

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

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора,
Оболensk, Московская область, Российская Федерация

Одной из самых опасных социально значимых инфекций населения многих стран является туберкулез. Известно, что диагностика и лечение туберкулезной инфекции затрудняется в результате изменчивости возбудителя *Mycobacterium tuberculosis*, в том числе приобретения им множественной лекарственной устойчивости. В данной экспериментальной работе исследовали роль малых некодирующих РНК (мнРНК), которые, по современным данным, участвуют в регуляции генов вирулентности и адаптации к стрессам, которым подвергаются микобактерии в макроорганизме. Экспериментальные данные проведенного исследования *in vitro* подтверждают возможное участие некоторых мнРНК в адаптации клеток *M. tuberculosis* к условиям оксидативного и кислотного стрессов. В легких мышей линии BALB/c, инфицированных *M. tuberculosis* H37Rv, выявлено изменение уровней экспрессии нескольких генов мнРНК.
Ключевые слова: туберкулез, *Mycobacterium tuberculosis*, малые некодирующие РНК, оксидативный стресс, кислотный стресс

Для цитирования: Колупаева Н.В., Фурсов М.В., Грищенко Н.С., Рудницкая Т.И., Комбарова Т.И., Ганина Е.А., Потапов В.Д., Дятлов И.А. Экспрессия малых некодирующих РНК *Mycobacterium tuberculosis* при культивировании в стрессовых условиях *in vitro* и моделировании туберкулеза у мышей. Бактериология. 2021; 6(4): 9–15. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-4-9-15

Expression of *Mycobacterium tuberculosis* small noncoding RNA under stressful conditions *in vitro* and during tuberculosis infection in mice

N.V.Kolupaeva, M.V.Fursov, N.S.Grishchenko, T.I.Rudnitskaya, T.I.Kombarova,
E.A.Ganina, V.D.Potapov, I.A.Dyatlov

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

Tuberculosis is one of the most dangerous socially significant infections worldwide. It is known that the diagnosis and treatment of tuberculosis infection are complicated by the variability of the pathogen of *Mycobacterium tuberculosis*, including the acquisition of multidrug resistance. In this study, we investigated the role of small non-coding RNAs (sRNAs), which, according to modern data, are involved in the regulation of virulence genes and adaptation to stresses that mycobacteria are exposed to in the host cells. Experimental data of the *in vitro* study confirm the possible participation of some sRNAs in the adaptation of *M. tuberculosis* cells to conditions of oxidative and acid stress. In the lungs of mice BALB/c infected with *M. tuberculosis* H37Rv a change in the expression levels of several ncRNAs genes was revealed.
Key words: tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, small non-coding RNA, oxidative stress, acid stress

For citation: Kolupaeva N.V., Fursov M.V., Grishchenko N.S., Rudnitskaya T.I., Kombarova T.I., Ganina E.A., Potapov V.D., Dyatlov I.A. Expression of *Mycobacterium tuberculosis* small noncoding RNA under stressful conditions *in vitro* and during tuberculosis infection in mice. Bacteriology. 2021; 6(4): 9–15. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2021-4-9-15

Для корреспонденции:

Колупаева Надежда Вячеславовна, младший научный сотрудник отдела подготовки и совершенствования специалистов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболensk, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 31-2182
E-mail: nadin.9830@mail.ru

Статья поступила 07.12.2021 г., принята к печати 27.12.2021 г.

For correspondence:

Nadezhda V. Kolupaeva, Junior Researcher of the Department for Training and Improvement of Specialists, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

Address: SRCAMB 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 31-2182
E-mail: nadin.9830@mail.ru

The article was received 07.12.2021, accepted for publication 27.12.2021

Туберкулез – инфекционное заболевание, которое является одной из ведущих причин смертности во всем мире. По данным Всемирной организации здравоохранения, в 2020 г. в мире было зарегистрировано 9,9 млн новых заболеваний туберкулезом. В 2020 г. большинство случаев заболеваний были зарегистрированы в Юго-Восточной Азии (43%), Африке (25%) и Западной части Тихого океана (18%). Небольшой уровень заболеваемости туберкулезом был выявлен в Восточном Средиземноморье (8,3%), Северной и Южной Америке (3,0%) и Европе (2,3%) [1].

По данным исследований, патогенез возбудителя туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis* в значительной степени регулируется экспрессией малых некодирующих РНК (мнРНК) [2–4], которые, действуя на уровне транскрипции и трансляции, играют особую роль в регуляции экспрессии генов микобактерий [5]. К мнРНК относят транскрипты размером 50–400 нуклеотидов, которые не транслируются в белки и участвуют в регуляторных процессах. У туберкулезного микроба впервые были описаны 9 мнРНК в 2009 г., в настоящее время в геномах *M. tuberculosis* идентифицированы более 100 последовательностей, кодирующих мнРНК [6]. У большинства мнРНК туберкулезного микроба функции не изучены.

