



Российская Академия Наук

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВО ФТИЗИАТРИИ II

Под редакцией
чл.-корр. РАН А.Э. Эргешова

МОСКВА
2024

УДК 616-002.5

ББК 55.4

Ф94

Рецензент:

академик РАН *В.И. Литвинов*,
научный руководитель ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом
Департамента здравоохранения г. Москвы»

Редактор-составитель:

д.м.н., проф. *И.Э. Степанян*

Фундаментальные исследования во фтизиатрии II / под ред.
Ф94 А.Э. Эргешева. – М.: Центральный научно-исследовательский инсти-
тут туберкулеза. 2024. – 178 с.

ISBN 978-5-9907563-6-6

В настоящее издание вошли материалы фундаментальных исследо-
ваний, доложенных на второй конференции «Роль фундаментальных
исследований во фтизиатрии», состоявшейся в апреле 2023 г. в ФГБНУ
«ЦНИИТ». Главы книги, подготовленные ведущими учеными России,
работающими в области фтизиатрии, посвящены актуальным вопросам
микобактериологии, инфекционной иммунологии, молекулярной генети-
ки. Книга может представлять интерес для исследователей в области
фтизиатрии, микробиологии, иммунологии, молекулярной генетики,
преподавателей и студентов медицинских вузов и практических врачей.

УДК 616-002.5

ББК 55.4

*Все права защищены. Ни одна часть этого издания не может быть занесена
в память компьютера либо воспроизведена любым способом без предваритель-
ного письменного разрешения издателя.*

ISBN 978-5-9907563-6-6

© Коллектив авторов, 2024

© Центральный научно-
исследовательский институт
туберкулеза, 2024

Содержание

Список авторов	5
Предисловие	10
Список сокращений	11
1. Фотодинамический эффект эндогенных порфиринов в отношении <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Линге И.А., Вострокнутова Г.Н., Капельянц А.С., Апт А.С., Савицкий А.П., Шлеева М.О.	14
2. Иммунный сигналинг: роль в патогенезе противотуберкулезной защиты Уразова О.И., Серебрякова В.А., Санина А.Е., Есимова И.Е., Чурина Е.Г., Колобовникова Ю.В., Кононова Т.Е., Воронкова О.В., Никулина Е.Л.	32
3. Влияние фармакологического ингибирования белка МЛУ Р-gp на провоспалительные свойства макрофагов человека Ерохина М.В., Павлова Е.Н., Лепеха Л.Н., Курынина А.В., Щербакова Е.А., Эргешов А.Э.	68
4. Влияние полиморфизма генов комплекса <i>H2</i> на течение туберкулезной инфекции и эффективность вакцинации BCG Коротецкая М.В., Горбачева Д.В., Байкузина П.Г., Апт А.С.	85
5. Актуальные представления о таксономии, экологии и эпидемиологии нетуберкулезных микобактерий Смирнова Т.Г., Андреевская С.Н., Ларионова Е.Е., Черноусова Л.Н.	102

6. Структура и таксономический состав кишечного микробиома больных туберкулезом легких до и после прохождения противотуберкулезной терапии
Юнусбаева М.М., Бородина Л.Я., Закирова А.М.,
Булатов Ш.Э., Терентьева Д.Р., Юнусбаев Б.Б. 124
7. Влияние комбинации стрессовых факторов на выживаемость *m. Tuberculosis* в модели *In Vitro*
Андреевская С.Н., Смирнова Т.Г.,
Ларионова Е.Е., Черноусова Л.Н. 144
8. Новые отечественные противотуберкулезные препараты-кандидаты: Триазен-индолы и бензатиазины
Никоненко Б.В., Майоров К.Б., Шлеева М.О., Бочарова И.В.,
Стержанова Н.В., Макаров В.А., Вележева В.С. 172

Список авторов

Андреевская Софья Николаевна, к.м.н., старший научный сотрудник, отдел микробиологии ФГБНУ «ЦНИИТ», г. Москва, Россия

Апт Александр Соломонович, д.б.н., профессор, зав. лабораторией иммуногенетики, отдел иммунологии ФГБНУ «ЦНИИТ», г. Москва, Россия

Байкузина Полина Георгиевна, лаборант-исследователь, лаборатория иммуногенетики, отдел иммунологии ФГБНУ «ЦНИИТ», г. Москва, Россия

Бородина Лилия Явдатовна, врач-фтизиатр, зам. главного врача по организационно-методической работе, ГБУЗ «Республиканский клинический противотуберкулезный диспансер», г. Уфа, Россия

Бочарова Ирина Владимировна, к.б.н., зав. питомником лабораторных животных, отдел иммунологии ФГБНУ «ЦНИИТ», г. Москва, Россия

Булатов Шамиль Энгельсович, главный врач ГБУЗ «Республиканский клинический противотуберкулезный диспансер», г. Уфа, Россия

Вележева Валерия Сергеевна, д.х.н., профессор, зав. лабораторией гетероциклических соединений, ФГБУН «Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова» Российской академии наук, г. Москва, Россия

Воронкова Ольга Владимировна, д.м.н., доцент, зав. кафедрой биологии и генетики, ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Томск, Россия

Вострокнутова Галина Николаевна, к.б.н., научный сотрудник, лаборатория биохимии стрессов микроорганизмов, Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФГУ «Федеральный исследовательский центр

“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук», г. Москва, Россия

Горбачева Дарья Викторовна, лаборант-исследователь, лаборатория иммуногенетики, отдел иммунологии ФГБНУ «ЦНИИТ», г. Москва, Россия

Ерохина Мария Владиславовна, д.б.н., зав. лабораторией клеточной биологии, отдел патоморфологии, клеточной биологии и биохимии ФГБНУ «ЦНИИТ»; зам. зав. кафедрой клеточной биологии и гистологии, биологический факультет ФГБОУ ВО «МГУ имени М.В. Ломоносова», г. Москва, Россия

Есимова Ирина Евгеньевна, д.м.н., доцент, кафедра биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Томск, Россия

Закирова Айгуль Масхатовна, врач-фтизиатр, зав. кабинетом мониторинга туберкулеза, ГБУЗ «Республиканский клинический противотуберкулезный диспансер», г. Уфа, Россия

Капрельянц Арсений Сумбатович, д.б.н., профессор, главный научный сотрудник, лаборатория биохимии стрессов микроорганизмов, **Институт биохимии им. А.Н. Баха** ФГУ «Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук», г. Москва, Россия

Колобовникова Юлия Владимировна, д.м.н., доцент, зав. кафедрой нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Томск, Россия

Кононова Татьяна Евгеньевна, к.м.н., доцент, кафедра патофизиологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Томск, Россия

Коротецкая Мария Валерьевна, к.б.н., старший научный сотрудник, отдел иммунологии ФГБНУ «ЦНИИТ»; старший преподаватель, факультет

биоинженерии и биоинформатики ФГБОУ ВО «МГУ имени М.В. Ломоносова», г. Москва, Россия

Курьнина Анна Викторовна, старший преподаватель, кафедра клеточной биологии и гистологии, биологический факультет ФГБОУ ВО «МГУ имени М.В. Ломоносова», г. Москва, Россия

Ларионова Елена Евгеньевна, к.б.н., старший научный сотрудник, зав. лабораторией микробиологической диагностики туберкулеза, отдел микробиологии ФГБНУ «ЦНИИТ», г. Москва, Россия

Лепеха Лариса Николаевна, д.б.н., профессор, главный научный сотрудник, отдел патоморфологии, клеточной биологии и биохимии ФГБНУ «ЦНИИТ», г. Москва, Россия

Линге Ирина Андреевна, к.б.н., старший научный сотрудник, отдел иммунологии, ФГБНУ «ЦНИИТ», г. Москва, Россия

Майоров Константин Борисович, к.б.н., старший научный сотрудник, отдел иммунологии, ФГБНУ «ЦНИИТ», г. Москва, Россия

Макаров Вадим Альбертович, д.фарм.н., главный научный сотрудник, **Институт биохимии им. А.Н. Баха**, ФГУ «Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук», г. Москва, Россия

Никоненко Борис Владимирович, д.м.н., ведущий научный сотрудник, отдел иммунологии ФГБНУ «ЦНИИТ», г. Москва, Россия

Никулина Евгения Леонидовна, к.м.н., доцент, кафедра патофизиологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Томск, Россия

Павлова Екатерина Николаевна, магистр биологических наук, аспирант, кафедра клеточной биологии и гистологии, биологический факультет ФГБОУ ВО «МГУ имени М.В. Ломоносова», г. Москва, Россия

Санина Алина Евгеньевна, аспирант, кафедра патофизиологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Томск, Россия

Савицкий Александр Павлович, д.х.н., профессор, зав. лабораторией физической биохимии, **Институт биохимии им. А.Н. Баха** ФГУ «Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук», г. Москва, Россия

Серебрякова Валентина Александровна, д.м.н., доцент, профессор, кафедра фармакологии, ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Томск, Россия

Смирнова Татьяна Геннадьевна, к.м.н., зав. отделом микробиологии ФГБНУ «ЦНИИТ», г. Москва, Россия

Стержанова Наталья Валерьевна, аспирант, отдел иммунологии ФГБНУ «ЦНИИТ», г. Москва, Россия

Терентьева Дарья Романовна, **студент**, ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский университет ИТМО», г. Санкт-Петербург, Россия

Уразова Ольга Ивановна, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, зав. кафедрой патофизиологии, ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Томск, Россия

Черноусова Лариса Николаевна, д.б.н., профессор, главный научный сотрудник, отдел микробиологии ФГБНУ «ЦНИИТ», г. Москва, Россия

Чурина Елена Георгиевна, д.м.н., профессор, кафедра патофизиологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Томск, Россия

Шлеева Маргарита Олеговна, д.б.н., зав. лабораторией биохимии стрессов микроорганизмов, **Институт биохимии им. А.Н. Баха** ФГУ «Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук», г. Москва, Россия

Щербакова Екатерина Андреевна, младший научный сотрудник, лаборатория клеточной биологии, отдел патоморфологии, клеточной биологии и биохимии ФГБНУ «ЦНИИТ», г. Москва, Россия

Эргешов Атаджан Эргешович, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, директор ФГБНУ «ЦНИИТ»; профессор кафедры фтизиопульмонологии ФГБОУ ВО «Российский университет медицины», г. Москва, Россия

Юнусбаев Баязит Булатович, к.б.н., доцент, старший научный сотрудник, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», г. Санкт-Петербург, Россия

Юнусбаева Миляуша Мусиевна, к.б.н., научный сотрудник, ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский университет ИТМО», г. Санкт-Петербург, Россия

Предисловие

Проблема борьбы с туберкулезной инфекцией сохраняет свою актуальность в масштабах России и всего мира **и в год 300-летия Российской академии наук.**

Несмотря на достижения отечественной и мировой фтизиатрии в первой четверти XXI века, полная победа над туберкулезом пока остается нереализованной мечтой человечества. Туберкулез продолжает быть одним из самых распространенных инфекционных заболеваний, ежегодно унося около полутора миллионов жизней. Резервуар туберкулезной инфекции в мире сокращается очень медленно. Возбудитель туберкулеза противостоит мерам по его искоренению и быстро адаптируется ко всем терапевтическим новациям.

Развитие науки и появление новых технологий в XXI веке открыли возможности для изучения древней туберкулезной инфекции на новом уровне, что позволит повысить эффективность быстрой диагностики туберкулеза и лечения пациентов. Фундаментальным методам исследования принадлежит важнейшая роль в поиске путей и средств для победы над туберкулезом.

Основой для подготовки настоящего издания явились материалы II конференции «Роль фундаментальных методов исследования во фтизиатрии», прошедшей в Центральном научно-исследовательском институте туберкулеза в апреле 2023 г., **расширенные и доработанные авторами.** В книге представлены результаты новейших исследований по иммунологии, иммуногенетике, молекулярной генетике микробиологии туберкулеза, поиску новых лекарств, эффективных в отношении возбудителя туберкулеза.

