello, J. Chan, D.N. McMurray, W.R. Bishai, A.M. Jr. Dannenberg, S. Mendez // *Tubercul. (Edinb)*. – 2008. – Vol. 3. – P. 187-196.
175. Manina, G. A Single-cell perspective on non-growing but metabolically active (NGMA) bacteria / G. Manina. In: *Pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis and its interaction with the host organism* Ed. Pieters J., McKinney J.D. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* - 2016. ISBN 978-3-642-40232-6.
176. Marsollier, L. Impact of *Mycobacterium ulcerans* biofilm on transmissibility to ecological niches and Buruli ulcer pathogenesis / L. Marsollier, P. Brodin, M. Jackson, J. Korduláková, P. Tafelmeyer, E. Carbonnelle, J. Aubry, G. Milon, P. Legras, J.P. André, C. Leroy, J. Cottin, M.L. Guillou, G. Reyset, S.T. Cole // *PLoS Pathog.* – 2007. – Vol. 3, N 5. – P. e62.
177. Master, S.S. *Mycobacterium tuberculosis* prevents inflammasome activation / S.S. Master, S.K. Rampini, A.S. Davis, C. Keller, S. Ehlers, B. Springer, G.S. Timmins, P. Sander, V. Deretic // *Cell Host Microbe.* – 2008. – Vol. 3, N 4. – P. 224-232.
178. Matsunaga, I. *Mycobacterium tuberculosis pks12* produces a novel polyketide presented by CD1c to T cells / I. Matsunaga, A. Bhatt, D.C. Young, T.Y. Cheng, S.J. Eyles, G.S. Besra, V. Briken, S.A. Porcelli, C.E. Costello, W.R. Jr. Jacobs, D.B. Moody // *J. Exp. Med.* – 2004. – Vol. 200, N 12. – P. 1559-1569.
179. Mawuenyega, K.G. *Mycobacterium tuberculosis* functional network analysis by global subcellular protein profiling / K.G.Mawuenyega, C.V. Forst, K.M. Dobos, J.T. Belisle, J. Chen, E.M. Bradbury, A.R. Bradbury, X. Chen // *Mol. Biol. Cell.* – 2005. – Vol. 16, N 1. – P. 396-404.
180. McCown, P.J. Riboswitch diversity and distribution / P.J. McCown, K.A. Corbino, S. Stav, M.E. Sherlock, R.R. Breaker // *RNA.* – 2017. – Vol. 23, N 7. – P. 995-1011.
181. McCune, R. The fate of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse tissues as determined by the microbial enumeration technique. II. The conversion of tuberculous infection to the latent state by the administration of pyrazinamide and a companion drug / R. McCune, W. McDermott, R. Tompsett // *J. Exp. Med.* – 1956. – Vol. 104, N 5. – P. 763–802.

182. Mears, J. Effect of study design and setting on tuberculosis clustering estimates using Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable Number Tandem Repeats (MIRU-VNTR): a systematic review / J. Mears, I. Abubakar, T. Cohen, T.D. McHugh, P. Sonnenberg // *BMJ Open*. – 2015. – Vol. 5, N 1. – P. e005636.
183. Mehta, P.K. Could mycobacterial MelF protein (Rv1936) be used as a potential drug target? / P.K. Mehta, R. Dharra, M. Kulharia // *Future Microbiol.* – 2018. – Vol. 13. – P. 1211-1214.
184. Menozzi, F.D. Identification of a heparin-binding hemagglutinin present in mycobacteria / F.D. Menozzi, J.H. Rouse, M. Alavi, M. Laude-Sharp, J. Muller, R. Bischoff, M.J. Brennan, C. Locht // *J. Exp. Med.* – 1996. – Vol. 184, N 3. – P. 993-1001.
185. Menozzi, F.D. Molecular characterization of the mycobacterial heparin-binding hemagglutinin, a mycobacterial adhesion / F.D. Menozzi, R. Bischoff, E. Fort, M.J. Brennan, C. Locht // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1998. – Vol. 95, N 21. – P. 12625-12630.
186. Merker, M. Compensatory evolution drives multidrug-resistant tuberculosis in Central Asia / M. Merker, M. Barbier, H. Cox, J.P. Rasigade, S. Feuerriegel, T.A. Kohl, R. Diel, S. Borrell, S. Gagneux, V. Nikolayevskyy, S. Andres, U. Nübel, P. Supply, T. Wirth, S. Niemann // *Elife*. – 2018. – Vol. 30, N 7. – P. e38200.
187. Merker, M. Evolutionary history and global spread of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage / M. Merker, C. Blin, S. Mona, N. Duforet-Frebourg, S. Lecher, E. Willery, M.G. Blum, S. Rüsç-Gerdes, I. Mokrousov, E. Aleksic, C. Allix-Béguet, A. Antierens, E. Augustynowicz-Kopeć, M. Ballif, F. Barletta, H.P. Beck, C.E. 3rd Barry, M. Bonnet, E. Borroni, I. Campos-Herrero, D. Cirillo, H. Cox, S. Crowe, V. Crudu, R. Diel, F. Drobniowski, M. Fauville-Dufaux, S. Gagneux, S. Ghebremichael, M. Hanekom, S. Hoffner, W.W. Jiao, S. Kalon, T.A. Kohl, I. Kontsevaya, T. Lillebæk, S. Maeda, V. Nikolayevskyy, M. Rasmussen, N. Rastogi, S. Samper, E. Sanchez-Padilla, B. Savic, I.C. Shamputa, A. Shen, L.H. Sng, P. Stakenas, K. Toit, F. Varaine, D. Vukovic, C. Wahl, R. Warren, P. Supply, S. Niemann, T. Wirth // *Nat. Genet.* – 2015. – Vol. 47, N 3. – P. 242-249.
188. Miller, J.L. The type I NADH dehydrogenase of *Mycobacterium tuberculosis* counters phagosomal NOX2 activity to inhibit TNF-alpha-mediated host cell apoptosis / J.L. Miller, K. Velmurugan, M.J. Cowan, V. Briken // *PLoS Pathog.* – 2010. – Vol. 6, N 4. – P. e1000864.

189. Miller, M.B. Parallel quorum sensing systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholerae* / M.B. Miller, K. Skorupski, D.H. Lenz, R.K. Taylor, B.L. Bassler // *Cell*. – 2002. – Vol. 110, N 3. – P. 303-314.
190. Millington, K.A. Rv3615c is a highly immunodominant RD1 (Region of Difference 1)-dependent secreted antigen specific for *Mycobacterium tuberculosis* infection / K.A. Millington, S.M. Fortune, J. Low, A. Garces, S.M. Hingley-Wilson, M. Wickremasinghe, O.M. Kon, A. Lalvani // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2011. – Vol. 108, N 14. – P. 5730-5735.
191. Miner, M.D. Role of cholesterol in *Mycobacterium tuberculosis* infection / M.D. Miner, J.C. Chang, A.K. Pandey, C.M. Sasseti, D.R. Sherman // *Indian. J. Exp. Biol.* – 2009. – Vol. 47, N 6. – P. 407-411.
192. Mokrousov, I. Evolution of drug resistance in different sub-lineages within *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype / I. Mokrousov, W.W. Jiao, G.Z. Sun, J.W. Liu, V. Valcheva, M. Li, O. Narvskaya, A.D. Shen // *Antimicrob. Agents Chemother.* - 2006. - Vol. 50. – P. 2820–2823.
193. Mokrousov, I. Insights into the origin, emergence, and current spread of a successful Russian clone of *Mycobacterium tuberculosis* / I. Mokrousov // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2013. – Vol. 26, N 2. – P. 342-360.
194. Mokrousov, I. PCR-based methodology for detecting multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family circulating in Russia / I. Mokrousov, T. Otten, A. Vyazovaya, E. Limeschenko, M.L. Filipenko, C. Sola, N. Rastogi, L. Steklova, B. Vyshnevskiy, O. Narvskaya // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 2003. – Vol. 22, N 6. – P. 342-348.
195. Monin, L. Chemokines in tuberculosis: The good, the bad and the ugly / L. Monin, S.A. Khader // *Semin. Immunol.* - 2014. – Vol. 26. – P. 552–558.
196. Munita, J.M. Mechanisms of Antibiotic Resistance / J.M. Munita, C.A. Arias // *Microbiol. Spectr.* – 2016. – Vol. 4, N 2. – P. 10.1128/microbiolspec.
197. Mustafa, A.S. Immunological characterization of proteins expressed by genes located in *Mycobacterium tuberculosis*-specific genomic regions encoding the ESAT6-like proteins / A.S. Mustafa, // *Vaccines (Basel)*. – 2021. – Vol. 9, N 1. – P. 27.
198. Nagabhushanam, V. Innate Inhibition of Adaptive Immunity: *Mycobacterium tuberculosis* -Induced IL-6 Inhibits Macrophage Responses to IFN- γ / V. Nagabhushanam, A. Solache, L.M. Ting, C.J. Escaron, J.Y. Zhang, J.D. Ernst / *J. Immunol.* – 2003. – Vol. 171. – P. 4750–4757.