В ходе инфекционного туберкулезного процесса человека микобактерии туберкулеза фагоцитируются макрофагами (МФ) и подвергаются воздействию бактерицидных факторов в фагосомах. В структуре фагосомальных мембран МФ располагаются протонные АТФазы, вызывающие закисление внутренней среды фагосом, а также НАДФН-оксидазы, образующие активные формы кислорода, и NO-синтазы, генерирующие активные формы азота – радикалы NO* [7]. При попадании в фагосому клетки микобактерий подвергаются токсичному воздействию факторов макрофагов. Так, на мембране фагосом макрофагов организма-хозяина присутствуют НАДФН-оксидаза и NO-синтаза. Эти активные интермедиаты запускают процессы, ведущие к разрушению микобактериальных оболочек. При этом NO-радикал проявляет большую бактерицидную активность по сравнению с радикалом супероксида [3].

Однако клетки микобактерий способны длительное время сохраняться в фагосомах макрофагов [11]. Их адаптацию к неблагоприятным условиям окружающей среды, возможно, обеспечивает синтез мнРНК, которые способны регулировать активность стресс-чувствительных генов микобактерий на посттранскрипционном уровне [8–10, 12, 13]. Таким образом, с помощью анализа изменения уровней их экспрессии возможно оценить влияние стрессовых и бактерицидных факторов на интенсивность синтеза адаптивных белков туберкулезного патогена.

Целью данного исследования было изучение изменения уровней экспрессии 13 генов мнРНК в клетках *M. tuberculosis* штамма H37Rv в условиях, моделирующих стрессы, которым подвергаются клетки *M. tuberculosis* внутри фагосом млекопитающих, *in vitro* и *in vivo*.

Материалы и методы

Штаммы и условия культивирования

В исследовании использовали лабораторный штамм *M. tuberculosis* H37Rv, полученный из Государственной кол-

лекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск» (В-3374). Культивирование клеток микобактерий проводили в жидкой питательной среде Middlebrook 7H9 Broth Base (Himedia, Мумбаи, Индия) с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота (КРС) («Биолот», Санкт-Петербург, Россия) и 0,05% Tween 80 (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) и на плотной питательной среде Middlebrook 7H11 Agar Base (Himedia, Мумбаи, Индия) с добавлением 10% сыворотки КРС. Посевы культивировали при температуре 37°C в течение 28 дней.

Моделирование оксидативного стресса *in vitro*

Микобактериальные клетки, выращенные в жидкой питательной среде 7H9 с 10% сыворотки КРС и 0,05% Tween 80 до оптической плотности (OD₆₀₀ = 1), центрифугировали при 5000 g при комнатной температуре в течение 20 мин, трижды отмывали фосфатным буфером и переносили в жидкую питательную среду 7H9 с 10% сыворотки КРС и 0,05% Tween 80 (pH 7,0) с добавлением H₂O₂ 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 *M. tuberculosis* H37Rv инкубировали при температуре 37°C с перемешиванием (200 об./мин) в течение 40 мин. Клетки центрифугировали при 5000 g при температуре 4°C в течение 20 мин. Осадок использовали для выделения тотальной РНК. В качестве контроля клетки *M. tuberculosis* H37Rv культивировали в жидкой питательной среде 7H9 без добавления H₂O₂ или PAPA NONOate при тех же временных и температурных условиях. Эксперимент проводили в трех повторностях.

Моделирование кислотного стресса *in vitro*

Клетки *M. tuberculosis* выращивали, осаждали, отмывали как описано выше. Затем их переносили в жидкую питательную среду 7H9 с 10% сыворотки КРС и 0,05% Tween 80 (pH 5,4). В этих условия клетки *M. tuberculosis* H37Rv инкубировали при температуре 37°C с перемешиванием (200 об./мин) в течение 2, 15 и 24 ч. Клетки центрифугировали при 5000 g при температуре 4°C в течение 20 мин. Осадок использовали для выделения тотальной РНК. Контрольные клетки *M. tuberculosis* готовили как описано выше. Эксперимент проводили в трех повторностях.

Лабораторные животные

Самки мышей линии BALB/c (n = 24) получены из питомника «Андреевка» (ФГБУН НЦБМТ ФМБА, Московская область, Россия). В эксперимент брали животных в возрасте 14–15 нед. весом 22–25 г. Мышей содержали в стандартных условиях в соответствии с международными нормами и требованиями [11]. Животные имели свободный доступ к воде и корму («Лабораторкорм», Москва, Россия). Все эксперименты на животных проводились в полном соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых в научных целях), а также требований Санитарных правил

1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности и возбудителями паразитарных болезней» и Ветеринарного протокола №ВП-2020/10 по биозтике ФБУН ГНЦ ПМБ.

Моделирование хронической туберкулезной инфекции у мышей линии BALB/c

Мышей линии BALB/c инфицировали внутрибрюшинно как описано ранее [12]: заражали суспензией клеток *M. tuberculosis* H37Rv в дозе $1,3 \times 10^5$ КОЕ/животное, в объеме 0,2 мл. Ежедневно осуществляли контроль изменения веса и выживаемости животных. Для оценки патологического процесса на 45-е и 90-е сутки после заражения проводили анализ обсемененности и изменения гистологической картины паренхиматозных органов, как описано ранее [13]. Левое легкое инфицированных мышей замораживали в жидком азоте, затем переносили в микропробирку объемом 2 мл с циркониевыми бусами 0,1 мм (BioSpec, Бартлсвилл, Оклахома, США), добавляли 0,5 мл смеси фенол / гуанидин тиоцианат («Синтол», Москва, Россия) и гомогенизировали на дезинтеграторе Mini-Beatbeater (BioSpec, Бартлсвилл, Оклахома, США). Полученную суспензию использовали для выделения тотальной РНК.