Директор ФГБНУ «ЦНИИТ»

член-корреспондент РАН А.Э. Эргешов

Список сокращений

АГ	– антиген
АЛК	– 5-аминолевулиновая кислота
АФК	– активные формы кислорода
ВИЧ	– вирус иммунодефицита человека
ДК	– дендритные клетки
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ЖКТ	– желудочно-кишечный тракт
КОЕ	– колониеобразующая единица
ЛТИ	– латентная туберкулезная инфекция
ЛУ	– лекарственная устойчивость
ЛЧ	– лекарственная чувствительность
МБТ	– микобактерии туберкулеза
МБТК	– микобактерии туберкулезного комплекса
МИК	– минимальная ингибирующая концентрация
МЛУ	– множественная лекарственная устойчивость
НТМБ	– нетуберкулезные микобактерии
ПТП	– противотуберкулезные препараты
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РНК	– рибонуклеиновая кислота
СПИД	– синдром приобретенного иммунодефицита
ТБ	– туберкулез
ФДИ	– фотодинамическая инактивация
ФС	– фотосенсибилизатор
ФЧ	– фагоцитарное число
ХТ	– химиотерапия

ШЛУ	– широкая лекарственная устойчивость
APC	– Antigen Presenting Cells (антигенпрезентирующие клетки)
BCR	– B-cell receptor (B-клеточный рецептор)
BODIPY	– бородипирриновые люминофоры
COVID-19	– CoronaVirus Disease (болезнь, вызываемая коронавирусом SARS-CoV-2)
CST	– <i>Clostridium spiroforme</i> Toxin (токсин, выделяемый <i>Clostridium spiroforme</i>)
DC	– Dendritic Cells (дендритные клетки)
HLA	– Human Leukocyte Antigen (человеческий лейкоцитарный антиген)
IL	– Interleukin (интерлейкин)
IFN- γ	– Interferon gamma (интерферон-гамма)
JAK	– Janus Kinases (тирозиновые киназы семейства Янус)
LDA	– Latent Dirichlet Allocation
MAC	– <i>Mycobacterium avium</i> complex (<i>Mycobacterium avium</i> комплекс)
MAGs	– metagenome-assembled genomes (геномы, собранные в метагеноме)
MHC	– Main Histocompatibility Complex (главный комплекс гистосовместимости)
NICD	– Notch Intracellular Domain, Notch-ICD (внутриклеточный домен Notch-рецептора)
NKT	– Natural Killer T-cells (натуральные киллеры)
NO	– оксид азота
P-gp	– P-glycoprotein (P-гликопротеин)
SNP	– Single Nucleotide Polymorphism (однонуклеотидный полиморфизм)
STAT	– Signal Transducer and Activator of Transcription (трансдуктор сигнала и активатор транскрипции)
TCM	– Central Memory T-cells (T-клетки центральной памяти)

- TCR – T-cell Receptor (Т-клеточный рецептор)
- TGF- β – Transforming Growth Factor-beta (трансформирующий фактор роста бета)
- TNF- α – Tumor Necrosis Factor alpha (фактор некроза опухоли альфа)
- TLR – Toll-like Receptors (Toll-подобные рецепторы)
- TPGS – α -tocopherilpropilenglycol 1000 succinate (α -токоферилпропиленгликоль 1000 сукцинат)
- TransEM – Trans Effector Memory T-cells (Т-клетки переходной эффекторной памяти)

1. Фотодинамический эффект эндогенных порфиринов в отношении *Mycobacterium tuberculosis*

Линге И.А., ВострокнUTOва Г.Н., Капрельянец А.С.,
Ант А.С., Савицкий А.П., Шлеева М.О.

Введение

Проблема туберкулеза (ТБ) остается нерешенной для человечества. В течение последнего десятилетия наблюдалось постепенное снижение числа вновь диагностируемых случаев заболевания и числа умерших от ТБ. Пандемия COVID-19 привела к повсеместному снижению уровня диагностики других инфекций, что, к сожалению, ожидаемо привело к росту числа заболевших и смертей от ТБ. По данным ВОЗ, блокировки и ограничения, введенные во время пандемии COVID-19, могут привести к дополнительным 1,4 миллиона смертей от ТБ в период с 2020 по 2025 г. [13]. Эффективность лечения ТБ зависит от формы и тяжести заболевания и достигает 85% в случае лекарственно-чувствительного ТБ [13]. Однако в настоящее время противотуберкулезное лечение в клинике сталкивается со значительными проблемами в связи с распространением резистентных к антибиотикам штаммов возбудителя, в том числе с множественной и широкой лекарственной устойчивостью (МЛУ и ШЛУ). Приобретение устойчивости всего к двум препаратам (изониазиду и рифампицину) снижает эффективность лечения уже до 56% [13]. Можно сказать, что развитие лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза (МБТ) связано с внешними и внутренними факторами. К внешним можно отнести социальные факторы, ведущие к несвоевременной

и/или неточной диагностике, некорректно подобранным или несоблюдаемым курсам лечения. Вместе с тем происходит накопление мутаций в генах, ассоциированных с лекарственной чувствительностью [2]. Не стоит также забывать, что попавшие в организм микобактерии под давлением иммунной системы хозяина могут переходить в дормантное, покоящееся состояние, сопровождающееся физиологическими изменениями микобактерий. Покоящиеся клетки МБТ характеризуются низкой метаболической активностью и прекращением синтеза многих макромолекул, в том числе клеточной стенки, вследствие чего известные противотуберкулезные препараты (ПТП) в отношении подобных бактерий не активны. По оценкам ВОЗ, примерно четверть населения Земли являются носителями латентной туберкулезной инфекции (ЛТИ), обусловленной покоящимися МБТ. Важно, что в состоянии покоя МБТ могут десятилетиями сохраняться в организме хозяина, не приводя к появлению каких-либо симптомов. Вследствие разных причин может наступить реактивация ТБ, что может спровоцировать появление новых случаев и заражение окружающих. Таким образом, латентные носители являются скрытым резервуаром и потенциальным источником заражения. Одним из факторов риска реактивации ЛТИ в последние годы стало заболевание COVID-19. В значительном проценте случаев развивающийся активный ТБ оказывается лекарственно-устойчивым [25]. Таким образом, в человеческой популяции существуют МБТ с разными типами приобретенной резистентности к ПТП: штаммы, генетически приобретшие устойчивость к ПТП, и физиологически-устойчивые покоящиеся МБТ латентных носителей, которые могут иметь и дополнительную генетическую устойчивость. Сложившаяся ситуация требует поиска и разработки новых подходов к борьбе с лекарственно-резистентной инфекцией [19].

Эффективной альтернативой ПТП может служить фотодинамическая инактивация (ФДИ) МБТ, поскольку ее действие основано на образовании активных форм кислорода, действующих независимо от наличия конкретной мишени для ПТП, и она уничтожает

как лекарственно-устойчивые, так и покоящиеся формы МБТ. Комбинированная терапия, включающая ФДИ и ПТП, является перспективной стратегией борьбы с бактериальными инфекциями, вызванными бактериями с МЛУ и ШЛУ [12]. ПТП и ФДИ могут действовать синергически, поэтому их комбинация может привести к значительному улучшению клинического исхода даже при неоптимальных концентрациях отдельных препаратов, а снижение доз может ослабить токсическое действие ПТП [12]. Таким образом, включение ФДИ в схемы антибактериальной терапии может оказать немалую практическую пользу.

Принципы фотодинамической инактивации бактерий

Принцип антимикробной ФДИ (аФДИ) основан на фотоинактивации бактерий в присутствии определенных соединений, называемых фотосенсибилизаторами (ФС). Принято считать, что в основе ФДИ лежат два основных механизма. Механизм I типа основан на образовании активных форм кислорода (АФК) при воздействии светом определенной длины волны. АФК реагируют с необходимыми для жизни клеток молекулами, нарушая метаболизм и приводя к гибели бактерий. Механизм II типа основан на образовании форм синглетного кислорода ($^1\text{O}_2$) с высокой реакционной способностью, которые могут напрямую действовать на жизненно важные молекулы бактерий, или же опосредует появление АФК. В последнее время идет обсуждение и третьего механизма действия ФДИ, основанного на локальном перегреве (гипертермии) различных внутриклеточных зон бактерий за счет фотопоглощения [41]. Важно, что развитие устойчивости бактерий к ФДИ считается маловероятным из-за неспецифического повреждения, вызываемого АФК, $^1\text{O}_2$ или локальным перегревом [7, 21].

ФДИ микобактерий

Эффективное действие ФДИ на микобактерии было продемонстрировано уже в конце XIX века, когда Нильс Финсен опубликовал

результаты лечения ТБ кожи (*lupus vulgaris*) с помощью фототерапии, за что в 1903 г. был удостоен Нобелевской премии. Однако механизм этого явления был установлен лишь сто с небольшим лет спустя. Было высказано предположение, что ФДИ микобактерий происходит за счет поглощения света накапливающимися в них порфиринами [22]. Несмотря на давнюю историю обнаружения ФДИ бактерий, интерес к этой области возобновился лишь в последние годы из-за проблемы массового развития лекарственной резистентности множества видов и штаммов бактерий и необходимости новых подходов к терапии.

В большинстве случаев для исследования активности действия ФДИ применяются экзогенные ФС различной структуры, среди которых основными являются фенотиазиниумы, фталоцианины, порфирины и фуллерены [30]. Эффективность аФДИ во многом зависит от степени проникновения ФС внутрь клеток бактерий и (или) их расположения в клеточной стенке бактерии. Так, аФДИ более действенна в отношении грамположительных бактерий вследствие более простой структуры их клеточной стенки. В качестве экзогенных ФС также используют метиленовый синий, действующий значительно быстрее по сравнению с порфиринами [29], и бородининовые люминофоры (BODIPY), поскольку они обладают интенсивными хромофорными и флуоресцентными свойствами и высокой устойчивостью к агрессивным факторам окружающей среды [18]. Показано, что ФДИ микобактерий *M. smegmatis* и *M. tuberculosis* в присутствии метиленового синего зависит от дозы препарата [6, 28]. Для повышения активности ФС на основе BODIPY применяют формы, связанные с трегалозой, что способствует проникновению через мембрану и усилению действия ФС [10]. В качестве альтернативы органическим ФС используют наночастицы, которые проникают внутрь клеток за счет пассивного эндоцитоза. Это позволяет повысить эффективность доставки ФС в клетки, обеспечивая более высокое поглощение света и снижая обесцвечивание во время ФДИ [31].

Стоит отметить, что большинство исследований по аФДИ с использованием экзогенных ФС проводят *in vitro*, и лишь несколько работ демонстрируют эффективность аФДИ *in vivo*. В частности, была показана активность производных бензопорфирина в модели искусственной подкожной гранулемы при инфицировании мышей *Mycobacterium bovis*, которые погибали после воздействия света длиной волны 690 нм [24]. Важно, что в параллельном исследовании активность выбранного ФС была одинакова при ФДИ как в отношении чувствительных, так и в отношении устойчивых к лекарственным препаратам клинических штаммов *M. tuberculosis* [24].

Использование экзогенных ФС ограничено, если необходимо воздействовать на бактерии, доступ к которым затруднен. Кроме того, ФС не всегда способны достаточно хорошо взаимодействовать с бактериями и проникать через сложную наружную мембрану микроорганизмов. Это относится и к внутриклеточным бактериям, в том числе микобактериям, преимущественно локализованным в легких. Кроме того, важно, чтобы ФС избирательно связывался и накапливался в бактериях, но не в клетках хозяина. В связи с этим более перспективным представляется использование не требующих доставки эндогенных фотосенсибилизаторов. Примером таких ФС могут служить порфирины. В частности, эндогенные порфирины содержатся в таких клинически важных бактериях, как *Propionibacterium acnes*, вызывающих акне, или *Helicobacter pylori*, способствующих развитию гастрита и язвенной болезни желудка и 12-перстной кишки. Одними из наиболее перспективных и эффективных ФС являются металлокомплексы порфиринов, среди которых выделяются комплексы цинка [1, 3, 8, 16, 17, 34].