199. Nasiri, M.J. New Insights in to the Intrinsic and Acquired Drug Resistance Mechanisms in Mycobacteria / M.J. Nasiri, M. Haeili, M. Ghazi, H. Goudarzi, A. Pormohammad, A.A. Imani Fooladi, M.M. Feizabadi // *Front. Microbiol.* – 2017. – Vol. 25, N 8. – P. 681.
200. Nawrocki, E.P. Rfam 12.0: updates to the RNA families database / E.P. Nawrocki, S.W. Burge, A. Bateman, J. Daub, R.Y. Eberhardt, S.R. Eddy, E.W. Floden, P.P. Gardner, T.A. Jones, J. Tate, R.D. Finn // *Nucl. Acids Res.* – 2015. - 43(Database issue). – P. 130-137.
201. Nelson, J.W. Riboswitches in eubacteria sense the second messenger c-di-AMP / J.W. Nelson, N. Sudarsan, K. Furukawa, Z. Weinberg, J.X. Wang, R.R. Breaker // *Nat. Chem. Biol.* – 2013. – Vol. 9, N 12. – P. 834-839.
202. Nemes, E. Prevention of *M. tuberculosis* infection with H4:IC31 vaccine or BCG revaccination / E. Nemes, H. Geldenhuys, V. Rozot, K.T. Rutkowski, F. Ratangee, N. Bilek, S. Mabwe, L. Makhetha, M. Erasmus, A. Toefy, H. Mulenga, W.A. Hanekom, S.G. Self, L.G. Bekker, R. Ryall, S. Gurunathan, C.A. DiazGranados, P. Andersen, I. Kromann, T. Evans, R.D. Ellis, B. Landry, D.A. Hokey, R. Hopkins, A.M. Ginsberg, T.J. Scriba, M. Hatherill, C-040-404 Study Team // *N. Engl. J. Med.* – 2018. – Vol. 379, N 2. – P. 138-149.
203. Neyrolles, O. Recent advances in deciphering the contribution of *Mycobacterium tuberculosis* lipids to pathogenesis / O. Neyrolles, C. Guilhot // *Tubercul. (Edinb).* – 2011. – Vol. 91, N 3. – P. 187-195.
204. Nguyen, L. Antibiotic resistance mechanisms in *M. tuberculosis*: an update / L. Nguyen // *Arch. Toxicol.* – 2016. – Vol. 90, N 7. – P. 1585-1604.
205. Nicklisch, N. Rib lesions in skeletons from early Neolithic sites in central Germany: on the trail of tuberculosis at the onset of agriculture / N. Nicklisch, F. Maixner, R. Ganslmeier, S. Friederich, N. Dresely, H. Meller, A. Zink, K.W. Alt // *Am. J. Phys. Anthropol.* – 2012. – Vol. 149, N 3. – P. 391e404.
206. Niemann, S. Impact of genetic diversity on the biology of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains / S. Niemann, M. Merker, T. Kohl, P. Supply // *Microbiol. Spectr.* – 2016. – Vol. 4. – P. 6.
207. Nunn, A.J. A trial of a shorter regimen for rifampin-resistant tuberculosis / A.J. Nunn, P.P.J. Phillips, S.K. Meredith, C.Y. Chiang, F. Conradie, D. Dalai, A. van Deun, P.T. Dat, N. Lan, I. Master, T. Mebrahtu, D. Meressa, R. Moodliar, N. Ngubane, K. Sanders, S.B. Squire,

G. Torrea, B. Tsogt, I.D. Rusen; STREAM Study Collaborators // *N. Engl. J. Med.* – 2019. – Vol. 380. – P. 1201-1213.

208. O’Leary, S. IL-10 blocks phagosome maturation in *Mycobacterium tuberculosis*-infected human macrophages / S. O’Leary, O, M.P. Sullivan; J. Keane // *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* – 2011. – Vol. 45. – P. 172–180.

209. Ohol, Y.M. *Mycobacterium tuberculosis* MycP1 protease plays a dual role in regulation of ESX-1 secretion and virulence / Y.M. Ohol, D.H. Goetz, K. Chan, M.U. Shiloh, C.S. Craik, J.S. Cox // *Cell Host Microbe.* – 2010. – Vol. 7, N 3. – P. 210-220.

210. Okonechnikov, K. Advanced multi-sample quality control for high-throughput sequencing data Qualimap 2 / K. Okonechnikov, A. Conesa, F. García-Alcalde // *Bioinform.* – 2016. – Vol. 32. – P. 292–294.

211. Panda, A. Genome-wide analysis of horizontally acquired genes in the genus *Mycobacterium* / A. Panda, M. Drancourt, T. Tuller, P. Pontarotti // *Sci. Rep.* – 2018. – Vol. 8, N 1. – P. 14817.

212. Pandey, A.K. Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol / A.K. Pandey, C.M. Sasseti // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2008 – Vol. 105, N 11. – P. 4376-4380.

213. Papavinasasundaram, K.G. Deletion of the *Mycobacterium tuberculosis* pknH gene confers a higher bacillary load during the chronic phase of infection in BALB/c mice / K.G. Papavinasasundaram, B. Chan, J.H. Chung, M.J. Colston, E.O. Davis, Y. Av-Gay // *J. Bacteriol.* – 2005. – Vol. 187, N 16. – P. 5751-5760.

214. Parida, B.K. Interactions of anti-sigma factor antagonists of *Mycobacterium tuberculosis* in the yeast two-hybrid system / B.K. Parida, T. Douglas, C. Nino, S. Dhandayuthapani // *Tubercul. (Edinb).* – 2005. – Vol. 85, N 5-6. – P. 347-355.

215. Parish, T. Deletion of two-component regulatory systems increases the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* / T. Parish, D.A. Smith, S. Kendall, N. Casali, G.J. Bancroft, N.G. Stoker // *Infect. Immun.* – 2003. – Vol. 71, N 3. – P. 1134-1140.

216. Parish, T. The senX3-regX3 two-component regulatory system of *Mycobacterium tuberculosis* is required for virulence / T. Parish, D.A. Smith, G. Roberts, J. Betts, N.G. Stoker // *Microbiology (Reading).* – 2003. – Vol. 149, N 6. – P. 1423-1435.

217. Parish, T. Two-Component Regulatory Systems of Mycobacteria / T. Parish // *Microbiol. Spectr.* – 2014. – Vol. 2, N 1. – P. MGM2-0010-2013.