Гистология паренхиматозных органов мышей

Легкие и селезенку мышей линии BALB/c фиксировали в 10%-м формалине («Био-ХИМ НН», Нижний Новгород, Россия), дегидратацию проводили в градиентных концентрациях этанола и бутанола, заключенный в парафин орган нарезали (5 мкм), используя Ultracut microtome («Райхерт-Юнг», Бенсхайм, Германия). Депарафинированные срезы окрашивали гематоксилином/эозином, изучали и фотографировали при помощи микроскопа Nikon Eclipse 80i и Nikon DS-U2 (Nikon, Токио, Япония) при увеличениях $\times 4$ и $\times 20$.

Выделение тотальной РНК и синтез кДНК

Выделение тотальной РНК проводили методом фенол-хлороформной экстракции с помощью набора «РНК-экстран» («Синтол», Москва, Россия). Для удаления следов ДНК пробу обрабатывали набором реагентов TURBO DNA-free™ Kit (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). Отсутствие ДНК в пробах подтверждали при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами на ген 16S рРНК *M. tuberculosis* и электрофореза в агарозном геле. Для получения первой цепи ДНК (кДНК) из тотальной РНК использовали набор реагентов MMLV RT kit («Евроген», Москва, Россия).

Анализ относительной экспрессии мнРНК в клетках *M. tuberculosis* в ответ на оксидативный и кислотный стрессы *in vitro*

Уровень представленности транскриптов мнРНК в клетках *M. tuberculosis* H37Rv в условиях оксидативного и кислотного стрессов оценивали при помощи ПЦР в реальном времени на приборе CFX96-touch (BioRad, Геркулес, Калифорния, США) с использованием реактивов qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Москва, Россия) со специфическими праймерами на гены мнРНК. Программа амплификации: 95°C, 5 мин; [95°C, 20 с; 61°C, 20 с; 72°C, 30 с] \times 40 раз.

Реакцию проводили в трех повторностях. Полученные результаты нормировали относительно уровня транскрипции гена 16S рРНК и сравнивали с контрольным уровнем представленности транскриптов мнРНК в отсутствии стрессов методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [14].

Анализ уровней экспрессии мнРНК в клетках *M. tuberculosis* в легких мышей линии BALB/c с хроническим туберкулезом

Представленность транскриптов мнРНК в клетках *M. tuberculosis* H37Rv в легких мышей линии BALB/c с хроническим туберкулезом оценивали при помощи ПЦР в реальном времени, как описано выше. Полученные результаты нормировали относительно уровня транскрипции гена 16S рРНК методом Pfaffl [15].

Результаты и обсуждение

Транскрипционный ответ генов мнРНК *M. tuberculosis* на оксидативный стресс

Для изучения ответа клеток *M. tuberculosis* H37Rv на оксидативный стресс, вызванный присутствием H_2O_2 и NO, оценивали изменение уровней транскрипции 13 генов мнРНК (MTS0997, MTS1338, MTS2823, B11, ASdes, Mpr5, Mcr3, Mcr15, ASpks, Mcr5, Mcr7, Mpr11 и Mpr18) по сравнению с таковым в контроле.

Показано, что в ответ на H_2O_2 во всех использованных концентрациях происходило увеличение уровней экспрессии 5 мнРНК (MTS0997, MTS1338, ASpks, Mpr5 и Mpr11). Для генов мнРНК B11 и ASdes зафиксировано увеличение экспрессии при концентрациях H_2O_2 0,5 и 1,0 мМ, а также для гена Mcr15 – при концентрациях H_2O_2 1 и 5 мМ. Экспрессия одного гена (Mcr7) снижалась в ответ на все использованные концентрации H_2O_2 . Гены MTS2823, Mpr5, Mcr3 и Mpr18 не изменяли своих уровней экспрессии в данных условиях (рис. 1).

В клетках *M. tuberculosis* H37Rv зафиксировано увеличение уровней представленности транскриптов мнРНК в ответ на присутствие ионов NO во всех использованных концентрациях (0,04, 0,4 и 4 мМ) для MTS1338 и снижение – для Mcr15, Mcr5, Mpr11 и Mpr18. При этом для Mpr5, ASpks и Mcr7 отмечено снижение экспрессии при концентрациях NO 0,4 и 4 мМ, для ASdes – при концентрации 0,04 мМ, а для MTS0997 – при концентрации 4 мМ. Представленность транскриптов MTS2823, B11 и Mcr3 не изменялась (рис. 2).