Интересно, что еще до выявления реализующего механизма, была показана ФДИ микобактерий, предположительно связанная с эндогенными ФС [30]. Накопление порфиринов показано у микобактерий *M. smegmatis*, *M. terra*, *M. tuberculosis*, в том числе в dormantных формах *M. tuberculosis*. Следует отметить, что первые эксперименты, демонстрирующие ФДИ микобактерий, были проведены

с использованием света с длинами волн 405 нм, 464 нм [14, 15], 662 нм [6], 850 нм [15], что не соответствует спектрам поглощения порфиринов (550–600 нм). Более того, освещение суспензий *M. tuberculosis* светом с длиной волны 565 нм не приводило к значимому снижению числа жизнеспособных МБТ [30], вероятно вследствие низкого содержания эндогенных порфиринов. При этом освещение *M. smegmatis* вызывало инактивацию dormantных микобактерий, но не микобактерий в логарифмической фазе роста [32, 33].

Стимулировать синтез порфиринов можно добавлением в среду с растущими микобактериями предшественника синтеза гема – 5-аминолевулиновую кислоту (АЛК). АЛК, в отличие от экзогенных порфиринов, может проникать в бактерии, например в *Haemophilus parainfluenzae*, через гидрофильные поры в мембране [37]. Действительно, добавление АЛК в среду приводит к увеличению внутриклеточной концентрации уропорфирина и копропорфирина у *M. smegmatis* и *M. phlei* в стационарной фазе [7, 32]. Освещение таких бактерий светом длиной волны 532 нм *in vitro* приводит к падению жизнеспособности (числу КОЕ) на 2,5 порядка [31]. В отношении *M. tuberculosis* ни использование эндогенных ФС, ни их АЛК-опосредованная индукция до недавнего времени не изучались.

Результаты

Накопление порфиринов в *M. tuberculosis*

Как описано выше, ЛТИ связывают с образованием dormantных форм МБТ. Dormantные микобактерии не делятся, не образуют колоний при посеве на плотные среды и находятся в длительном состоянии покоя. Морфологически dormantные МБТ характеризуются образованием овоидных форм с утолщенной стенкой. Кроме того, в таких клетках меняются многие метаболические пути. Получение таких форм микобактерий от латентных носителей крайне затруднительно, поскольку их очень мало и непонятна их локализация. В связи с этим были разработаны модели получения dormantных МБТ

in vitro [4, 39, 42]. Позднее была разработана модель постепенного понижения pH среды [31], что имитирует ситуацию микроокружения микобактерии после поглощения макрофагами. Преимущество разработанной модели состоит в том, что, находясь длительное время в некультивируемом состоянии (свыше шести лет), микобактерии сохраняют способность к реактивации. Полученные таким образом микобактерии становятся нечувствительны к действию антибиотиков [31], поэтому представляет особый интерес использовать их для разработки новых видов терапии.

Как отмечено выше, дормантные *M. smegmatis* накапливают эндогенные порфирины и становятся чувствительны к ФДИ. *M. tuberculosis* также накапливают порфирины при переходе в дормантную форму. Количество порфиринов в спящих *M. tuberculosis* в 6 раз выше, чем в активных ($0,25 \pm 0,05$ нг и $0,033 \pm 0,01$ нг порфиринов / мг влажного веса дормантных и активных форм МБТ соответственно), однако это количество на несколько порядков ниже, чем в *M. smegmatis* ($300 \pm 0,1$ нг и $7 \pm 0,05$ нг порфиринов / мг влажного веса дормантных и активных форм соответственно). Как и в случае с невирулентными микобактериями *M. smegmatis*, добавление АЛК в среду роста *M. tuberculosis* стимулировало образование и накопление порфиринов. Стоит отметить, что само по себе добавление АЛК не влияло на способность микобактерий переходить в дормантную форму. При этом добавление в среду 3мМ АЛК приводило к увеличению количества порфиринов в бактериях *M. tuberculosis* в 85 раз в течение 10 дней культивации и достигало 17 нг/мг влажной массы.

Накопление порфиринов можно было заметить невооруженным глазом, поскольку микобактериальная масса приобретала розоватый цвет. Характеристика спектров поглощения хлороформ-метанольной фракции экстракта микобактерий выявила наличие свободного порфирина (максимумы поглощения при 500, 540, 575 и 620 нм). Кроме того, наличие порфиринов в микобактериях, культивируемых в присутствии АЛК, было подтверждено и с помощью флуоресцентной конфокальной микроскопии.

Влияние металлов (Fe, Zn, Mg) на интенсивность накопления порфиринов в покоящихся *M. tuberculosis*, выращенных в присутствии АЛК

Мы также обнаружили, что при повышении концентрации ионов некоторых металлов в среде роста наблюдается увеличение внутриклеточной концентрации порфиринов в микобактериях. При увеличении концентрации железа в форме цитрата аммонийного железа (III) в 2,5 и 10 раз по сравнению со стандартным содержанием в среде Сотона влияния на интенсивность продукции эндогенных порфиринов не наблюдалось. Дальнейшее повышение концентраций цитрата аммонийного железа (III) (1,3 и 3,2 г/л) индуцировало гетерогенность форм микобактерий с появлением коротких палочек наряду с овоидными клетками. При этом уровень эндогенных порфиринов в этой культуре снизился до неопределяемых значений.

В другой серии экспериментов мы оценивали влияние магния и цинка на продукцию порфиринов при переходе клеток *M. tuberculosis* в состояние покоя в присутствии АЛК. Оказалось, что при увеличении концентрации Mg в 5 и 10 раз (с 5 мМ до 25 и 50 мМ) и Zn в 10 раз относительно стандартного содержания в среде Сотона наблюдалось заметное увеличение продукции эндогенных порфиринов в клетках микобактерий. Повышение концентрации только Mg (до 25 мМ) или только Zn приводило к увеличению продукции внутриклеточных порфиринов в 3,5 и 2,5 раза соответственно. При этом одновременное увеличение концентраций Zn и Mg (до 10 мкМ и 25 мМ соответственно) вызывало синергический эффект и приводило к 8-кратному увеличению продукции порфиринов в клетках *M. tuberculosis*.

Фотодинамическая инактивация *M. tuberculosis*

Как отмечено выше, ФДИ дормантных форм *M. tuberculosis*, полученных без добавления АЛК, была неэффективна в отличие от полученных в подобных условиях *M. smegmatis*, вероятно, вследствие низкого содержания эндогенных порфиринов в клетках МБТ. Поскольку добавление в среду АЛК приводит к значительному накоплению

порфиринов, мы оценили, проявятся ли ФДИ в отношении таких микобактерий. Мы использовали свет с длинами волн, характерными для спектра поглощения порфиринов. Оказалось, что воздействие светом длиной волны 532 и 565 нм привело к снижению числа жизнеспособных активных МБТ примерно на 3 порядка, а воздействие в течение 30 минут на dormantные формы привело к гибели 99,99% МБТ.

Переход в dormantное состояние микобактерий ассоциирован со стрессом, в частности при поглощении макрофагами [5]. В связи с этим мы оценили, будут ли микобактерии, фагоцитированные легочными макрофагами *in vitro*, накапливать порфирины при добавлении 2мМ АЛК в культуральную среду (RPMI1640, 5% FCS). Оказалось, что уже через 10 дней совместного культивирования *M. tuberculosis* и легочных макрофагов мышей C57BL/6 (B6) наблюдалось накопление порфиринов в микобактериях, что было визуально подтверждено с помощью флуоресцентной микроскопии (фильтр LP590). Интересно, что фоточувствительность таких микобактерий была значительно выше и ФДИ привела практически к полной стерилизации облученных образцов. При этом чувствительность к ФДИ контрольных микобактерий, культивируемых в таких же условиях (RPMI1640, 5% FCS, 2мМ АЛК), но без макрофагов, была сопоставима с бактериями, выращиваемыми в традиционной среде для микобактерий (снижение числа КОЕ на 3 порядка).

Мы предположили, что повышенная чувствительность к освещению поглощенных макрофагами МБТ может быть связана с накоплением порфиринов самими макрофагами. Для проверки этой гипотезы мы культивировали легочные макрофаги в присутствии АЛК (2мМ) в течение 10 дней. Действительно, визуализация макрофагов с помощью флуоресцентной микроскопии выявила накопления внутри макрофагов красного компонента со спектром излучения, соответствующего порфиринам (фильтр LP590). Затем к культуре макрофагов добавляли dormantные микобактерии (MOI = 1) на 16 ч., после чего облучали полученные культуры (565 нм, 30 мин.).

Оказалось, что облучение полученных в присутствии АЛК dormantных МБТ, фагоцитированных макрофагами, предварительно накопившими порфирины, привело к полной стерилизации образцов. При этом облучение контрольных образцов, в которых инкубированные с АЛК макрофаги поглощали dormantные МБТ, полученные без добавления АЛК, также приводило к гибели микобактерий, но в меньшей степени. Эти данные подтверждают синергетический эффект действия АЛК и макрофагов.

Механизм действия порфиринов на клетки микобактерий пока до конца не известен. Значительное количество накопленных порфиринов в клетках *M. tuberculosis*, выращенных в присутствии АЛК, можно экстрагировать органическими растворителями. В связи с этим вполне вероятно, что эти порфирины локализованы в клеточных мембранах, как это было обнаружено для *M. smegmatis* [23]. В этом случае можно предположить, что ФДИ может воздействовать на некоторые ферменты, связанные с мембраной. Одним из важных процессов, связанных с мембраной, является транспорт электронов по дыхательной цепи. Пока не удалось определить, приводит ли облучение dormantных микобактерий к блокировке дыхательной цепи, и этот вопрос требует дальнейшего изучения.

Обсуждение

Интерес к применению аФДИ для патогенных бактерий возрос в последние годы. В большинстве случаев для этих целей применяют экзогенные ФС, в том числе на основе порфиринов. В частности, в отношении МБТ с МЛУ было продемонстрировано действие аФДИ с применением радахлорина [36]. Эффективность экзогенных порфиринов в качестве ФС была показана также и для других микобактерий: *M. fortuitum* [29], *M. bovis* BCG [24], *M. marinum* [40] и *M. smegmatis* [11] *in vitro* и *in vivo*. Однако, как описано выше, применение экзогенных ФС не всегда эффективно, в связи с чем может

быть использован подход, при котором воздействие может быть оказано на эндогенные ФС, в том числе порфирины.

Накопление свободных порфиринов в виде копро- и уропорфиринов в покоящихся формах *M. smegmatis* способствует антимикробному действию ФДИ [23]. В данном исследовании продемонстрировано накопление порфиринов и в покоящихся формах микобактерий *M. tuberculosis*, однако их концентрация недостаточна для успешной аФДИ. Индукция синтеза порфирина в клетках с помощью АЛК является наиболее известным подходом в ФДИ для противоопухолевой терапии [9, 27]. Мы применили подобный подход и добавили предшественник синтеза гема, АЛК, в культуру *M. tuberculosis* перед переходом в состояние покоя, что значительно увеличивало накопление порфиринов.

Интересно, что усиленное накопление порфиринов при культивации в присутствии АЛК и повышенной концентрации цинка и магния приводит к значительному повышению чувствительности МБТ к ФДИ. Важно, что в нашем исследовании полная элиминация dormantных форм микобактерий наблюдалась при облучении светом длиной волны 532 и 565 нм, что соответствует поглощению порфиринов.

Эффективный подход к использованию АЛК для ФДИ был показан в случаях легкой доступности мест облучения. Так, совсем недавно этот подход был использован для инактивации патогенных бактерий, таких как *Streptococcus oralis*, на поверхности титановых имплантатов [26], вызывающих кожные инфекции нетуберкулезных микобактерий, в том числе *M. abscessus* [38, 43], вызывающие кожные инфекции [35, 44]

Однако стоит отметить, что во всех упомянутых исследованиях облучение приводило к снижению числа бактерий (оценка КОЕ) не больше чем на порядок, но не к полной стерилизации. В нашем исследовании АЛК-опосредованная ФДИ была значительно эффективнее, особенно в отношении покоящихся форм *M. tuberculosis*, что может отражать особенности метаболизма медленно растущих форм

бактерий. Отсутствие биосинтеза полимеров и жизненно необходимых ферментов, необходимых в том числе для защиты от свободных радикалов и АФК, способствует более успешной элиминации микобактерий при ФДИ. В дополнение к этому совместный эффект накопленных эндогенных порфиринов микобактерий и макрофагов привел к полной стерилизации образцов. Полученные данные позволяют использовать данный подход для перспективной элиминации микобактерий внутри макрофагов организма.