218. Parwati, I. Possible underlying mechanisms for successful emergence of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains / I. Parwati, R. van Crevel, D. van Soolingen // *Lancet Infect. Dis.* – 2010. – Vol. 10, N 2. – P.103-111.
219. Pérez, J. *Mycobacterium tuberculosis* transporter MmpL7 is a potential substrate for kinase PknD / J. Pérez, R. Garcia, H. Bach, J.H. de Waard, W.R. Jr. Jacobs, Y. Av-Gay, J. Bubis, H.E. Takiff // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2006. – Vol. 348, N 1. – P. 6-12.
220. Pethe, K. The heparin-binding haemagglutinin of *M. tuberculosis* is required for extrapulmonary dissemination / K. Pethe, S. Alonso, F. Biet, G. Delogu, M.J. Brennan, C. Locht, F.D. Menozzi // *Nature.* – 2001. – Vol. 412, N 6843. – P. 190-194.
221. Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR / M.W. Pfaffl // *Nucl. Acids Res.* – 2001. – Vol. 29, N 9. – P. e45.
222. Phyu, S. A mouse model for latent tuberculosis / S. Phyu, T. Mustafa, T. Hofstad, R. Nilsen, R. Fosse, G. Bjune // *Scand. J. Infect. Dis.* – 1998. – Vol. 1, N 30. – P. 59-68.
223. Prados-Rosales, R. *Mycobacteria* release active membrane vesicles that modulate immune responses in a TLR2-dependent manner in mice / R. Prados-Rosales, A. Baena, L.R. Martinez, J. Luque-Garcia, R. Kalscheuer, U. Veeraraghavan, C. Camara, J.D. Nosanchuk, G.S. Besra, B. Chen, J. Jimenez, A. Glatman-Freedman, W.R. Jr Jacobs, S.A. Porcelli, A. Casadevall // *J. Clin. Invest.* – 2011. – Vol. 121, N 4. – P. 1471-1483.
224. Purkayastha, A. Identification of a *Mycobacterium tuberculosis* putative classical nitroreductase gene whose expression is coregulated with that of the *acr aene* within macrophages, in standing versus shaking cultures, and under low oxygen conditions / A. Purkayastha, L.A. McCue, K.A. McDonough // *Infect. Immun.* – 2002. – Vol. 70, N 3. – P. 1518-1529.
225. Queval, C.J. *Mycobacterium tuberculosis* controls phagosomal acidification by targeting CISH-mediated signaling / C.J. Queval, O.R. Song, J.P. Carralot, J.M. Saliou, A. Bongiovanni, G. Deloison, N. Deboosère, S. Jouny, R. Iantomasi, V. Delorme, A.S. Debrie, S.J. Park, J.C. Gouveia, S. Tomavo, R. Brosch, A. Yoshimura, E. Yeramian, P. Brodin // *Cell Rep.* – 2017. – Vol. 20, N 13. – P. 3188–3198.
226. Radaeva, T.V. A human-like TB in genetically susceptible mice followed by the true dormancy in a Cornell-like model / T.V. Radaeva, E.V. Kondratieva, V.V. Sosunov, K.B. Majorov, A. Apt // *Tubercul. (Edinb).* – 2008. – Vol. 88. – P. 576-585.

227. Radaeva, T.V. Direct comparison of low-dose and Cornell-like models of chronic and reactivation tuberculosis in genetically susceptible I/St and resistant B6 mice / T.V. Radaeva, B.V. Nikonenko, V.V. Mischenko, M.M. Jr. Averbakh., A.S. Apt // *Tubercul. (Edinb)*. – 2005. – Vol. 1, N 2. – P. 65-72.
228. Rahman, K. Reprogramming the endogenous type III-A CRISPR-Cas system for genome editing, RNA interference and CRISPRi screening in *Mycobacterium tuberculosis* / K. Rahman, M. Jamal, X. Chen, W. Zhou, B. Yang, Y. Zou, W. Xu, Y. Lei, C. Wu, X. Cao, R. Tyagi, M.A. Naeem, D. Lin, Z. Habib, N. Peng, Z. Fu, G. Cao // *BioRxiv*. – 2020. - doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.09.983494>.
229. Ramakrishnan, L. Granuloma-specific expression of *Mycobacterium* virulence proteins from the glycine-rich PE-PGRS family / L. Ramakrishnan, N.A. Federspiel, S. Falkow // *Science*. – 2000. – Vol. 288, N 5. – P. 1436-1439.
230. Rangaka, M.X. Predictive value of interferon- γ release assays for incident active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis / M.X. Rangaka, K.A. Wilkinson, J.R. Glynn, D. Ling, D. Menzies, J. Mwansa-Kambafwile, K. Fielding, R.J. Wilkinson, M. Pai // *Lancet Infect. Dis*. – 2012. – Vol. 12, N 1. – P. 45-55.
231. Rangel-Santiago, J.F. A novel role of Yin-Yang-1 in pulmonary tuberculosis through the regulation of the chemokine CCL4 / J.F. Rangel-Santiago, G.J. Baay-Guzman, M.A. Duran-Padilla, K.A. Lopez-Boehm, B.L. Garcia-Romero, D.D. Hernandez-Cueto, G. Pantoja-Escobar, M.I. Vega, R. Hernandez-Pando, S. Huerta-Yepez // *Tubercul.* – 2016. – Vol. 96. – P. 87–95.
232. Rao, V. *Mycobacterium tuberculosis* controls host innate immune activation through cyclopropane modification of a glycolipid effector molecule / V. Rao, N. Fujiwara, S.A. Porcelli, M.S. Glickman // *J. Exp. Med.* – 2005. – Vol. 201, N 4. – P. 535-543.
233. Rastogi, N. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis / N. Rastogi, E. Legrand, C. Sola // *Rev. Sci. Tech.* – 2001. – Vol. 20, N. 1. – P. 21-54.
234. Ravn, P. Human T cell responses to the ESAT-6 antigen from *Mycobacterium tuberculosis* / P. Ravn, A. Demissie, T. Eguale, H. Wondwosson, D. Lein, H.A. Amoudy, A.S. Mustafa, A.K. Jensen, A. Holm, I. Rosenkrands, F. Oftung, J. Olobo, F. von Reyn, P. Andersen // *J. Infect. Dis.* – 1999. – Vol. 179, N 3. – P. 637-645.

235. Raynaud, C. The functions of OmpATb, a pore-forming protein of *Mycobacterium tuberculosis* / C. Raynaud, K.G. Papavinasasundaram, R.A. Speight, B. Springer, P. Sander, E.C. Böttger, M.J. Colston, P. Draper // *Mol. Microbiol.* – 2002. – Vol. 46, N 1. – P. 191-201.
236. Rezwan, M. Lipoprotein synthesis in mycobacteria / M. Rezwan, T. Grau, A. Tschumi, P. Sander // *Microbiology (Reading)*. – 2007. – Vol. 153, N 3. – P. 652-658.
237. Ribeiro, S.C.M. *Mycobacterium tuberculosis* strains of the modern sublineage of the Beijing family are more likely to display increased virulence than strains of the ancient sublineage / S.C.M. Ribeiro, L.L. Gomes, E.P. Amaral, M.R.M. Andrade, F.M. Almeida, A.L. Rezende, V.R. Lanes, E.C.Q. Carvalho, P.N. Suffys, I. Mokrousov, E.B. Lasunskiaia // *J. Clin. Microbiol.* – 2014. – Vol. 52, N 7. – P. 2615–2624.
238. Roberts, G. Control of CydB and GltA1 expression by the SenX3 RegX3 two component regulatory system of *Mycobacterium tuberculosis* / G. Roberts, I.S. Vadrevu, M.V. Madiraju, T. Parish // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6, N 6. – P. e21090.
239. Rock, J.M. Fortune, Programmable transcriptional repression in mycobacteria using an orthogonal CRISPR interference platform / J.M. Rock, F.F. Hopkins, A. Chavez, M. Diallo, M.R. Chase, E.R. Gerrick, J.R. Pritchard, G.M. Church, E.J. Rubin, C.M. Sassetti, D. Schnappinger // *Nat. Microbiol.* – 2017. – Vol. 2. – P. 16274.
240. Rodrigues-Junior, V.S. Toxicological profile of IQG-607 after single and repeated oral administration in minipigs: An essential step towards phase I clinical trial / V.S. Rodrigues-Junior, L. Cintra, P. Machado, A. Dadda, L.A. Basso, A.C.C.N. Mafra, A.H. Campos, M.M. Campos, D.S. Santos // *Regul. Toxicol. Pharmacol.* – 2017. – Vol. 90. – P. 78-86.
241. Rodriguez, G.M. IdeR, an essential gene in *Mycobacterium tuberculosis*: role of IdeR in iron-dependent gene expression, iron metabolism, and oxidative stress response / G.M. Rodriguez, M.I. Voskuil, B. Gold, G.K. Schoolnik, I. Smith // *Infect. Immun.* – 2002. – Vol. 70, N 7. – P. 3371-3381.
242. Rojas Echenique, J.I. Modular epistasis and the compensatory evolution of gene deletion mutants / J.I. Rojas Echenique, S. Kryazhimskiy, Ba A.N. Nguyen, M.M. Desai // *PLoS Genet.* – 2019. – Vol. 15, N 2. – P. e1007958.
243. Ryndak, M. PhoP, a key player in *Mycobacterium tuberculosis* virulence / M. Ryndak, S. Wang, I. Smith // *Trends Microbiol.* – 2008. – Vol. 16, N 11. – P. 528–534.