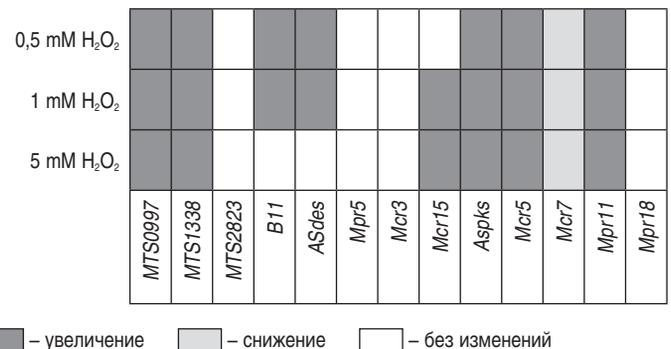


Рис. 1. Изменение уровней экспрессии генов мнРНК в клетках *M. tuberculosis* H37Rv в условиях оксидативного стресса (H_2O_2) в сравнении с контролем.

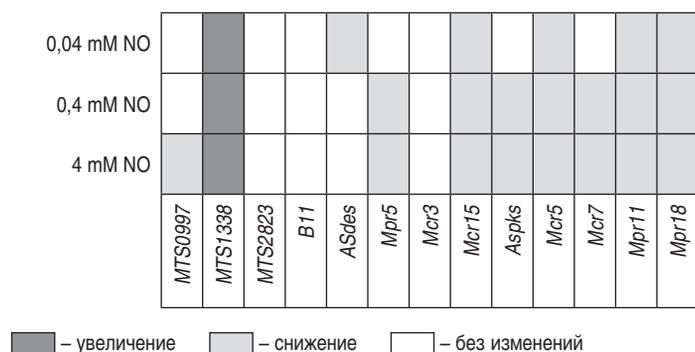


Рис. 2. Изменение уровней экспрессии генов мРНК в клетках *M. tuberculosis* H37Rv в условиях оксидативного стресса (NO) в сравнении с контролем.

Таким образом, получены данные, указывающие на увеличение уровней экспрессии гена мРНК *MTS1338* при действии H_2O_2 и NO во всех исследуемых концентрациях. В недавно опубликованной работе показано, что сверхэкспрессия мРНК *MTS1338* в клетках *M. tuberculosis* H37Rv приводила к снижению трансляционной активности и замедлению деления туберкулезных клеток [5]. Уменьшение уровня экспрессии гена *Mcr7* в условиях оксидативного стресса, возможно, указывает на участие этого гена в регуляции активности комплекса Tat, ответственного за трансмембранную секрецию ряда белков, что описано ранее [3, 6]. На основании полученных нами данных можно сделать вывод о подтверждении роли мРНК *MTS1338* и *Mcr7* в адаптации клеток *M. tuberculosis* к условиям окислительного стресса.

Транскрипционный ответ генов мРНК M. tuberculosis на кислотный стресс

Кислотный стресс моделировали с помощью культивирования клеток микобактерий в жидкой питательной среде со сниженными значениями pH (5,4). Эти условия имитируют подкисление среды в фагосоме, генерируемое ферментом протонной АТФазой, локализованной в мембранах фагосом МФ.

В ходе эксперимента отмечено увеличение экспрессии гена мРНК *Mpr5* в течение 24 ч, а гена *Mcr7* – в течение 2 ч воздействия кислотного стресса. Уменьшение экспрессии мРНК зафиксировано для *ASdes*, *Mpr11* и *Mpr18* в течение 2 ч и *ASpks* – в течение 24 ч. Отмечалось отсутствие изменений уровней экспрессии *MTS0997*, *MTS1338*, *MTS2823*, *B11*, *Mcr3*, *Mcr15* и *Mcr5* (рис. 3).

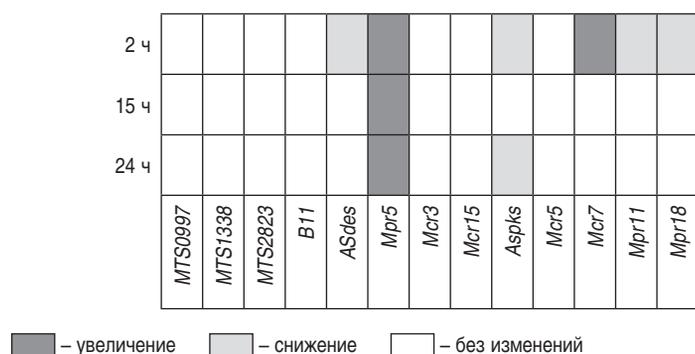


Рис. 3. Изменение уровней экспрессии генов мРНК в клетках *M. tuberculosis* H37Rv в условиях кислотного *in vitro* стресса по сравнению с контролем.

В отличие от полученных нами данных, ранее сообщалось, что экспрессия гена *ASpks* и *ASdes* увеличивалась в клетках *M. tuberculosis* H37Rv при их поглощении МФ [6]. Это может указывать на роль *ASpks* и *ASdes* в адаптации клеток *M. tuberculosis* к другим стрессовым факторам, присутствующим в МФ.

Хроническая туберкулезная инфекция у мышей линии BALB/c, вызванная штаммом M. tuberculosis H37Rv

В качестве критериев оценки патологического туберкулезного процесса были использованы: изменение массы тела зараженных животных; изменение среднего веса легких и селезенок мышей; обсемененность микобактериями легких и селезенок мышей на 45-е и 90-е сутки после заражения; гистологическое исследование тканей легких и селезенок мышей, зараженных клетками *M. tuberculosis*.