Какие именно компоненты в бактериальных клетках являются мишенью аФДИ, до сих пор является предметом дискуссий. Среди возможных мишеней рассматриваются липиды **посредством их перекисного окисления, перекисного окисления**, нуклеиновые кислоты и белки [20]. В проведенном исследовании было обнаружено значительное нарушение эндогенного дыхания вегетативных форм микобактерий, что может быть вызвано снижением потока субстрата или же прямым подавлением дыхательной цепи, что наиболее вероятно вследствие того, что значительная часть порфиринов локализована в мембране, однако этот вопрос требует дальнейшего исследования.

Заключение

Таким образом, результаты данного исследования открывают перспективу эрадикации вегетативных и дормантных форм микобактерий, в том числе с лекарственной устойчивостью. Учитывая степень развития современных технологий и методов фотодинамической терапии онкологических заболеваний, в том числе внутри-тканевую ФДИ и эндоскопическую технику, применение аФДИ может быть перспективным не только для кожных легкодоступных инфекций, но также для лечения ТБ.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19–15–00324.

Литература

1. Alenezi K., Tovmasyan A., Batinic-Haberle I., Benov L.T. Optimizing Zn Porphyrin-Based Photosensitizers for Efficient Antibacterial Photodynamic Therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2017;17:154–159, doi: 10.1016/J.PDPDT.2016.11.009
2. Allué-Guardia A., García J.I., Torrelles J.B. Evolution of Drug-Resistant Mycobacterium Tuberculosis Strains and Their Adaptation to the Human Lung Environment. *Front Microbiol*, 2021;12, doi: 10.3389/fmicb.2021.612675
3. Awad M.M., Tovmasyan A., Craik J.D. et al. Important Cellular Targets for Antimicrobial Photodynamic Therapy. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016;100:7679–7688, doi: 10.1007/S00253–016–7632–3
4. Bentrup K.H. zu; Russell D.G. Mycobacterial Persistence: Adaptation to a Changing Environment. *Trends Microbiol*, 2001;9(12):597–605, doi: 10.1016/S0966–842X(01)02238–7
5. Biketov S., Mukamolova G.V., Potapov V. et al. Culturability of Mycobacterium tuberculosis cells isolated from murine macrophages: A bacterial growth factor promotes recovery. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000;29(4):233–240, doi: 10.1111/j.1574–695X.2000.tb01528.x
6. Bredikhin D.A., Nikonov S.D., Cherednichenko A.G. et al. In vitro Photodynamic Inactivation of Mycobacterium Tuberculosis by Methylene Blue. *Tuberculosis and Lung Diseases*, 2019;97(7):28–33, (In Russ.), doi: 10.21292/2075–1230–2019–97–7–28–33
7. Bruce-Micah R., Hüttenberger D., Freitag L. et al. Pharmacokinetic of ALA and H-ALA Induced Porphyrins in the Models Mycobacterium Phlei and Mycobacterium Smegmatis. *J Photochem Photobiol B*, 2009;97(1):1–7, doi: 10.1016/J.JPHOTOBIOB.2009.07.004
8. Chen L., Bai H., Xu J.F. et al. Supramolecular Porphyrin Photosensitizers: Controllable Disguise and Photoinduced Activation of Antibacterial

- Behavior. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017;9(16):13950–13957, doi: 10.1021/ACSAMI.7B02611
9. *Dirschka T., Radny P., Dominicus R. et al.* Long-Term (6 and 12 Months) Follow-up of Two Prospective, Randomized, Controlled Phase III Trials of Photodynamic Therapy with BF-200 ALA and Methyl Aminolaevulinate for the Treatment of Actinic Keratosis. *Br J Dermatol*, 2013;168(4):825–836, doi: 10.1111/BJD.12158
 10. *Dutta A.K., Choudhary E., Wang X. et al.* Trehalose Conjugation Enhances Toxicity of Photosensitizers against Mycobacteria. *ACS Cent Sci*, 2019;5(4):644–650, doi:10.1021/acscentsci.8b00962
 11. *Feese E., Ghiladi R.A.* Highly Efficient in vitro Photodynamic Inactivation of Mycobacterium Smegmatis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2009;64(4):782–785, doi: 10.1093/jac/dkp278
 12. *Feng Y., Coradi Tonon C., Ashraf S., Hasan T.* Photodynamic and Antibiotic Therapy in Combination against Bacterial Infections: Efficacy, Determinants, Mechanisms, and Future Perspectives. *Adv Drug Deliv Rev*, 2021;177:113941, doi: 10.1016/J.ADDR.2021.113941
 13. Global Tuberculosis Report 2021 Available online: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2021> (accessed on 19 April 2022).
 14. *Guffey J.S., Payne W., James L.* Inactivation of Mycobacterium Smegmatis Following Exposure to 405-Nanometer Light from a Supraluminous Diode Array. *Wounds*, 2013;25(5):131–135.
 15. *Guffey J., Payne W., Martin K. et al.* Inhibition of Mycobacterium Smegmatis Using Near-IR and Blue Light. *Int J Res Med Sci*, 2014;2(1):42, doi: 10.5455/2320–6012.ijrms20140209
 16. *Gyulkhandanyan A.G., Paronyan M.H., Gyulkhandanyan A.G. et al.* Meso-Substituted Cationic 3-and 4-N-Pyridylporphyrins and Their Zn(II) Derivatives for Antibacterial Photodynamic Therapy. *J Innov Opt Health Sci*, 2022;15(1):2142007, doi: 10.1142/S1793545821420074

17. Hanakova A., Bogdanova K., Tomankova K. et al. The Application of Antimicrobial Photodynamic Therapy on *S. Aureus* and *E. Coli* Using Porphyrin Photosensitizers Bound to Cyclodextrin. *Microbiol Res*, 2014;169(2–3):163–170, doi: 10.1016/j.micres.2013.07.005
18. Kamkaew A., Lim S.H., Lee H.B. et al. BODIPY Dyes in Photodynamic Therapy. *Chem Soc Rev*, 2013;42(1):77–88, doi: 10.1039/c2cs35216h
19. Kaprelyants A.S., Salina E.G., Makarov V.A. How to Kill Dormant Mycobacterium Tuberculosis. *Int J Mycobacteriol*, 2018;7(4):399–400. doi: 10.4103/ijmy.ijmy_106_18
20. Liu Y., Qin R., Zaat S.A.J. et al. Antibacterial Photodynamic Therapy: Overview of a Promising Approach to Fight Antibiotic-Resistant Bacterial Infections. *J Clin Transl Res*, 2015;1(3):140–167, doi: 10.18053/jctres.201503.002
21. Maisch T. Revitalized Strategies against Multi-Resistant Bacteria: Antimicrobial Photodynamic Therapy and Bacteriophage Therapy. *Antiinfect Agents Med Chem*, 2007;6(2):145–150, doi: 10.2174/187152107780361634
22. Møller K.I., Kongshoj B., Philipsen P.A. et al. How Finsen’s Light Cured Lupus Vulgaris. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2005;21(3):118–124, doi: 10.1111/J.1600–0781.2005.00159.X
23. Nikitushkin V.D., Shleeva M.O., Zinin A.I. et al. The Main Pigment of the Dormant Mycobacterium Smegmatis Is Porphyrin. *FEMS Microbiol Lett*, 2016; 363(19):206, doi: 10.1093/femsle/fnw206
24. O’Riordan K., Sharlin D.S., Gross J. et al. Photoinactivation of Mycobacteria in vitro and in a New Murine Model of Localized Mycobacterium Bovis BCG-Induced Granulomatous Infection. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006;50(5):1828–1834, doi: 10.1128/AAC.50.5.1828–1834.2006
25. Patra K., Batabyal S., Mandal K. et al. Tuberculosis and COVID-19: A Combined Global Threat to Human Civilization. *Clin Epidemiol Glob Health*, 2022;(15):101031, doi: 10.1016/J.CEGH.2022.101031

26. Petrini M., Di Lodovico S., Iezzi G. et al. Photodynamic Antibiofilm and Antibacterial Activity of a New Gel with 5-Aminolevulinic Acid on Infected Titanium Surfaces. *Biomedicines*, 2022;10(3):572, doi: 10.3390/biomedicines10030572
27. Reinhold U. A Review of BF-200 ALA for the Photodynamic Treatment of Mild-to-Moderate Actinic Keratosis. *Future Oncology*, 2017;13(27):2413–2428, doi: 10.2217/fon-2017-0247
28. Shim I., Choi M., Min Y. et al. Effect of Methylene Blue-Mediated Photodynamic Therapy on Wild-Type and Ciprofloxacin-Resistant Mycobacterium Smegmatis. *Journal of Bacteriology and Virology*, 2016;46(1):27–35, doi: 10.4167/jbv.2016.46.1.27
29. Shin M.H., Huang F.C. Effects of Photodynamic Therapy on Rapidly Growing Nontuberculous Mycobacteria Keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011;52(1):223–229, doi: 10.1167/IOVS.10-5593
30. Shleeva M., Savitsky A., Kaprelyants A. Photoinactivation of Mycobacteria to Combat Infection Diseases: Current State and Perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2021;105: 4099–4109, doi: 10.1007/S00253-021-11349-0
31. Shleeva M.O., Kudykina Y.K., Vostroknutova G.N. et al. Dormant Ovoid Cells of Mycobacterium Tuberculosis Are Formed in Response to Gradual External Acidification. *Tuberculosis*, 2011;91(2):146–154, doi: 10.1016/j.tube.2010.12.006
32. Shleeva M.O., Savitsky A.P., Nikitushkin V.D. et al. Effect of Photodynamic Inactivation against Dormant Forms and Active Growing Cells of Mycobacterium Smegmatis. *Appl Biochem Microbiol*, 2020;56:285–291, doi: 10.1134/S000368382003014X
33. Shleeva M.O., Savitsky A.P., Nikitushkin V.D. et al. Photoinactivation of Dormant Mycobacterium Smegmatis Due to Its Endogenous Porphyrins. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019;103:9687–9695, doi: 10.1007/S00253-019-10197-3
34. Skwor T.A., Klemm S., Zhang H. et al. Photodynamic Inactivation of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus and Escherichia Coli:

- A Metalloporphyrin Comparison. *J Photochem Photobiol B*, 2016;165:51–57, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.10.016
35. Sun K., Li J., Li L. et al. A New Approach to the Treatment of Nontuberculous Mycobacterium Skin Infections Caused by Iatrogenic Manipulation: Photodynamic Therapy Combined with Antibiotics: A Pilot Study. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2022;37:102695, doi: 10.1016/J.PDPDT.2021.102695
36. Sung N., Back S., Jung J.H. et al. Inactivation of Multidrug Resistant (MDR) – and Extensively Drug Resistant (XDR) – Mycobacterium Tuberculosis by Photodynamic Therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2013;10(4):694–702, doi: 10.1016/J.PDPDT.2013.09.001
37. Van der Meulen F.W., Ibrahim K., Sterenborg H.J.C.M. et al. Photodynamic Destruction of Haemophilus Parainfluenzae by Endogenously Produced Porphyrins. *J Photochem Photobiol B*. 1997;40(3):204–208, doi: 10.1016/S1011–1344(97)00057–2
38. Wang X., Wan M., Zhang L. et al. ALA_PDT Promotes Ferroptosis-Like Death of Mycobacterium Abscessus and Antibiotic Sterilization via Oxidative Stress. *Antioxidants (Basel)*, 2022;11(3):546 doi:10.3390/ANTIOX11030546
39. Waynel L.G., Lin' K.-Y. Glyoxylate Metabolism and Adaptation of Mycobacterium Tuberculosis to Survival under Anaerobic Conditions. *Infect Immun*, 1982;37(3):1042–1049, doi: 10.1128/iai.37.3.1042–1049.1982
40. Wiegell S.R., Kongshoj B., Wulf H.C. Mycobacterium Marinum Infection Cured by Photodynamic Therapy. *Arch Dermatol*, 2006;142(9):1241–1242, doi: 10.1001/archderm.142.9.1241
41. Yoo S.W., Oh G., Ahn J.C., Chung E. Non-Oncologic Applications of Nanomedicine-Based Photo-Therapy. *Biomedicines*, 2021;9(2):113, doi: 10.3390/biomedicines9020113
42. Young M., Mukamolova G.V., Kaprelyants A.S. Mycobacterial Dormancy and Its Relation to Persistence. In *Mycobacterial molecular biology*,

- T. Parish Ed., *Mycobacterium: Molecular Microbiology*. UK: Horizon Bioscience, 2005. p. 265–320.
43. Yue C., Wang L., Wang X. et al. In vitro Study of the Effect of ALA-PDT on Mycobacterium Abscessus and Its Antibiotic Susceptibility. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2022;38:102802, doi: 10.1016/J.PDPDT.2022.102802
44. Zhang Z., Liu J., Wan C. et al. Successful Treatment of Tuberculosis Verrucosa Cutis with Fester as Primary Manifestation with Photodynamic Therapy and Anti-Tubercular Drugs. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2022;38:102763, doi: 10.1016/J.PDPDT.2022.102763

2. Иммунный сигналинг: роль в патогенезе противотуберкулезной защиты

Уразова О.И., Серебрякова В.А., Санина А.Е.,
Есимова И.Е., Чурина Е.Г., Колобовникова Ю.В.,
Кононова Т.Е., Воронкова О.В., Никулина Е.Л.