244. Ryndak, M.B. The *Mycobacterium tuberculosis* high-affinity iron importer, IrtA, contains an FAD-binding domain / M.B. Ryndak, S. Wang, I. Smith, G.M. Rodriguez // *J. Bacteriol.* – 2010. – Vol. 192, N 3. – P. 861-869.
245. Sachdeva, P. The sigma factors of *Mycobacterium tuberculosis*: regulation of the regulators / P. Sachdeva, R. Misra, A.K. Tyagi, Y. Singh // *FEBS J.* – 2010. – Vol. 277, N 3. – P. 605–626.
246. Sakula, A. Robert Koch: centenary of the discovery of the tubercle bacillus, 1882 / A. Sakula // *Can. Vet. J.* – 1983. – Vol. 24, N 4. - P.127-131.
247. Sala, C. Simple model for testing drugs against nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis* / C. Sala, N. Dhar, R.C. Hartkoorn, M. Zhang, Y.H. Ha, P. Schneider, P. Schneider, S.T. Cole // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2010. – Vol. 54, N 10. – P. 4150-4158.
248. Salina, E.G. Potassium availability triggers *Mycobacterium tuberculosis* transition to, and resuscitation from, non-culturable (dormant) states / E.G. Salina, S.J. Waddell, N. Hoffmann, I. Rosenkrands, P.D. Butcher, A.S. Kaprelyants // *Open Biol.* – 2014. – Vol. 4, N 10. – P. 140106.
249. Sarathy, J. Fluoroquinolone Efficacy against Tuberculosis Is Driven by Penetration into Lesions and Activity against Resident Bacterial Populations / J. Sarathy, L. Blanc, N. Alvarez-Cabrera, P. O'Brien, I. Dias-Freedman, M. Mina, M. Zimmerman, F. Kaya, H.P. Ho Liang, B. Prideaux, J. Dietzold, P. Salgame, R.M. Savic, J. Linderman, D. Kirschner, E. Pienaar, V. Dartois // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2019. – Vol. 63, N 5. – P. e02516-18.
250. Sarkar, R. Modern lineages of *Mycobacterium tuberculosis* exhibit lineage-specific patterns of growth and cytokine induction in human monocyte-derived macrophages / R. Sarkar, L. Lenders, K.A. Wilkinson, R.J. Wilkinson, M.P. Nicol // *PLoS One.* – 2012. - Vol. 7, N 8. – P. e43170.
251. Sassetti, C.M. Genetic requirements for mycobacterial survival during infection / C.M. Sassetti, E.J. Rubin // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2003. – Vol. 100, N 22. – P.12989-12994.
252. Sayes, F. Multiplexed Quantitation of Intraphagocyte *Mycobacterium tuberculosis* Secreted Protein Effectors / F. Sayes, C. Blanc, L.S. Ates, N. Deboosere, M. Orgeur, F. Le Chevalier, M.I. Gröschel, W. Frigui, O.R. Song, R. Lo-Man, F. Brossier, W. Sougakoff, D. Bottai, P. Brodin, P. Charneau, R. Brosch, L. Majlessi // *Cell Rep.* – 2018. – Vol. 23, N 4. – P. 1072-1084.

253. Scherr, N. Survival of pathogenic mycobacteria in macrophages is mediated through autophosphorylation of protein kinase G / N. Scherr, P. Müller, D. Perisa, B. Combaluzier, P. Jenö, J. Pieters // *J. Bacteriol.* – 2009. – Vol. 191, N 14. – P. 4546-4554.
254. Schnappinger, D. Transcriptional Adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within Macrophages: Insights into the Phagosomal Environment / D. Schnappinger, S. Ehrt, M.I. Voskuil, Y. Liu, J.A. Mangan, I.M. Monahan, G. Dolganov, B. Efron, P.D. Butcher, C. Nathan, G.K. Schoolnik // *J. Exp. Med.* – 2003. – Vol. 198, N 5. – P. 693-704.
255. Schubert, O.T. Absolute Proteome Composition and Dynamics during Dormancy and Resuscitation of *Mycobacterium tuberculosis* / O.T. Schubert, C. Ludwig, M. Kogadeeva, M. Zimmermann, G. Rosenberger, M. Gengenbacher, L.C. Gillet, B.C. Collins, H.L. Röst, S.H. Kaufmann, U. Sauer, R. Aebersold // *Cell Host Microbe.* – 2015. – Vol. 18, N 1. – P. 96-108.
256. Schurr, E. Genetic Control of Host Susceptibility to Tuberculosis / E. Schurr, I. Kramnik In: *Handbook of Tuberculosis. Part: Immunology and Cell Biology.* Ed. S. H. E. Kaufmann, W. J. Button. Weinheim: Wiley-VCH, 2008. - P. 305-346. ISBN:9783527316830.
257. Shepelkova, G. Small Noncoding RNAs MTS0997 and MTS1338 Affect the Adaptation and Virulence of *Mycobacterium tuberculosis* / G. Shepelkova, V. Evstifeev, M. Jr. Averbakch, I. Sivokozov, A. Ergeshov, T. Azhikina, V. Yeremeev // *Microbiol. Res.* – 2021. – Vol. 12, - P. 186–195.
258. Shi, W. PhoY2 but not PhoY1 is the PhoU homologue involved in persisters in *Mycobacterium tuberculosis* / W. Shi, Y. Zhang // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2010. – Vol. 65, N 6. – P. 1237-1242.
259. Shimono, N. Hypervirulent mutant of *Mycobacterium tuberculosis* resulting from disruption of the mce1 operon / N. Shimono, L. Morici, N. Casali, S. Cantrell, B. Sidders, S. Ehrt, L.W. Riley // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2003. – Vol. 100, N 26. – P. 15918-15923.
260. Shitikov, E. Evolutionary pathway analysis and unified classification of East Asian lineage of *Mycobacterium tuberculosis* / E. Shitikov, S. Kolchenko, I. Mokrousov, J. Bespyatykh, D. Ischenko, E. Ilina, V. Govorun // *Sci. Rep.* – 2017. – Vol. 7, N 1. – P. 9227.
261. Shitikov, E. Simple assay for detection of the central Asia outbreak clade of the mycobacterium tuberculosis Beijing genotype / E. Shitikov, A. Vyazovaya, M. Malakhova, A. Guliaev, J. Bespyatykh, E. Proshina, O. Pasechnik, I. Mokrousov // *J. Clin. Microbiol.* – 2019. – Vol. 57. - P. e00215-19.