Анализ изменения массы тела мышей линии BALB/c, зараженных штаммом *M. tuberculosis* H37Rv в дозе $1,3 \times 10^5$ КОЕ/животное, не выявил значительных изменений данного показателя на протяжении всего времени эксперимента по сравнению с контролем. Вес селезенок и легких зараженных мышей статистически значимо не увеличивался (рис. 4).

Оценка микобактериальной обсемененности селезенки и легких мышей линии BALB/c, зараженных клетками штамма *M. tuberculosis* H37Rv, не выявила изменения данного показателя на протяжении всего времени эксперимента (рис. 5).

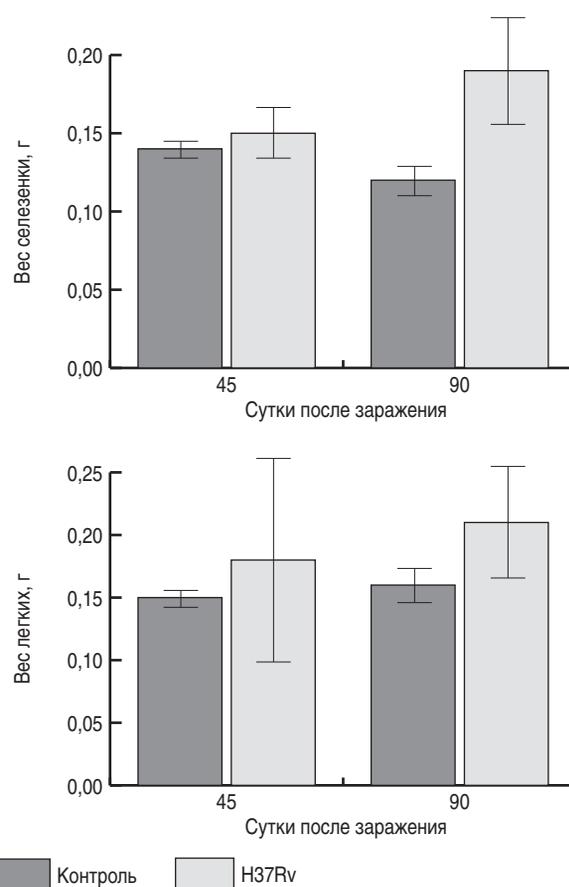


Рис. 4. Изменение веса органов (селезенки и легких) мышей линии BALB/c, инфицированных внутрибрюшинно клетками *M. tuberculosis* H37Rv.

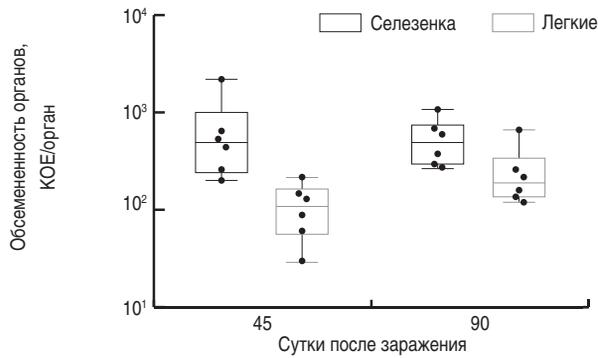


Рис. 5. Микобактериальная обсемененность селезенок и легких мышей линии BALB/c, инфицированных клетками *M. tuberculosis* H37Rv.

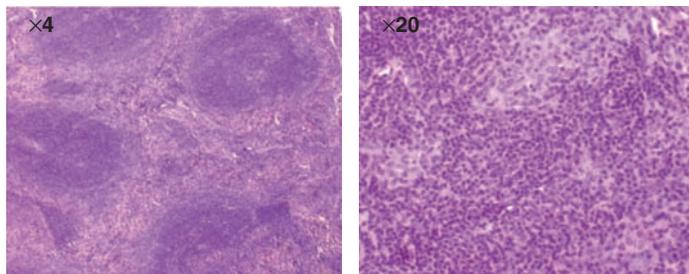


Рис. 6. Патологические изменения в селезенке мышей линии BALB/c на 90-е сутки после внутрибрюшинного заражения клетками штамма *M. tuberculosis* H37Rv.

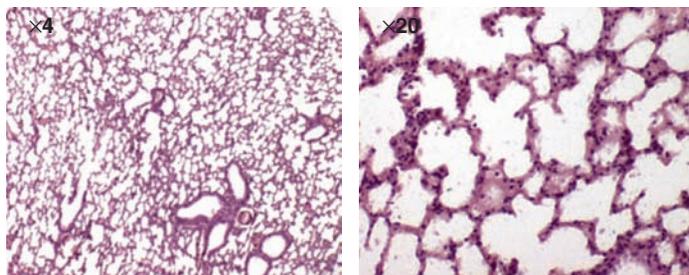


Рис. 7. Гистологические срезы легких мышей линии BALB/c на 90-е сутки после внутрибрюшинного заражения штаммом *M. tuberculosis* H37Rv.