Введение

Этиологическим фактором ТБ является инфекционный возбудитель – *Mycobacterium tuberculosis*, обладающий свойством вызывать повреждение клеток и тканей, в том числе клеток крови, участвующих в реакциях противоинфекционной защиты. ТБ – мультифакториальное заболевание, в возникновении и развитии которого важная роль принадлежит факторам, способствующим (внешним или средовым) и предрасполагающим (внутренним или организменным) [10]. К внешним факторам относятся прежде всего низкий социальный уровень и контакт с больным ТБ бактериовыделителем, к внутренним – наряду с общеизвестными (мужской пол, возраст, конституциональные особенности, наличие хронических заболеваний внутренних органов и др.) причисляется ставший особенно актуальным в последние годы первичный и вторичный иммунодефицит – спонтанный, приобретенный (в связи с ВИЧ-инфекцией) и индуцированный (в связи с действием других инфекционных, а также неинфекционных болезнетворных факторов) [10, 11].

Иммунитет представляет собой феномен биологической защиты организма от генетически чужеродных патогенов (антигенов). Это форма физиологической специфической реактивности иммунной системы в ответ на антигены, обеспечивающая резистентность

организма к их болезнетворному действию. Основными функциями иммунной системы являются: защитная (удаление «чужого» и «модифицированного своего»), акцептивная (сохранение «чужого» в своем – симбиоз с нормальной микрофлорой, толерантность к пищевым антигенам, беременность), регуляторная (регуляция роста и развития клеток и тканей). Иммунные функции обеспечиваются молекулярно-клеточными факторами, в том числе сигнальными молекулами, среди которых выделяют: клеточные рецепторы для связывания антигена (паттерн-распознающие (PRR) – на антигенпрезентирующих клетках Toll-подобные (Toll-like Receptors – TLR)), для презентации антигена (главный комплекс гистосовместимости (Main Hystocompatibility Complex – MHC) или человеческий лейкоцитарный антиген (Human Leukocyte Antigen – HLA) класса I – на всех клетках организма, класса II – на иммуноцитах) и для распознавания антигена (Т-клеточный рецептор (T-cell receptor – TCR) – на Т-лимфоцитах, В-клеточный рецептор (B-cell receptor – BCR) – на В-лимфоцитах), а также молекулы костимуляции и рецепторы к гуморальным факторам иммунитета. К последним относятся компоненты комплемента, цитокины, антитела. Ко-рецепторы Т-клеток – CD4 и CD8 – повышают сродство TCR к комплексу HLA с антигеном, CD3 обеспечивают проведение сигнала внутрь клетки. Среди регуляторных цитокинов межклеточной кооперации решающее значение имеют медиаторы, выделяемые регуляторными Т-лимфоцитами-хелперами типа Th1 (интерлейкины, Interleukin – IL) IL-2, IL-12, интерферон- γ (Interferon gamma – IFN- γ), фактор некроза опухоли α (Tumor Necrosis Factor alpha – TNF- α), Th2 (IL-4, IL-5, IL-13), Th17 (IL-17, IL-22) и регуляторными Т-лимфоцитами (Treg) – IL-10, трансформирующий фактор роста β (Transforming Grows Factor beta – TGF- β).

ТБ является примером инфекции с внутриклеточным паразитированием возбудителя и характеризуется дисрегуляцией прежде всего иммунного ответа клеточного (клеточно-опосредованного) типа, основными антигенпрезентирующими клетками (Antigen Presenting Cell – APC) которого являются дендритные клетки (Dendritic

Cell – DC), регуляторными и эффекторными клетками – Т-лимфоциты и макрофаги [6, 7, 12]. Доказано, что обязательным условием активации Т-лимфоцита при взаимодействии с DC являются три сигнала – антигенный, костимуляторный и цитокиновый. Результатом их недостаточности являются апоптоз, гиперергия/анергия и нарушение пролиферации Т-лимфоцитов с развитием лимфоцитопении (Т-клеточного дефицита). Наряду с этим многие инфекционные возбудители (в том числе *M. tuberculosis*) способны оказывать повреждающее действие на иммунокомпетентные клетки, вызывая супрессию иммунного ответа. Остается дискуссионным вопрос о том, какие конкретно патогенетические факторы лежат в ее основе. Какова роль клеток врожденного иммунитета (в том числе М1- и М2-макрофагов) в патогенезе нарушений противотуберкулезного иммунитета? Актуальность поиска ответов на эти вопросы связана с проблемой целесообразности и эффективности применения патогенетической (иммунокорректирующей) терапии у больных ТБ.

Цель исследования: проанализировать связи иммунной дисрегуляции при ТБ легких с дисбалансом рецепторной экспрессии и секреции *in vitro* сигнальных молекул Th1-иммунного ответа DC и Т-лимфоцитами, охарактеризовать основные патогенетические факторы нарушений меж- и внутриклеточного сигналинга, лежащие в основе иммунной дисрегуляции при ТБ легких.

Материалы и методы

Выделенные из цельной крови мононуклеарные лейкоциты были получены у 334 пациентов Томской областной туберкулезной больницы – мужчин и женщин (средний возраст $41,94 \pm 10,63$ года) с впервые выявленным инфильтративным (177 человек) и диссеминированным (157 человек) ТБ легких. Из них у 213 пациентов был диагностирован ТБ легких с сохраненной лекарственной чувствительностью (ЛЧ) МБТ_у 121 – с лекарственной устойчивостью (ЛУ) МБТ как минимум к изониазиду и рифампицину. Диагноз устанавливали

по данным клинической картины, рентгенографии легких, результатам микроскопического и бактериологического исследований мокроты.

Группу сравнения составили 183 здоровых добровольца с сопоставимыми характеристиками по полу и возрасту.

Кровь у больных ТБ легких однократно до начала приема противотуберкулезных препаратов (ПТП) и здоровых доноров забирали утром натощак из локтевой вены в объеме 10–20 мл и стабилизировали гепарином (25 Ед/мл).

Исследования выполняли в лаборатории клинической и экспериментальной патофизиологии при кафедре патофизиологии и на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории (ЦНИЛ) ФГБОУ ВО «СибГМУ» Минздрава России.

Мононуклеарные лейкоциты и моноциты из цельной крови выделяли методом дифференциального градиентного центрифугирования, лимфоциты из взвеси мононуклеарных клеток – методом адгезии к пластику. Мононуклеарные лейкоциты инкубировали в течение 72 часов в газовой среде 5%-ного CO₂ при 37 °С. Th1-направленную индукцию выделенных из клеточной взвеси лимфоцитов крови с моделированием активации клеток через TCR проводили *in vitro* с использованием антител к молекулам CD3 (1 мкг/мл) и CD28 (4 мкг/мл) (Sigma, США). Для цитокин-зависимой активации клеток применяли рекомбинантные цитокины IL-12 (20 нг/мл) и IL-27 (10 нг/мл) (eBioscience Company, США). Время инкубации лимфоцитов с индукторами зависело от анализируемого параметра – от 40 мин до 48 часов. Трансформацию моноцитов крови в зрелые DC осуществляли *in vitro* в течение 7 суток с использованием индукторов – IL-4 и колониестимулирующего фактора гранулоцитов и макрофагов (GM-CSF) (Sigma, США) в концентрации 20 нг/мл с заменой питательной среды на 3-й день культивирования и ее повторной заменой с добавлением липополисахарида (Sigma, США) в концентрации 5 мг/мл на 5-й день инкубации.

Иммунофенотипирование DC (CD80⁺, CD86⁺, TLR2⁺, HLA-DR⁺) и Т-лимфоцитов (CD3⁺, CD4⁺, CD25⁺, CD28⁺, CD161⁺, CTLA4⁺,

IL-12R β 2⁺, gp130⁺, IL-2⁺, IL-17A⁺, Foxp3, T-bet⁺, GATA-3⁺), оценки *in vitro* секреции цитокинов (IL-2, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-22, IL-27, IFN- γ , TGF- β) клетками и содержания активных форм транскрипционных факторов внутриклеточной трансдукции сигнала (NF-kB, AP-1 и NFAT2) в Т-лимфоцитах при *in vitro* моделировании их антигенной (с BCG в дозе 50 мкг/мл), рецептор- и цитокин-зависимой (CD3/CD28- и IL-12/IL-27-индуцированной) активации проводили с применением методов проточной цитометрии и иммуноферментного анализа (ИФА). Для типирования клеток методом проточной лазерной трехцветной цитофлуориметрии на проточном цитофлуориметре FACS Calibur Flow cytometer BD (Becton Dickinson, США) использовали реагенты фирм-производителей BD Biosciences (США), R&D Systems Inc (США), Santa Cruz Biotechnology (США), для ИФА – eBioscience Company (США) и Cusabio Biotech, (США) с регистрацией оптической плотности проб на фотометре Multiscan EX (Thermo, Финляндия). Экспрессию мРНК транскрипционных факторов RORC2 и FoxP3 в лимфоцитах анализировали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Выделение тотальной РНК из мононуклеарных лейкоцитов осуществляли сорбентно-колоночным методом согласно инструкции производителя (RNeasy Plus Mini Kit, QIAGEN, Германия).

Для изучения факторов Notch-сигналинга в среду для инкубации (RPMI-1640 с L-глутамином (ООО «БиолоТ», Россия)) вносили антигены *M. tuberculosis* CFP10-ESAT6 (Диаскинтест, Generium, Россия) в дозе 10 мкг/мл или ингибитор γ -секретазы (DAPT, Tocris Bioscience, Великобритания) в дозе 5 или 10 мкМ/л в комбинации с антигенами CFP10-ESAT6. DAPT растворяли в 0,1%-ном растворе диметилсульфоксида (ДМСО) (Sigma-Aldrich, США). ДМСО и ингибитор γ -секретазы в указанных концентрациях не вызывали гибели клеток в условиях *in vitro*.

Статистическую обработку данных проводили в пакете прикладных программ IBM SPSS Statistics 25 (Statistical Package for the Social Sciences, США) и Microsoft Office 2013. Для проверки соответствия

выборочных данных нормальному распределению использовали тест Шапиро – Уилка. Если количественные параметры в группах исследования не подчинялись нормальному закону распределения, в качестве средневыборочных характеристик вычисляли медиану (Me) и 25-й и 75-й процентиля (1-й и 3-й квартили: Q_1 и Q_3). Уровень статистической значимости различий количественных показателей между исследуемыми выборками оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна – Уитни. Критерий Уилкоксона применяли для оценки значимости различий зависимых данных внутри групп. С целью обнаружения связи между исследуемыми показателями проводили корреляционный анализ путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r). Результаты статистического анализа считали значимыми при уровне $p < 0,05$.

Результаты

Факторы дисфункции ДК у больных ТБ легких

При исследовании рецепторного аппарата CD209-позитивных ДК было зарегистрировано снижение количества CD86⁺ и CD80⁺CD86⁺ ДК у всех обследованных больных ТБ легких вне зависимости от клинической формы заболевания и ЛЧ возбудителя по сравнению с соответствующими значениями у здоровых доноров (рис. 2.1).