262. Shleeva, M.O. Dormant ovoid cells of *Mycobacterium tuberculosis* are formed in response to gradual external acidification / M.O. Shleeva, Y.K. Kudykina, G.N. Vostroknutova, N.E. Suzina, A.L. Mulyukin, A.S. Kaprelyants // *Tubercul. (Edinb)*. – 2011. – Vol. 91, N 2. – P. 146-154.
263. Shleeva, M.O. Formation and resuscitation of "non-culturable" cells of *Rhodococcus rhodochrous* and *Mycobacterium tuberculosis* in prolonged stationary phase / M.O. Shleeva, K. Bagramyan, M.V. Telkov, G.V. Mukamolova, M. Young, D.B. Kell, A.S. Kaprelyants // *Microbiology*. – 2002. – Vol. 148, N 5. – P. 1581-1591.
264. Shoub, H.L. A Comparison of the Ziehl-Neelsen and Schulte-Tigges Methods of Staining Tubercle Bacilli. / H.L. Shoub // *J. Bacteriol.* – 1923. – Vol. 8, N 2. – P. 121-126.
265. Shrivastava, R. Intra- and intermolecular domain interactions among novel twocomponent system proteins coded by Rv0600c, Rv0601c and Rv0602c of *Mycobacterium tuberculosis* / R. Shrivastava, A.K. Ghosh, A.K. Das // *Microbiology*. – 2009. – Vol. 155, N 3. – P. 772-779.
266. Silva, M.S. Mutations in *katG*, *inhA*, and *ahpC* genes of Brazilian isoniazid-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* / M.S. Silva, S.G. Senna, M.O. Ribeiro, A.R. Valim, M.A. Telles, A. Kritski, G.P. Morlock, R.C. Cooksey, A. Zaha, M.L. Rossetti // *J. Clin. Microbiol.* – 2003. – Vol. 41, N 9. – P. 4471-4474.
267. Singh, A. Analysis of *Mycobacteriaceae* Reveals Horizontal Gene Transfer-Mediated Evolution of the CRISPR-Cas System in the *Mycobacterium tuberculosis* Complex / A. Singh, M. Gaur, V. Sharma, P. Khanna, A. Bothra, A. Bhaduri, A.K. Mondal, D. Dash, Y. Singh, R. Misra // *Comparative Genomic. mSystems*. – 2021. – Vol. 6, N 1. – P. e00934-20.
268. Singh, A.K. Animal models of tuberculosis: Lesson learnt / A.K. Singh, U.D. Gupta // *Indian. J. Med. Res.* – 2018. – Vol. 147, N 5. – P. 456-463.
269. Singh, R. Deciphering the genes involved in pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis* / R. Singh, A. Singh, A.K. Tyagi // *Tubercul. (Edinb)*. – 2005. – Vol. 85, N 5-6. – P. 325-335.
270. Singh, R. Recent updates on drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* / R. Singh, S.P. Dwivedi, U.S. Gaharwar, R. Meena, P. Rajamani, T. Prasad // *J. Appl. Microbiol.* – 2020. – Vol. 128, N 6. – P. 1547-1567.
271. Singhal, A. Experimental tuberculosis in the Wistar rat: a model for protective immunity and control of infection / A. Singhal, el M. Aliouat, M. Hervé, V. Mathys, M. Kiass,

C. Creusy, B. Delaire, L. Tsenova, L. Fleurisse, J. Bertout, L. Camacho, D. Foo, H.C. Tay, J.Y. Siew, W. Boukhouchi, M. Romano, B. Mathema, V. Dartois, G. Kaplan, P. Bifani // PLoS One. – 2011. – Vol. 6, N 4. – P. e18632.

272. Sklar, J.G. M. tuberculosis intramembrane protease Rip1 controls transcription through three anti-sigma factor substrates / J.G. Sklar, H. Makinoshima, J.S. Schneider, M.S. Glickman // Mol. Microbiol. – 2010. – Vol. 77, N 3. – P. 605-617.

273. Smollett, K.L. SigG does not control gene expression in response to DNA damage in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv / K.L. Smollett, L.F. Dawson, E.O. Davis // J. Bacteriol. – 2011. – Vol. 193, N 4. – P. 1007-1011.

274. Solans, L. The PhoP-dependent ncRNA Mcr7 modulates the TAT secretion system in *Mycobacterium tuberculosis* / L. Solans, J. Gonzalo-Asensio, C. Sala, A. Benjak, S. Uplekar, J. Rougemont, C. Guilhot, W. Malaga, C. Martín, S.T. Cole // PLoS Pathog. – 2014. – Vol. 10, N 5. – P. e1004183.

275. Srivastava, S. Tedizolid, Faropenem, and Moxifloxacin Combination With Potential Activity Against Nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis* / S. Srivastava, K.N. Cirrincione, D. Deshpande, T. Gumbo // Front. Pharmacol. – 2021. – Vol. 19, N 11. – P. 616294.

276. Stallings, C.L. Is *Mycobacterium tuberculosis* stressed out? A critical assessment of the genetic evidence // C.L. Stallings, M.S. Glickman // Microbes. Infect. – 2010. – Vol. 12, N 14-15. – P. 1091-1101.

277. Starshinova, A. A comparison of intradermal test with recombinant tuberculosis allergen (diaskintest) with other immunologic tests in the diagnosis of tuberculosis infection / A. Starshinova, V. Zhuravlev, I. Dovgaluk, A. Panteleev, V. Manina, U. Zinchenko, E. Istomina, M. Pavlova, P. Yablonskiy // Int. J. Mycobacteriol. – 2018. – Vol. 7, N 1. – P. 32-39.

278. Steenken, W. Biological studies of the tubercle bacillus. Dissociation and pathogenicity of the r and s variants of the human tubercle bacillus (H₃₇) / W. Steenken, W.H. Oatway, S.A. Petroff // J. Exp. Med. – 1934. – Vol. 60, N 4. - P. 515-40.

279. Sterling, T.R. Guidelines for the Treatment of Latent Tuberculosis Infection: Recommendations from the National Tuberculosis Controllers Association and CDC, 2020 / T.R. Sterling, G. Njie, D. Zenner, D.L. Cohn, R. Reves, A. Ahmed, D. Menzies, C.R. Jr. Horsburgh, C.M. Crane, M. Burgos, P. LoBue, C.A. Winston, R. Belknap // MMWR Recomm. Rep. – 2020. – Vol. 69, N 1. – P. 1-11.