В красной пульпе образцов селезенки наблюдается заметное увеличение лимфоцитов, что указывает на развитие ответной реакции иммунной системы при проникновении туберкулезного патогена в макроорганизм. Между лимфоцитарными скоплениями встречаются плотные очаги, состоящие из широкоплазменных макрофагов. В лимфатических фолликулах белой пульпы селезенки не выявлена активность центров размножения, что свидетельствует об отсутствии выраженной гуморальной реакции на присутствие патогена (рис. 6).

Гистологическое исследование тканей легких мышей, зараженных клетками *M. tuberculosis* в респираторном отделе и воздухоносных путях легких, не выявило отклонений от нормы. В исследуемых образцах просветы альвеол были чистые, без клеточной инфильтрации (рис. 7).

Отсутствие патологических изменений в легких мышей, возможно, связано с низким уровнем бактериальной нагрузки в органе после заражения клетками *M. tuberculosis* H37Rv и формирования у мышей хронического туберкулезного процесса, что согласуется с опубликованными ранее данными [12].

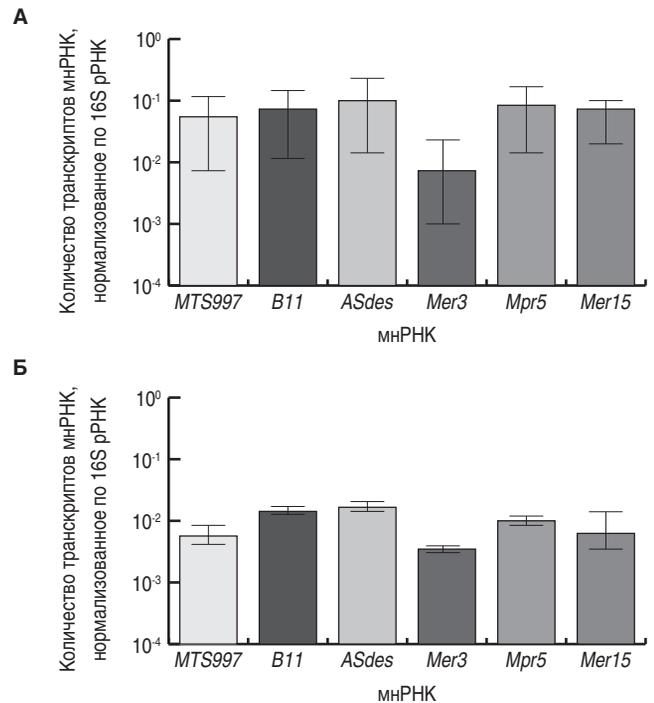


Рис. 8. Представленность транскриптов мнРНК относительно уровня экспрессии 16S рРНК в легких мышей линии BALB/c, инфицированных клетками *M. tuberculosis* H37Rv: А – 45-е сутки после заражения, Б – 90-е сутки после заражения.

Полученные данные указывают на формирование хронической туберкулезной инфекции у мышей линии BALB/c к 90-му дню после внутрибрюшинного заражения клетками штамма *M. tuberculosis* H37Rv.

Представленность транскриптов мнРНК M. tuberculosis H37Rv в легких мышей с хронической туберкулезной инфекцией

Оценка представленности транскриптов мнРНК *M. tuberculosis* в тканях легких мышей с хроническим туберкулезом показала, что в легких животных были детектированы 6 мнРНК из 13 (*MTS0997*, *B11*, *ASdes*, *Mcr3*, *Mpr5* и *Mcr15*). Средний уровень представленности к 90-м суткам после заражения, по сравнению с аналогичным показателем на 45-е сутки после заражения, снижался для *MTS0997* в 9,5 раза, *B11* – в 5,1 раза, *ASdes* – в 6,8 раза, *Mcr3* – в 3,1 раза, *Mpr5* – в 8,3 раза и *Mcr15* – в 7,5 раза (рис. 8).

Таким образом, экспериментально продемонстрировано, что в легких мышей с хронической туберкулезной инфекцией клетки *M. tuberculosis* экспрессируют мнРНК (*MTS0997*, *B11*, *ASdes*, *Mcr3*, *Mpr5* и *Mcr15*), причем уровень экспрессии изменяется с течением времени. Это дополняет сведения о присутствии транскриптов мнРНК в клетках туберкулезного микроба, при хронической туберкулезной инфекции и при переходе туберкулезной инфекции в латентную форму [10].

Заключение

По результатам проведенных экспериментов *in vitro* выявлено увеличение уровней транскрипции гена мнРНК *MTS1338 M. tuberculosis* в ответ на оксидативный стресс. В условиях воздействия повышенной кислотности *in vitro*, которая характерна для среды внутри фагосом, наблюдалось увеличение

уровня экспрессии мнРНК *Mpr5 M. tuberculosis*. Снижение уровней транскрипции мнРНК *ASdes* и *ASpks* в кислой среде в течение первых двух часов воздействия кислотного стресса позволяет предположить участие этих мнРНК в адаптации микобактерий к этому виду стресса. Показано, что в легких мышей с хронической туберкулезной инфекцией клетки *M. tuberculosis* H37Rv экспрессируют мнРНК *MTS0997*, *B11*, *ASdes*, *Mcr3*, *Mpr5* и *Mcr15*, характерные для состояния возбудителя туберкулеза при переходе его в покой. Представленность транскриптов названных мнРНК снижалась к 90-м суткам по сравнению с данным показателем на 45-е сутки после заражения мышей линии BALB/c.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was carried out within the framework of the sectorial program of Rosпотребнадзор.