Кроме того, было обнаружено снижение числа ДК, экспрессирующих TLR2: у больных инфильтративным ТБ легких и диссеминированным ТБ легких в 2,7 (до 1,4% (0,65–2,89)) и 1,5 (до 2,5% (1,15–4,41)) раза соответственно по сравнению со значениями в группе сравнения, у больных с ЛЧ и ЛУ ТБ – до 0,95% (0,60–2,15) и 2,70% (2,47–4,32). При этом количество HLA-DR-позитивных ДК оказалось выше нормы – в среднем в 1,2 раза как у больных инфильтративным и диссеминированным ТБ легких (95,70% (92,50–98,00) и 92,00% (91,90–96,00)), так и у больных с ЛЧ и ЛУ ТБ легких (95,00% (91,00–97,80) и 93,35% (87,50–99,00)).

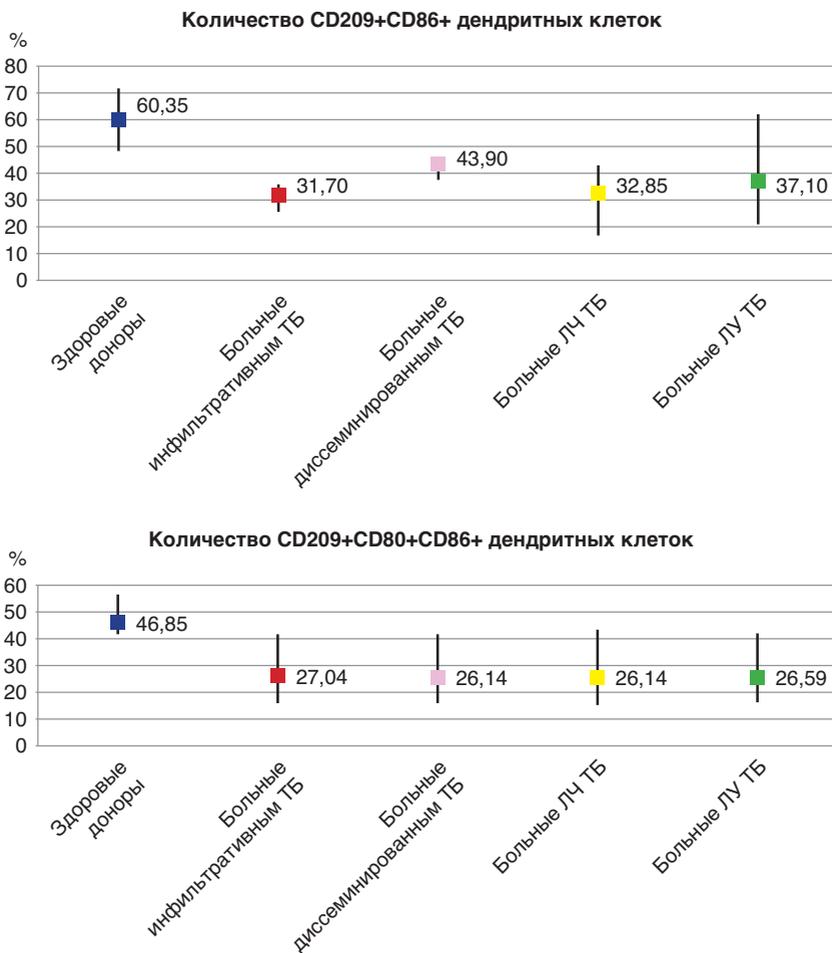


Рисунок 2.1. Экспрессия молекул костимуляции ДК у больных ТБ легких
 ТБ – туберкулез легких, ЛЧ ТБ – лекарственно-чувствительный ТБ легких, ЛУ ТБ – лекарственно-устойчивый ТБ легких

При анализе *in vitro* цитокинсекреторной активности зрелых ДК было выявлено снижение (в среднем в 1,3 раза) концентрации IL-12p70 в суспензионной культуре ДК пациентов с инфильтративным ТБ легких (до 12,50 (8,67–13,70) пг/мл) и, напротив, повышение концентрации данного цитокина при диссеминированном ТБ

легких (до 34,40 (25,85–44,90) пг/мл), ЛЧ ТБ легких и ЛУ ТБ легких (до 20,87 (19,52–39,78) пг/мл и 32,24 (18,12–41,65) пг/мл соответственно) относительно соответствующих значений у здоровых доноров (16,69 (14,67–20,87) пг/мл). Помимо этого, при ТБ легких *in vitro* отмечалось снижение секреции IL-27 (до 9,52–17,25 пг/мл) относительно нормальных значений (в среднем 82,00 (42,61–303,21) пг/мл).

Факторы дисфункции Т-лимфоцитов у больных ТБ легких

При ТБ легких *in vitro* установлено уменьшение абсолютного и относительного числа CD3/CD28-индуцированных CD3⁺ Т-лимфоцитов, а также общего количества лимфоцитов, экспрессирующих молекулу костимуляции CD28, по сравнению с группой здоровых доноров (рис. 2.2).

Также отмечалось увеличение относительного числа лимфоцитов, экспрессирующих цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген 4 (CD3⁺CTLA4⁺ и CD3⁻CTLA4⁺) в условиях дефицита CTLA4⁻ Т-клеток.

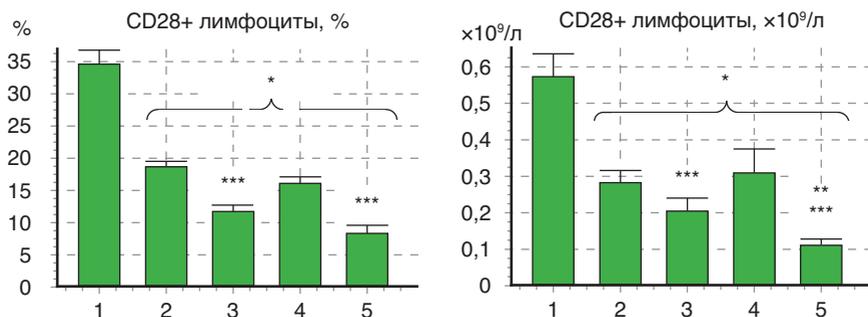


Рисунок 2.2. Содержание CD3/CD28-индуцированных *in vitro* CD28⁺ лимфоцитов при инфильтративном и диссеминированном ТБ легких 1 – здоровые доноры, 2 – больные ЛЧ инфильтративным ТБ легких, 3 – больные ЛУ инфильтративным ТБ легких, 4 – больные ЛЧ диссеминированным ТБ легких, 5 – больные ЛУ диссеминированным ТБ легких; * – достоверность различий относительно показателей здоровых добровольцев, ** – относительно показателей больных инфильтративным ТБ легких, *** – относительно показателей больных ЛЧ ТБ легких

Наиболее выраженными данными отклонения были при ЛУ ТБ легких с большей степенью их проявлений при диссеминированной форме болезни: до 20,45% (16,41–25,37) для CD3⁺CTLA4⁺ и 23,15% (21,22–27,04) для CD3⁺CTLA4⁺ при норме 5,45% (3,77–7,16) и 5,35% (3,24–9,45) соответственно.

Обнаруживался дисбаланс субпопуляций Т-клеток, содержащих белки транскрипции NF-κB (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), AP-1 (Activator Protein 1), NFAT1 и NFAT2 (Nuclear Factor of Activated T Cells 1 and 2) (рис. 2.3). Так, при ЛЧ ТБ легких

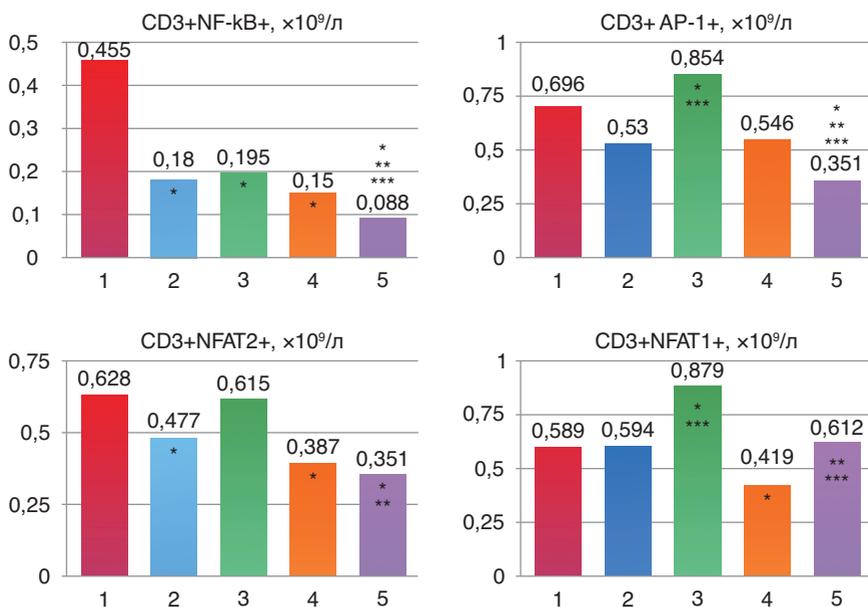


Рисунок 2.3. Количество Т-лимфоцитов, содержащих белки транскрипции NF-κB, AP-1, NFAT1 и NFAT2 (×10⁹/л) после CD3/CD28-индукции клеток *in vitro* при ТБ легких

1 – здоровые доноры, 2 – больные ЛЧ инфильтративным ТБ легких, 3 – больные ЛУ инфильтративным ТБ легких, 4 – больные ЛЧ диссеминированным ТБ легких, 5 – больные ЛУ диссеминированным ТБ легких; * – достоверность различий относительно показателей здоровых доноров, ** – относительно показателей больных инфильтративным ТБ легких, *** – относительно показателей больных ЛЧ ТБ легких

вне зависимости от клинической формы заболевания отмечалось снижение абсолютной численности NF-κB⁺ и NFAT2⁺ Т-лимфоцитов. При ЛУ инфильтративном ТБ легких увеличение числа CD3⁺AP-1⁺ и CD3⁺NFAT1⁺ лимфоцитов сочеталось со снижением количества CD3⁺NF-κB⁺ клеток. При диссеминированном ТБ легких с лекарственной резистентностью снижение числа NF-κB⁺ и NFAT2⁺ Т-лимфоцитов в совокупности с дефицитом CD3⁺AP-1⁺ клеток было наиболее выраженным (рис. 2.3).

Кроме того, *in vitro* была выявлена гипосекреция IL-2 лимфоцитами крови как в интактной культуре, так и при CD3/CD28-индукции клеток, наиболее выраженная при ЛУ ТБ легких (табл. 2.1).

Таблица 2.1. Показатели базальной и CD3/CD28-индуцированной секреции IL-2 лимфоцитами больных ТБ легких *in vitro*, Me (Q1–Q3)

Группы сравнения		Базальная секреция, пг/мл	CD3/ CD28-индуцированная секреция, пг/мл
Здоровые доноры		12,85 (11,30–15,58)	35,94 (32,45–44,21) ****
ИТБ	ЛЧ ТБ	8,73 (6,44–13,42) *	13,45 (10,63–18,09) *, ****
	ЛУ ТБ	6,26 (4,61–9,17) *, ***	8,83 (7,83–12,53) *, ***, ****
ДТБ	ЛЧ ТБ	7,62 (6,99–8,94) *, **	23,74 (20,62–27,88) *, **, ****
	ЛУ ТБ	3,56 (3,14–4,77) *, ***, ***	12,54 (11,59–16,69) *, **, ***, ****

* – достоверность различий относительно показателей здоровых доноров, ** – относительно показателей больных инфильтративным ТБ легких, *** – относительно показателей больных ЛЧ ТБ легких, **** – относительно показателей базальной секреции в интактной культуре клеток; ИТБ – инфильтративный ТБ легких, ДТБ – диссеминированный ТБ легких, ЛЧ ТБ – лекарственно-чувствительный ТБ легких, ЛУ ТБ – лекарственно-устойчивый ТБ легких

Указанные изменения определялись в комплексе с дефицитом CD3/CD28-индуцированных *in vitro* CD3⁺CD28⁺IL-2⁺ лимфоцитов: при инфильтративном ТБ легких отмечалось снижение до 15,11% (11,95–18,11) при ЛЧ ТБ и до 6,55% (4,12–8,98) при ЛУ ТБ легких, а при диссеминированном ТБ легких – до 10,63% (9,744–12,53) при ЛЧ ТБ и до 6,89% (5,84–7,98) при ЛУ ТБ по сравнению с 18,91% (15,20–23,38) в группе контроля. В дополнение обнаруживался дефицит IL-12/IL-27-индуцированных *in vitro* Т-лимфоцитов, секретирующих другой Th1-ассоциированный цитокин – IFN- γ , как при инфильтративном ЛЧ (снижение до 30,14% (24,35–35,11)) и ЛУ ТБ легких (снижение до 24,21% (30,95–29,88)), так и при диссеминированном ТБ легких (до 28,96% (24,65–33,94) при ЛЧ и до 23,19% (16,76–26,30) при ЛУ ТБ легких) по сравнению с показателями (34,04% (31,90–39,31)) здоровых добровольцев.