280. Stewart, G.R. Mycobacterial mutants with defective control of phagosomal acidification / G.R. Stewart, J. Patel, B.D. Robertson, A. Rae, D.B. Young // *PLoS Pathog.* – 2005. – Vol. 1, N 3. – P. 269-278.
281. Steyn, A.J. *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3 interacts with RpoV to affect host survival but is dispensable for in vivo growth / A.J. Steyn, D.M. Collins, M.K. Hondalus, W.R. Jacobs, R.P. Kawakami, B.R. Bloom // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2002. – Vol. 99, N 5. – P. 3147-3152.
282. Stokas, H. Modulation of the *M. tuberculosis* cell envelope between replicating and non-replicating persistent bacteria / H. Stokas, H.L. Rhodes, G.E. Purdy // *Tubercul. (Edinb.)*. – 2020. – Vol. 125. – P. 102007.
283. Suárez, I. The Diagnosis and Treatment of Tuberculosis / I. Suárez, S.M. Fünfer, S. Kröger, J. Rademacher, G. Fätkenheuer, J. Rybniker // *Dtsch. Arztebl. Int.* – 2019. – Vol. 116, N 43. – P. 729-735.
284. Sugawara, I. Establishment of a guinea pig model of latent tuberculosis with GFP-introduced *Mycobacterium tuberculosis* / I. Sugawara, T. Udagawa, T. Aoki, S. Mizuno // *Tohoku. J. Exp. Med.* – 2009. – Vol. 3. – P. 257-262.
285. Sun, J. Mycobacterial nucleoside diphosphate kinase blocks phagosome maturation in murine RAW 264.7 macrophages / J. Sun, X. Wang, A. Lau, T.Y. Liao, C. Bucci, Z. Hmama // *PLoS One.* – 2010. – Vol. 5, N 1. – P. e8769.
286. Supply, C. Allix, S. Lesjean, M. Cardoso-Oelemann, S. Rüsche-Gerdes, E. Willery, E. Savine de Haas, H. van Deutekom, S. Roring, P. Bifani, N. Kurepina, B. Kreiswirth, C. Sola, N. Rastogi, V. Vatin, M.C. Gutierrez, M. Fauville, S. Niemann, R. Skuce, K. Kremer, C. Locht, D. van Soolingen // *J. Clin. Microbiol.* – 2006. – Vol. 44, N 12. – P. 4498-4510.
287. Supply, P. Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon / P. Supply, J. Magdalena, S. Himpens, C. Locht // *Mol. Microbiol.* – 1997. – Vol. 26, N 5. – P. 991-1003.
288. Sutcliffe, I.C. Lipoproteins of *Mycobacterium tuberculosis*: an abundant and functionally diverse class of cell envelope components / I.C. Sutcliffe, D.J. Harrington // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2004. – Vol. 28, N 5. – P. 645-659.
289. Tait, D.R. Final analysis of a trial of M72/AS01E vaccine to prevent tuberculosis / D.R. Tait, M. Hatherill, O. Van Der Meeren, A.M. Ginsberg, E. Van Brakel, B. Salaun, T.J. Scriba, E.J. Akite, H.M. Ayles, A. Bollaerts, M.A. Demoitié, A. Diacon, T.G. Evans, P. Gillard,

E. Hellström, J.C. Innes, M. Lempicki, M. Malahleha, N. Martinson, D. Mesia Vela, M. Muyoyeta, V. Nduba, T.G. Pascal, M. Tameris, F. Thienemann, R.J. Wilkinson, F. Roman // *N. Engl. J. Med.* – 2019. – Vol. 381, N 25. – P. 2429-2439.

290. Tantivitayakul, P. Identification and in silico functional prediction of lineage-specific SNPs distributed in DosR-related proteins and resuscitation-promoting factor proteins of *Mycobacterium tuberculosis* / P. Tantivitayakul, T. Juthayothin, W. Ruangchai, N. Smittipat, A. Disratthakit, S. Mahasirimongkol, K. Tokunaga, P. Palittapongarnpim // *Heliyon.* – 2020. – Vol. 6, N 12. – P. e05744.

291. Thakur, M. Ability of PknA, a mycobacterial eukaryotic-type serine/threonine kinase, to transphosphorylate MurD, a ligase involved in the process of peptidoglycan biosynthesis / M. Thakur, P.K. Chakraborti // *Biochem. J.* – 2008. – Vol. 415, N 1. – P. 27-33.

292. Timmins, G.S. Mechanisms of action of isoniazid / G.S. Timmins, V. Deretic // *Mol. Microbiol.* – 2006. – Vol. 62, N 5. – P. 1220-1227.

293. Tiwari, P. MazF ribonucleases promote *Mycobacterium tuberculosis* drug tolerance and virulence in guinea pigs / P. Tiwari, G. Arora, M. Singh, S. Kidwai, O.P. Narayan, R. Singh // *Nat. Commun.* – 2015. – Vol. 6. – P. 6059.

294. Tkachuk, A.P. Multi-subunit BCG booster vaccine GamTBvac: Assessment of immunogenicity and protective efficacy in murine and guinea pig TB models / A.P. Tkachuk, V.A. Gushchin, V.D. Potapov, A.V. Demidenko, V.G. Lunin, A.L. Gintsburg // *PLoS One.* – 2017. – Vol. 12, N 4. – P. e0176784.

295. Tsenova, L. Inoculum size and traits of the infecting clinical strain define the protection level against *Mycobacterium tuberculosis* infection in a rabbit model / L. Tsenova, D. Fallows, A. Kolloli, P. Singh, P. O'Brien, N. Kushner, G. Kaplan, S. Subbian // *Eur. J. Immunol.* – 2020. – Vol. 50, N 6. – P. 858-872.

296. Tükenmez, H. *Mycobacterium tuberculosis* virulence inhibitors discovered by *Mycobacterium marinum* high-throughput screening / H. Tükenmez, I. Edström, R. Ummanni, S.B. Fick, C. Sundin, M. Elofsson, C. Larsson // *Sci. Rep.* – 2019. – Vol. 9, N 1. – P. 26.

297. van der Wel, N. *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells / N. van der Wel, D. Hava, D. Houben, D. Fluitsma, M. van Zon, J. Pierson, M. Brenner, P.J. Peters // *Cell.* – 2007. – Vol. 129, N 7. – P. 1287-1298.

298. Vandal, O.H. Acid-susceptible mutants of *Mycobacterium tuberculosis* share hypersusceptibility to cell wall and oxidative stress and to the host environment / O.H. Vandal,

J.A. Roberts, T. Odaira, D. Schnappinger, C.F. Nathan, S. Ehrt // *J. Bacteriol.* – 2009. – Vol. 191, N 2. – P. 625-631.

299. Velayati, A.A. Morphological characterisation of *Mycobacterium tuberculosis* / A.A. Velayati, P. Farnia In: Cardona PJ, editor. Understanding tuberculosis - deciphering the secret life of the bacilli Croatia: InTech Publisher. - 2012. - P. 149–66.

300. Velayati, A.A. Populations of latent *Mycobacterium tuberculosis* lack a cell wall: Isolation, visualization, and whole-genome characterization / A.A. Velayati, T. Abeel, T. Shea, G. Konstantinovich Zhavnerko, B. Birren, G.H. Cassell, A.M. Earl, S. Hoffner, P. Farnia // *Int. J. Mycobacteriol.* – 2016. – Vol. 5, N 1. – P. 66-73.

301. Veyron-Churlet, R. Phosphorylation of the *Mycobacterium tuberculosis* beta-ketoacyl-acyl carrier protein reductase MabA regulates mycolic acid biosynthesis / R. Veyron-Churlet, I. Zanella-Cléon, M. Cohen-Gonsaud, V. Molle, L. Kremer // *J. Biol. Chem.* – 2010. - Vol. 285, N 17. – P. 12714-12725.

302. Volpe, E. Gene expression profiling of human macrophages at late time of infection with *Mycobacterium tuberculosis* / E. Volpe, G. Cappelli, M. Grassi, A. Martino, A. Serafino, V. Colizzi, N. Sanarico, F. Mariani // *Immunology.* – 2006. – Vol. 118, N 4. – P. 449-460.

303. von Wintersdorff, C.J. Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer / C.J. von Wintersdorff, J. Penders, J.M. van Niekerk, N.D. Mills, S. Majumder, L.B. van Alphen, P.H. Savelkoul, P.F. Wolffs // *Front. Microbiol.* – 2016. – Vol. 19, N 7. – P. 173.

304. Voskuil, M.I. Inhibition of respiration by nitric oxide induces a *Mycobacterium tuberculosis* dormancy program / M.I. Voskuil, D. Schnappinger, K.C. Visconti, M.I. Harrell, G.M. Dolganov, D.R. Sherman, G.K. Schoolnik // *J. Exp. Med.* – 2003. – Vol. 198. – P. 705-713.