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература

- Global tuberculosis report 2021. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Moore A, Riesco AB, Schwenk S, Arnvig KB. Expression, maturation and turnover of DrrS, an unusually stable, DosR regulated small RNA in *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS One. 2017 Mar 21;12(3):e0174079. DOI: 10.1371/journal.pone.0174079
- Ostrik AA, Azhikina TL, Salina EG. Small Noncoding RNAs and Their Role in the Pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis* Infection. Biochemistry (Mosc). 2021 Jan;86(Suppl 1):S109-S119. DOI: 10.1134/S000629792114008X
- Schwenk S, Arnvig KB. Regulatory RNA in *Mycobacterium tuberculosis*, back to basics. Pathog Dis. 2018 Jun 1;76(4). DOI: 10.1093/femspd/fty035
- Salina EG, Grigorov A, Skvortsova Y, Majorov K, Bychenko O, Ostrik A, et al. MTS1338, A Small *Mycobacterium tuberculosis* RNA, Regulates Transcriptional Shifts Consistent With Bacterial Adaptation for Entering Into Dormancy and Survival Within Host Macrophages. Front Cell Infect Microbiol. 2019 Nov 26;9:405. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00405
- Taneja S, Dutta T. On a stake-out: Mycobacterial small RNA identification and regulation. Noncoding RNA Res. 2019 May 16;4(3):86-95. DOI: 10.1016/j.ncrna.2019.05.001
- Forrellad MA, Klepp LI, Gioffré A, Sabio y García J, Morbidoni HR, de la Paz Santangelo M, Cataldi AA, Bigi F. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Virulence. 2013 Jan 1;4(1):3-66. DOI: 10.4161/viru.22329
- Feng L, Chen Z, Wang Z, Hu Y, Chen S. Genome-wide characterization of monomeric transcriptional regulators in *Mycobacterium tuberculosis*. Microbiology (Reading). 2016 May;162(5):889-897. DOI: 10.1099/mic.0.000257
- Mai J, Rao C, Watt J, Sun X, Lin C, Zhang L, Liu J. *Mycobacterium tuberculosis* 6C sRNA binds multiple mRNA targets via C-rich loops independent of RNA chaperones. Nucleic Acids Res. 2019 May 7;47(8):4292-4307. DOI: 10.1093/nar/gkz149
- Shepelkova G, Evstifeev V, Averbach JrM, Sivokozov I, Ergeshov A, Azhikina T, Yeremeev V. Small Noncoding RNAs MTS0997 and MTS1338 Affect the Adaptation and Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. Microbiol. Res. 2021 12:186-195. DOI: 10.3390/microbiolres12010014
- National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th ed. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011.
- Шрамко ПА, Грищенко НС, Рудницкая ТИ, Потапов ВД, Капрельянц АС, Бикетов СФ. Моделирование хронической туберкулезной инфекции у мышей методом внутрибрюшинного заражения и анализ активации аминоганидином мутантов штамма H37Rv с делециями по генам *rpf*. Туберкулез и болезни легких. 2010;87(4):47-50.
- Fursov MV, Shitikov EA, Lagutkin DA, Fursova AD, Ganina EA, Kombarova TI, et al. MDR and Pre-XDR Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Strains: Assessment of Virulence and Host Cytokine Response in Mice Infectious Model. Microorganisms. 2021 Aug 23;9(8):1792. DOI: 10.3390/microorganisms9081792
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001 Dec;25(4):402-8. DOI: 10.1006/meth.2001.1262
- Mishra A, Suroliá A. *Mycobacterium tuberculosis*: Surviving and Indulging in an Unwelcoming Host. IUBMB Life. 2018 Sep;70(9):917-925. DOI: 10.1002/iub.1882