На дисфункцию Т-лимфоцитов указывало также снижение (по сравнению с нормой) числа Т-лимфоцитов, экспрессирующих цитокиновые рецепторы IL-12R β 2 к IL-12p70 (при инфильтративном ТБ легких до 18,36% (14,73–21,98) и при диссеминированном ТБ легких до 19,13% (16,36–21,38) при норме 35,75% (32,68–39,28)) и рецепторы gp130 к IFN- γ (до 18,06% (12,60–21,37) при инфильтративном ТБ легких и до 14,43% (9,70–18,86) при диссеминированном ТБ легких при норме 25,36% (23,42–31,34)) после *in vitro* специфической IL-12/IL-27-индукции клеток больных ТБ легких. Снижение числа Т-лимфоцитов наблюдалось как при инфильтративном, так и при диссеминированном ТБ и вне зависимости от ЛЧ *M. tuberculosis*.

Факторы Т-клеточной супрессии у больных ТБ легких

В ходе проведенного исследования установлено увеличение числа регуляторных Т-клеток с иммунофенотипами CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, CD3⁺CD4⁺CD25⁺ и CD3⁺CD4⁺CD25^{hi} в крови при инфильтративном и диссеминированном ТБ легких (табл. 2.2).

Таблица 2.2. Субпопуляционный состав регуляторных Т-клеток периферической крови (%) и *in vitro* секреция цитокинов с иммуносупрессорной активностью (IL-10 и TGF- β) при ТБ легких, Me (Q₁–Q₃)

Группы сравнения	Регуляторные Т-клетки периферической крови, %				
	CD4+CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	CD4+CD25 ⁻ Foxp3 ⁺	CD4+CD25 ⁺ Foxp3 ⁻	CD3+CD4 ⁻ CD25 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ^{hi}
Здоровые доноры	2,63 (2,00–3,29)	5,12 (4,76–9,75)	25,45 (22,30–27,60)	0,19 (0,13–0,26)	0,56 (0,33–0,72)
Больные ИТБ	4,48 (3,10–6,00) *	6,95 (5,50–11,20)	17,52 (9,40–22,60) *	0,37 (0,28–0,45) *	0,72 (0,62–1,06) *
Больные ДТБ	5,35 (3,75–7,14) *	6,30 (5,50–8,00)	13,50 (8,40–17,20) *, **	0,45 (0,25–0,67) *	1,18 (0,94–1,40) *, **
Группы сравнения	IL-10, пг/мл		TGF- β , пг/мл		
	Без индукции (базальная)	При индукции BCG	Без индукции (базальная)	При индукции BCG	
Здоровые доноры	25,29 (13,50–33,56)	26,21 (22,74–60,22)	1108,75 (929,80–1487,20)	1087,80 (500,00–1412,60)	
Больные ИТБ	52,29 (27,73–61,06) *	59,27 (42,63–65,18) *	812,83 (471,52–1079,10) *	955,30 (317,46–1147,26)	
Больные ДТБ	19,20 (11,43–32,17) *, **	26,63 (21,57–44,23) **	1227,72 (751,30–1676,20) *	712,70 (642,50–789,56) *, ***	

* – достоверность различий относительно показателей здоровых доноров, ** – относительно показателей больных ИТБ, *** – относительно показателей базальной секреции в интактной культуре клеток; ИТБ – инфильтративный ТБ легких, ДТБ – диссеминированный ТБ легких, IL-10 – интерлейкин-10, TGF- β – фактор роста опухоли бета

Корреляционный анализ выявил наличие отрицательной линейной зависимости между количеством CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ клеток и пролиферативным ответом лимфоцитов *in vitro* ($r = -0,68$ и $r = -0,13$; $p < 0,05$). Помимо этого, было зарегистрировано повышение *in vitro* секреции иммуносупрессорных цитокинов – IL-10 (базальной и индуцированной) при инфильтративном ТБ легких и TGF- β (базальной) – при диссеминированном ТБ легких.

Помимо указанных выше изменений у больных инфильтративным ТБ легких было зафиксировано повышение количества CD4⁺CD161⁺IL17A⁺ лимфоцитов (Т-лимфоцитов-хелперов типа 17) до 3,60% (2,39–5,57) при 1,34% (1,09–2,80) у здоровых доноров. Максимально высоким оно оказалось при ЛУ-варианте инфильтративного ТБ легких (при диссеминированном ТБ легких сохранялось в пределах референсных значений). При этом была выявлена отрицательная взаимосвязь между количеством Th17-клеток и показателем *in vitro* секреции TGF- β ($r = -0,55$; $p < 0,05$) и, напротив, положительная ($r = 0,56$ и $r = 0,50$; $p < 0,05$) между содержанием Th17-лимфоцитов и секрецией Th17-цитокинов: IL-17A – 26,72 (22,79–32,33) пг/мл и IL-22–55,36 (33,87–71,00) пг/мл. Сопоставимыми были изменения экспрессии мРНК генов транскрипционных факторов, поляризирующих дифференцировку Th17-лимфоцитов при ЛУ ТБ легких: при инфильтративном ТБ – повышение экспрессии мРНК гена фактора транскрипции RORC2 (фактора дифференцировки Th17), при диссеминированном ТБ легких – увеличение экспрессии мРНК гена фактора транскрипции Foxp3 (фактора дифференцировки Treg).

Факторы Notch-сигналинга у больных ТБ легких

Относительное количество и соотношение Th1- и Th2-лимфоцитов в суспензионных культурах мононуклеарных клеток (% от общего числа лимфоцитов) больных инфильтративным ТБ легких

У больных инфильтративным ЛЧ и ЛУ ТБ легких число Th1- и Th2-лимфоцитов в интактных культурах превышало аналогичные показатели в группе контроля (табл. 2.3).

Таблица 2.3. Содержание Th1- и Th2-лимфоцитов в суспензионных культурах мононуклеарных клеток (% от общего числа лимфоцитов) больных инфильтративным ТБ легких и здоровых доноров, Me (Q₁–Q₃)

Условия культивирования <i>in vitro</i>	Здоровые доноры	Больные туберкулезом легких	
		лекарственно-чувствительным	лекарственно-устойчивым
Th1-лимфоциты (CD4 ⁺ T-bet ⁺)			
Интактная культура	1,25 (1,12–1,37)	2,38 (2,33–2,41)*	2,36 (2,27–2,43)*
С добавлением АГ	1,30 (1,18–1,42)**	2,40 (2,38–2,47)*	2,50 (2,49–2,5) *, **, ****
С добавлением АГ и DAPT (5 мкМ/л)	1,37 (1,21–1,44)	2,40 (3,38–2,46)*	2,46 (2,44–2,47)*
С добавлением АГ и DAPT (10 мкМ/л)	1,95 (1,7–2,04)***	2,48 (2,43–2,49)*	2,74 (2,71–2,78) *, ***, ****
Th2-лимфоциты (CD4 ⁺ GATA-3 ⁺)			
Интактная культура	1,04 (0,99–1,01)	2,48 (2,39–2,49)*	2,57 (2,54–2,57)*
С добавлением АГ	1,12 (1,08–1,14)**	2,49 (2,41–2,51)*	2,63 (2,61–2,64) *, **, ****
С добавлением АГ и DAPT (5 мкМ/л)	0,91 (0,82–0,98) ***	2,47 (2,38–2,5)*	2,58 (2,54–2,59) *, **
С добавлением АГ и DAPT (10 мкМ/л)	0,68 (0,63–0,72) ***	1,94 (1,92–2,01) *, **	2,19 (2,17–2,21) *, ***, ****

Условия культивирования <i>in vitro</i>	Здоровые доноры	Больные туберкулезом легких	
		лекарственно-чувствительным	лекарственно-устойчивым
Индекс Th1/Th2			
Исходный	1,20 (1,13–1,25)	0,96 (0,96–0,97)	0,92 (0,89–0,95)
С добавлением АГ	1,16 (1,09–1,24)	0,96 (0,98–0,99)	0,95 (0,94–0,95)
С добавлением АГ и DAPT (10 мкМ/л)	2,88 (2,68–2,82) **, ***	1,28 (1,24–1,27) *, **, ***	1,25 (1,25–1,26) *, **, ***

* – достоверность различий относительно показателей здоровых доноров, ** – относительно показателей в интактной культуре клеток, *** – относительно показателей при стимуляции антигенами (АГ); АГ – CFP10-ESAT6, **** – относительно показателей больных ЛЧ ТБ легких; DAPT – N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester – N-[N-(3,5-дифторфенацетил)-L-аланил]-S-фенилглицин трет-бутиловый эфир

Стимуляция культур мононуклеарных клеток антигенами CFP10-ESAT6 приводила к росту числа Th1- и Th2-лимфоцитов больных инфильтративным ТБ легких с устойчивостью возбудителя к противотуберкулезным средствам и у здоровых доноров (табл. 2.3). Добавление в инкубационную среду ингибитора γ -секретазы (DAPT) в концентрации 5 мкМ/л не сопровождалось статистически значимыми изменениями исследуемых показателей. Повышение концентрации DAPT до 10 мкМ/л индуцировало увеличение количества CD4⁺T-bet⁺ лимфоцитов и снижение числа CD4⁺GATA-3⁺ клеток при ЛУ инфильтративном ТБ легких и у здоровых лиц. При ЛЧ инфильтративном ТБ легких регистрировалось только уменьшение доли Th2-лимфоцитов (табл. 2.3).

Сравнительный анализ полученных результатов между группами пациентов с разной чувствительностью возбудителя к противотуберкулезным средствам показал, что число Th1- и Th2-лимфоцитов при добавлении в среду инкубации антигенов CFP10-ESAT6 или антигенов в совокупности с DAPT в концентрации 10 мкМ/л при ЛУ инфильтративном ТБ превышало таковое при ЛЧ инфильтративном ТБ легких (табл. 2.3).

Подсчет соотношения Th1/Th2-популяций лимфоцитов продемонстрировал статистически значимые различия только в условиях *in vitro* инкубации клеток с антигенами CFP10-ESAT6 и DAPT в концентрации 10 мкМ/л. Во всех группах сравнения подавление сигнального пути Notch приводило к росту соотношения Th1/Th2 относительно аналогичных показателей при антигенной стимуляции (табл. 2.3). Между группами больных инфильтративным ТБ легких с разной чувствительностью возбудителя показатель соотношения Th1/Th2 достоверно не различался и был в среднем в 2,3 раза ниже, чем у здоровых доноров (табл. 2.3).

Относительное количество и соотношение Th1- и Th2-лимфоцитов в суспензионных культурах мононуклеарных клеток (% от общего числа лимфоцитов) больных диссеминированным ТБ легких

Острый период ЛЧ и ЛУ диссеминированного ТБ легких сопровождался повышением числа лимфоцитов, экспрессирующих молекулы CD4⁺T-bet⁺ (Th1) в 2,0 и 1,8 раза соответственно (табл. 4).