305. Wagner, E.G.H. Small RNAs in bacteria and archaea: who they are, what they do, and how they do it / E.G.H. Wagner, P. Romby // *Adv. Genet.* - 2015. – Vol. 90. – P. 1–76.

306. Wang, K. The expression of ABC efflux pump, Rv1217c-Rv1218c, and its association with multidrug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in China / K. Wang, H. Pei, B. Huang, X. Zhu, J. Zhang, B. Zhou, L. Zhu, Y. Zhang, F.F. Zhou // *Curr. Microbiol.* – 2013. – Vol. 66, N 3. – P. 222-226.

307. Ward, S.K. CtpV: a putative copper exporter required for full virulence of *Mycobacterium tuberculosis* / S.K. Ward, B. Abomoelak, E.A. Hoye, H. Steinberg, A.M. Talaat // *Mol. Microbiol.* – 2010. – Vol. 77, N 55. – P. 1096-1110.
308. Wards, B.J. An ESAT6 knockout mutant of *Mycobacterium bovis* produced by homologous recombination will contribute to the development of a live tuberculosis vaccine / B.J. Wards, G.W. de Lisle, D.M. Collins // *Tuber. Lung Dis.* – 2000. – Vol. 80, N 4-5. – P. 185-189.
309. Wayne, L.G. An in vitro model for sequential study of shiftdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence / L.G. Wayne, L.G. Hayes // *Infect. Immun.* – 1996. – Vol. 6. – P. 2062-2069.
310. Weerasuriya, C.K. New tuberculosis vaccines: advances in clinical development and modelling / C.K. Weerasuriya, R.A. Clark, R.G. White, R.C. Harris // *J. Intern. Med.* – 2020. – Vol. 288, N 6. – P. 661-681.
311. Wei, J. The *Mycobacterium tuberculosis* CRISPR-Associated Cas1 Involves Persistence and Tolerance to Anti-Tubercular Drugs / J. Wei, N. Lu, Z. Li, X. Wu, T. Jiang, L. Xu, C. Yang, S. Guo // *Biomed. Res. Int.* – 2019. – Vol. 2. – P. 7861695.
312. Weinberg, Z. The aptamer core of SAM-IV riboswitches mimics the ligand-binding site of SAM-I riboswitches / Z. Weinberg, E.E. Regulski, M.C. Hammond, J.E. Barrick, Z. Yao, W.L. Ruzzo, R.R. Breaker // *RNA.* – 2008. – Vol. 14, N 5. – P. 822-828.
313. White, A.G. Analysis of 18FDG PET/CT Imaging as a Tool for Studying *Mycobacterium tuberculosis* Infection and Treatment in Non-human Primates / A.G. White, P. Maiello, M.T. Coleman, J.A. Tomko, L.J. Frye, C.A. Scanga, P.L. Lin, J.L. Flynn // *J. Vis. Exp.* – 2017. – Vol. 127. – P. 56375.
314. White, M.J. PepD participates in the mycobacterial stress response mediated through MprAB and SigE / M.J. White, H. He, R.M. Penoske, S.S. Twining, T.C. Zahrt // *J. Bacteriol.* – 2010. – Vol. 192, N 6. – P. 1498-1510.
315. Wiker, H.G. The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis* / H.G. Wiker, M. Harboe // *Microbiol. Rev.* – 1992. – Vol. 56, N. 4. – P. 648-661.
316. Wilson, T. Antisense RNA to *ahpC*, an oxidative stress defence gene involved in isoniazid resistance, indicates that *AhpC* of *Mycobacterium bovis* has virulence properties / T. Wilson, G.W. de Lisle, J.A. Marcinkeviciene, J.S. Blanchard, D.M. Collins // *Microbiology (Reading)*. – 1998. – Vol. 144, N 10. – P. 2687-2695.

317. Wolfe, L.M. Proteomic definition of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis* / L.M. Wolfe, S.B. Mahaffey, N.A. Kruh, K.M. Dobos // J. Proteome Res. – 2010. – Vol. 9, N 11. – P. 5816-5826.
318. Wong, D. *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase (PtpA) excludes host vacuolar-H⁺-ATPase to inhibit phagosome acidification / D. Wong, H. Bach, J. Sun, Z. Hmama, Y. Av-Gay // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2011. – Vol. 108, N 48. – P. 19371-193716.
319. Xiao, J. Tree shrew (*Tupaia belangeri*) as a novel laboratory disease animal model / J. Xiao, R. Liu, C.S. Chen // Zool. Res. – 2017. – Vol. 38, N 3. – P. 127-137.
320. Yam, K.C. Studies of a ring-cleaving dioxygenase illuminate the role of cholesterol metabolism in the pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis* / K.C. Yam, I. D'Angelo, R. Kalscheuer, H. Zhu, J.X. Wang, V. Snieckus, L.H. Ly, P.J. Converse, W.R. Jr. Jacobs, N. Strynadka, L.D. Eltis // PLoS Pathog. – 2009. – Vol. 5, N 3. – P. e1000344.
321. Ye, J. A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction Primer-BLAST / J. Ye, G. Coulouris, I. Zaretskaya, I. Cutcutache, S. Rozen, T.L. Madden // BMC Bioinform. – 2012. – Vol. 13. - P. 134.
322. Zahrt, T.C. *Mycobacterium tuberculosis* signal transduction system required for persistent infections / T.C. Zahrt, V. Deretic // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2001. – Vol. 98, N 22. – P. 12706-12711.
323. Zwerling, A. Interferon-gamma release assays for tuberculosis screening of healthcare workers: a systematic review / A. Zwerling, S. van den Hof, J. Scholten, F. Cobelens, D. Menzies, M. Pai // Thorax. – 2012. – Vol. 67, N 1. – P. 62-70.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

а) 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 // *Microorganisms*. - 2021. – Vol. 9, N 8. – P. 1792. **WoS IF = 3,864. Цит. 3.**

б) Базы данных

6. База данных «Гены вирулентности *Mycobacterium tuberculosis*». Свидетельство № от

в) 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.

в) 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. Капрельянц // «Биология – наука XXI века» 18-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых, Пушино, 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.– 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.