References

- Global tuberculosis report 2021. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Moore A, Riesco AB, Schwenk S, Arnvig KB. Expression, maturation and turnover of DrrS, an unusually stable, DosR regulated small RNA in *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS One. 2017 Mar 21;12(3):e0174079. DOI: 10.1371/journal.pone.0174079
- Ostrik AA, Azhikina TL, Salina EG. Small Noncoding RNAs and Their Role in the Pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis* Infection. Biochemistry (Mosc). 2021 Jan;86(Suppl 1):S109-S119. DOI: 10.1134/S000629792114008X
- Schwenk S, Arnvig KB. Regulatory RNA in *Mycobacterium tuberculosis*, back to basics. Pathog Dis. 2018 Jun 1;76(4). DOI: 10.1093/femspd/fty035
- Salina EG, Grigorov A, Skvortsova Y, Majorov K, Bychenko O, Ostrik A, et al. MTS1338, A Small *Mycobacterium tuberculosis* RNA, Regulates Transcriptional Shifts Consistent With Bacterial Adaptation for Entering Into Dormancy and Survival Within Host Macrophages. Front Cell Infect Microbiol. 2019 Nov 26;9:405. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00405
- Taneja S, Dutta T. On a stake-out: Mycobacterial small RNA identification and regulation. Noncoding RNA Res. 2019 May 16;4(3):86-95. DOI: 10.1016/j.ncrna.2019.05.001
- Forrellad MA, Klepp LI, Gioffré A, Sabio y García J, Morbidoni HR, de la Paz Santangelo M, Cataldi AA, Bigi F. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Virulence. 2013 Jan 1;4(1):3-66. DOI: 10.4161/viru.22329
- Feng L, Chen Z, Wang Z, Hu Y, Chen S. Genome-wide characterization of monomeric transcriptional regulators in *Mycobacterium tuberculosis*. Microbiology (Reading). 2016 May;162(5):889-897. DOI: 10.1099/mic.0.000257
- Mai J, Rao C, Watt J, Sun X, Lin C, Zhang L, Liu J. *Mycobacterium tuberculosis* 6C sRNA binds multiple mRNA targets via C-rich loops independent of RNA chaperones. Nucleic Acids Res. 2019 May 7;47(8):4292-4307. DOI: 10.1093/nar/gkz149
- Shepelkova G, Evstifeev V, Averbach JrM, Sivokozov I, Ergeshov A, Azhikina T, Yeremeev V. Small Noncoding RNAs MTS0997 and MTS1338 Affect the Adaptation and Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. Microbiol. Res. 2021 12:186-195. DOI: 10.3390/microbiolres12010014
- National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th ed. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011.
- Shramko PA, Grishchenko NS, Rudnitskaya TI, Potapov VD, Kaprelyants AS, Biketov SF. Simulation of chronic tuberculosis infection in mice by intraperitoneal inoculation and the testing of aminoguanidine-induced activation of *rpf* gene

- deletion mutants of the H37Rv strain. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2010;87(4):47-50. (In Russian).
13. Fursov MV, Shitikov EA, Lagutkin DA, Fursova AD, Ganina EA, Kombarova TI, et al. MDR and Pre-XDR Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Strains: Assessment of Virulence and Host Cytokine Response in Mice Infectious Model. *Microorganisms*. 2021 Aug 23;9(8):1792. DOI: 10.3390/microorganisms9081792
14. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8. DOI: 10.1006/meth.2001.1262
15. Mishra A, Surolia A. *Mycobacterium tuberculosis*: Surviving and Indulging in an Unwelcoming Host. *IUBMB Life*. 2018 Sep;70(9):917-925. DOI: 10.1002/iub.1882

Информация об авторах:

Фурсов Михаил Васильевич, научный сотрудник отдела подготовки и усовершенствования специалистов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 31-2182
E-mail: mikhail.fursov88@gmail.com

Грищенко Наталья Семеновна, научный сотрудник отдела подготовки и усовершенствования специалистов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 31-2182
E-mail: natalya.grishenko60@mail.ru

Рудницкая Татьяна Ивановна, научный сотрудник отдела подготовки и усовершенствования специалистов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 31-2182
E-mail: rudnitsckaya.tat@yandex.ru

Комбарова Татьяна Ивановна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-0147
E-mail: kombarova@obolensk.org

Ганина Елена Анатольевна, научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 31-2182
E-mail: ganin43@yandex.ru

Потапов Василий Дмитриевич, доктор биологических наук, главный научный сотрудник отдела подготовки и усовершенствования специалистов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 31-2182
E-mail: potapovvd@mail.ru

Дятлов Иван Алексеевич, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-0003
E-mail: Dyatlov@obolensk.org

Information about authors:

Mikhail V. Fursov, Researcher of Department for Training and Improvement of Specialists, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор
Address: SRCAMB 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 31-2182
E-mail: mikhail.fursov88@gmail.com

Natalya S. Grishchenko, Researcher of Department for Training and Improvement of Specialists, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор
Address: SRCAMB 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 31-2182
E-mail: natalya.grishenko60@mail.ru

Tatyana I. Rudnitskaya, Researcher of Department for Training and Improvement of Specialists, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор
Address: SRCAMB 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 31-2182
E-mail: rudnitsckaya.tat@yandex.ru

Tatyana I. Kombarova, PhD (Biological Sciences), Senior Researcher of Biological Testing Laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор
Address: SRCAMB 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0147
E-mail: kombarova@obolensk.org

Elena A. Ganina, Researcher of Laboratory of Nanobiotechnology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор
Address: SRCAMB 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 31-2182
E-mail: ganin43@yandex.ru

Vasily D. Potapov, PhD, DSc (Biological Sciences), Chief Researcher of Department for Training and Improvement of Specialists, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор.
Address: SRCAMB 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 31-2182
E-mail: potapovvd@mail.ru

Ivan A. Dyatlov, Academician of RAS, MD, PhD, DSc, Professor, Director, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор.
Address: SRCAMB 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 31-2182
E-mail: Dyatlov@obolensk.org