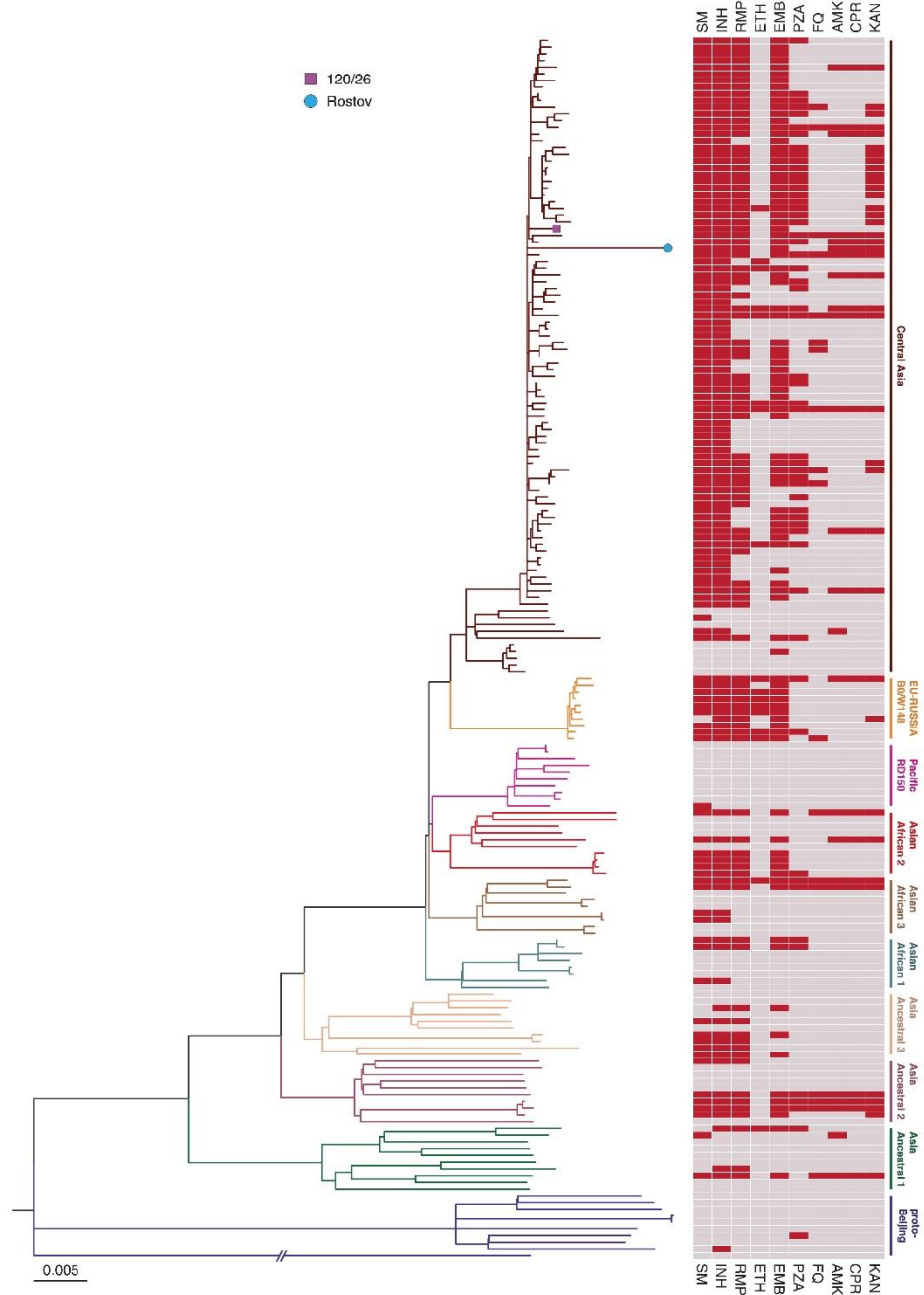
14. Колупаева Н.В. Влияние изменения условий окружающей среды на уровни экспрессии малых некодирующих РНК в клетках *Mycobacterium tuberculosis* / Н.В. Колупаева, **М.В. Фурсов**, В.Д. Потапов // 24 Международная школа-конференция молодых ученых «Биология – наука 21 века», Пущино, 2020 г.

15. Колупаева Н.В. Оценка вирулентности клинических штаммов *Mycobacterium tuberculosis in vivo*/ Н.В. Колупаева, Т.И. Рудницкая, **М.В. Фурсов** // Всероссийский научно-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.– 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.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

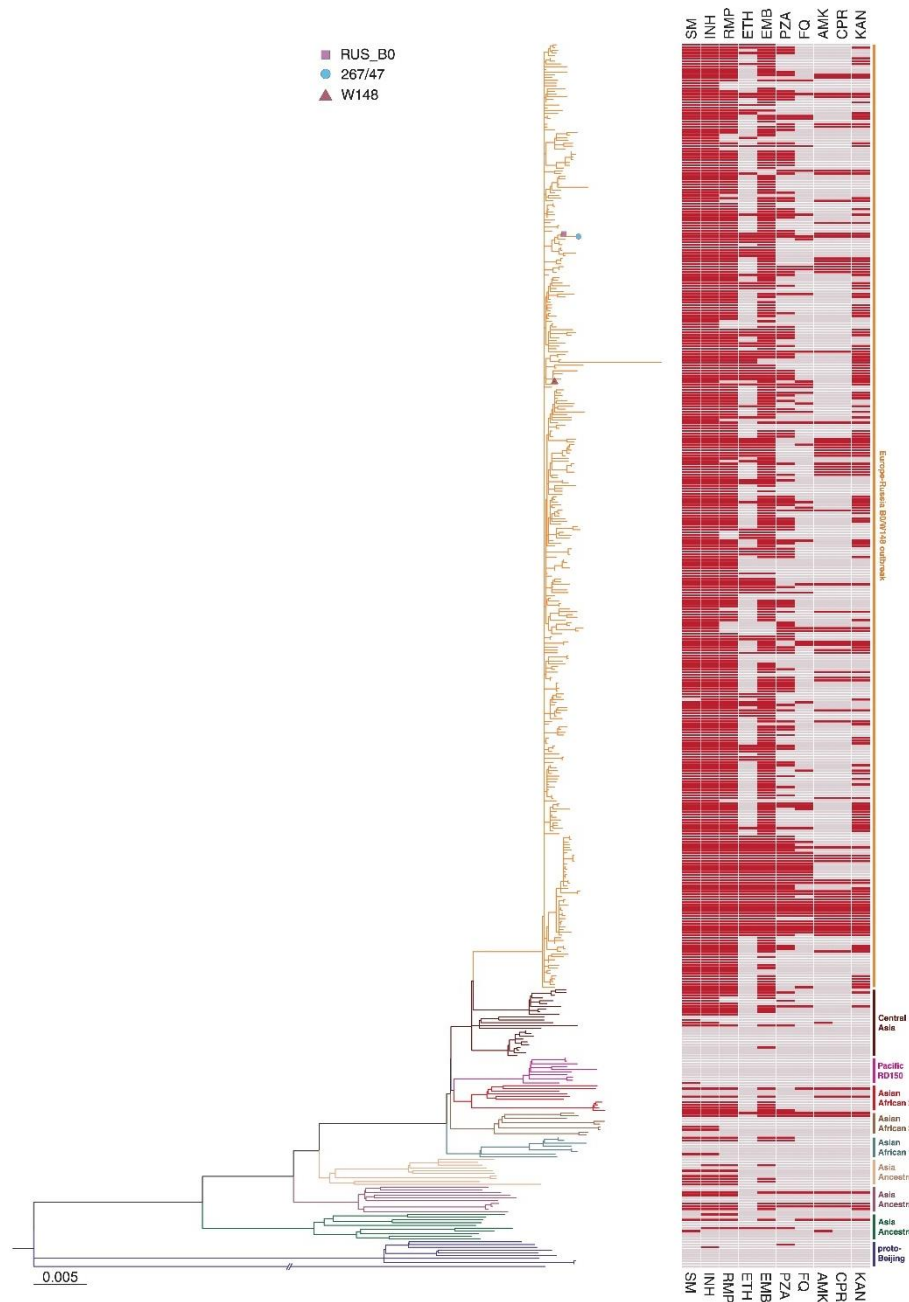
Филогенетическое дерево 183 изолятов *M. tuberculosis* клады CAO генетической линии Beijing, построенное на основании 6240 SNPs корового генома



Разная окраска ветвей указывает на принадлежность к разным кладам внутри генетической линии Beijing. Справа – фенотип лекарственной устойчивости. Размерность шкалы указывает количество нуклеотидных замен. Дерево построено относительно штамма *M. tuberculosis* H37Rv. SM – стрептомицин, INH – изониазид, RMP – рифампицин, ETH – этионамид, EMB – этамбутол, PZA – пипразинамид, FQ – фторхинолон, KAN – канамицин, AMK – амикацин, CPR – капреомицин

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Филогенетическое дерево 506 изолятов *M. tuberculosis* клады B0/W148 генетической линии Beijing на основании 7226 SNPs корового генома



Разная окраска ветвей указывает на принадлежность к разным кладам внутри генетической линии Beijing. Справа – фенотип лекарственной устойчивости. Размерность шкалы указывает количество нуклеотидных замен. Дерево построено относительно штамма *M. tuberculosis* H37Rv. SM - стрептомицин, INH - изониазид, RMP - рифампицин, ETH - этионамид, EMB - этамбутол, PZA - пиразинамид, FQ - фторхинолон, KAN - канамицин, AMK - амикацин, CPR - капреомицин