Содержание CD4⁺GATA-3⁺ (Th2) клеток в интактных культурах у больных диссеминированным ТБ легких в среднем в 2,5 раза превышало аналогичные показатели здоровых лиц и не было взаимосвязанным с лекарственной чувствительностью *M. tuberculosis* (табл. 2.4). Стимуляция культур мононуклеарных клеток антигенами CFP10-ESAT6 приводила к увеличению количества Th1- и Th2-лимфоцитов как у здоровых доноров, так и у пациентов с диссеминированным ТБ легких вне зависимости от ЛЧ возбудителя (табл. 2.4).

При добавлении в инкубационную среду ингибитора γ -секретазы (DAPT) в концентрации 5 мкМ/л в совокупности с антигенами CFP10-ESAT6 в группах больных диссеминированным ТБ легких не было выявлено статистически значимых различий с показателями, полученными при антигенной стимуляции. У здоровых доноров в указанных условиях культивирования отмечалось снижение числа клеток, экспрессирующих CD4⁺GATA-3⁺, и увеличение количества CD4⁺T-bet⁺ лимфоцитов (табл. 2.4).

Таблица 2.4. Содержание Th1- и Th2-лимфоцитов в суспензионных культурах мононуклеарных клеток (% от общего числа лимфоцитов) больных диссеминированным ТБ легких и здоровых доноров, Ме (Q1–Q3)

Условия культивирования <i>in vitro</i>	Здоровые доноры	Больные туберкулезом легких	
		лекарственно-чувствительным	лекарственно-устойчивым
Th1-лимфоциты (CD4 ⁺ T-bet ⁺)			
Интактная культура	1,25 (1,12–1,37)	2,51 (2,48–2,59)*	2,19 (2,17–2,22) *, ****
С добавлением АГ	1,30 (1,18–1,42)**	2,54 (2,51–2,66)*, **	2,34 (2,31–2,34) *, **, ****
С добавлением АГ и DAPT (5 мкМ/л)	1,37 (1,21–1,44) **, ***	2,56 (2,52–2,64) *	2,30 (2,27–2,31) *, **, ****
С добавлением АГ и DAPT (10 мкМ/л)	1,95 (1,70–2,04) **, ***	2,68 (2,63–2,73) *, **, ***	2,34 (2,29–2,37) *, ****
Th2-лимфоциты (CD4 ⁺ GATA-3 ⁺)			
Интактная культура	1,04 (0,99–1,01)	2,57 (2,49–2,63)*	2,67 (2,65–2,69) *
С добавлением АГ	1,12 (1,08–1,14)**	2,73 (2,64–2,73) *, **	2,70 (2,68–2,71) *, **
С добавлением АГ и DAPT (5 мкМ/л)	0,91 (0,82–0,98) ***	2,65 (2,61–2,65)*	2,68 (2,62–2,69)*
С добавлением АГ и DAPT (10 мкМ/л)	0,68 (0,63–0,72) **, ***	2,19 (2,18–2,21) *, **, ***	2,18 (2,13–2,19) *, **, ***
Индекс Th1/Th2			
Интактная культура	1,20 (1,13–1,25)	0,96 (0,94–0,97)	0,93 (0,88–0,95)
С добавлением АГ	1,16 (1,09–1,24)	0,96 (0,95–0,99)	0,95 (0,94–0,95)
С добавлением АГ и DAPT (10 мкМ/л)	2,88 (2,68–2,82) **, ***	1,27 (1,21–1,28) *, **, ***	1,25 (1,24–1,25) *, **, ***

* – достоверность различий относительно показателей здоровых доноров, ** – относительно показателей в интактной культуре клеток, *** – относительно показателей при стимуляции антигенами (АГ), АГ – CFP10-ESAT6, **** – относительно показателей больных ЛЧ ТБ легких; DAPT – N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester – N-[N-(3,5-дифторфенацетил)-L-аланил]-S-фенилглицин трет-бутиловый эфир

Увеличение концентрации ингибитора γ -секретазы (DAPT) до 10 мкМ/л сопровождалось уменьшением доли Th2-лимфоцитов во всех группах. Результаты оценки содержания Th1-клеток были неоднозначными. В группах здоровых доноров и больных диссеминированным ТБ легких с сохраненной чувствительностью возбудителя к противотуберкулезным препаратам основного ряда отмечалось увеличение числа CD4⁺T-bet⁺ лимфоцитов (табл. 2.4).

У пациентов с устойчивостью *M. tuberculosis* уровень Th1-клеток был сопоставимым с аналогичными показателями при стимуляции антигенами CFP10-ESAT6 без добавления DAPT (табл. 2.4).

Сравнение результатов популяционного состава лимфоцитов между группами больных диссеминированным ТБ легких показало, что у пациентов с устойчивостью *M. tuberculosis* к противотуберкулезным средствам при всех условиях культивирования содержание CD4⁺T-bet⁺ клеток было ниже, чем у больных, инфицированных лекарственно-чувствительными штаммами возбудителя (табл. 2.4).

Для оценки корректирующего воздействия ингибитора γ -секретазы на баланс основных популяций лимфоцитов было рассчитано соотношение Th1/Th2. Статистически значимые изменения показателя были установлены только для данных, полученных в условиях инкубации мононуклеарных лейкоцитов с добавлением антигенов CFP10-ESAT6 и DAPT (10 мкМ/л) – во всех группах обследуемых регистрировалось увеличение соотношения Th1/Th2 относительно такового в интактных культурах и при стимуляции антигенами CFP10-ESAT6 (табл. 2.4).

Обсуждение

Общеизвестно, что ДК – высокоспециализированные APC. Основными их функциями в патогенезе противотуберкулезного иммунитета являются: связывание *M. tuberculosis* посредством паттерн-распознающих рецепторов (PAMP), разновидностью которых являются

Toll-подобные рецепторы типа 2 (TLR2), процессинг *M. tuberculosis* и презентация ее антигенных пептидов в соединении с молекулами HLA Т-лимфоциту, активация антигенраспознающего Т-лимфоцита посредством молекул костимуляции и секреции цитокинов. Дисфункция макрофагов и ДК – фактор нарушений индуктивной фазы противотуберкулезного иммунного ответа и дальнейших этапов его развития [6, 13]. Согласно полученным нами данным, наличие дисфункции ДК у больных ТБ легких подтверждалось снижением числа клеток, экспрессирующих молекулы TLR2 для связывания с антигеном (*M. tuberculosis*), молекулы костимуляции семейства B7 (CD80⁺CD86⁺ клеток), и гипосекрецией IL-27, которая, как было установлено ранее [47], ассоциировалась с носительством генотипов и аллелей полиморфных вариантов гена *IL27* rs17855750 (2905T/G) и rs181206 (4730T/C). Рецепция IL-27 – пусковой фактор внутриклеточных реакций (рис. 2.4), стимулирующих экспрессию на мембране Т-лимфоцита β 2-субъединицы рецептора для другого секретируемого APC цитокина – IL-12p70, опосредующего секрецию активированными Т-лимфоцитами IFN- γ . IL-12 и IFN- γ – главные цитокины Th1-иммунного ответа, в условиях недостаточности синтеза, секреции и рецепции которых нарушаются пролиферация и дифференцировка Т-лимфоцитов, процессы их кооперации с вовлечением в реакции противотуберкулезной защиты других эффекторных клеток (макрофагов, натуральных киллеров, NKT (Natural Killer T-cells) и др.) (рис. 2.4).

STAT – Signal Transducer and Activator of Transcription – трансдуктор сигнала и активатор транскрипции, JAK – Janus Kinases – тирозиновые киназы семейства Янус, TYK – Tyrosine Kinase – тирозинкиназа семейства Янус, IL – Interleukin – интерлейкин, IFN – Interferon – интерферон, EBV3 – Epstein-Barr virus induced gene 3 – субъединица интерлейкина 27 (отвечает за связь лиганда с рецептором), p28 – субъединица интерлейкина 27 (проводит активационный импульс внутрь клетки), WSX-1 – Т-клеточный цитокиновый рецептор к интерлейкину 27 (альфа-субъединица), gp130 – Glycoprotein

130 – трансмембранный гликопротеин с молекулярной массой 130 кДа (конститутивная субъединица рецептора к интерлейкину 27), T-bet – T-box expressed in T cells – транскрипционный фактор семейства T-box в Т-клетках, IL-12R β_1 и IL-12R β_2 – субъединицы рецептора к интерлейкину 12

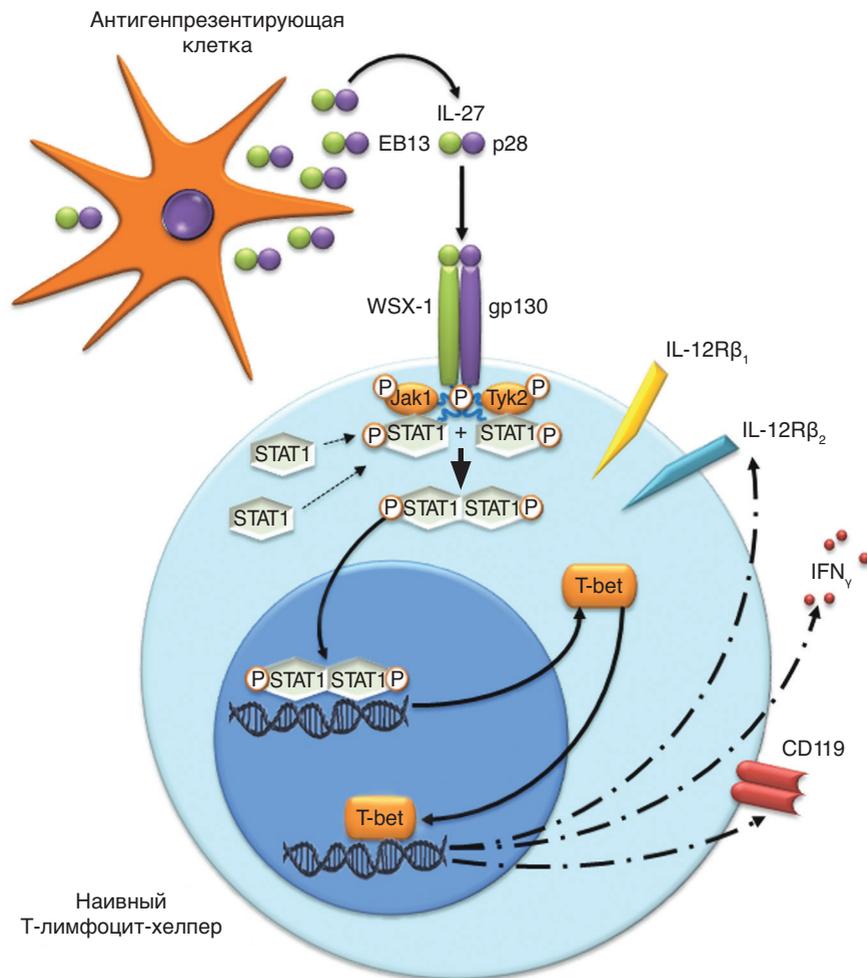


Рисунок 2.4. IL-27-зависимая активация JAK-STAT-сигналинга в лимфоцитах (оригинальная схема)

На дисфункцию Т-клеточного звена иммунитета у больных ТБ легких указывало снижение числа лимфоцитов, экспрессирующих CD3 (молекулы, образующие комплекс с Т-клеточным рецептором для распознавания антигена), а также Т-клеток, экспрессирующих молекулы костимуляции CD28 (CD3⁺CD28⁺ лимфоцитов), и Т-клеток с внутриклеточным содержанием цитокинов – основного Т-клеточного фактора роста IL-2 (CD3⁺IL-2⁺ лимфоцитов) и IFN- γ (CD3⁺IFN- γ ⁺ лимфоцитов). Снижение числа CD3⁺IL-2⁺ и CD3⁺IFN- γ ⁺ лимфоцитов в сочетании с гипосекрецией IL-2 *in vitro* – признак нарушений рецептор-зависимой и цитокин-зависимой активации Т-лимфоцитов (Th1) при взаимодействии с APC. О нарушении цитокин-зависимого взаимодействия Т-лимфоцитов с APC также свидетельствует выявленное у больных ТБ легких снижение числа IL-12/IL-27-индуцированных *in vitro* Т-клеток, экспрессирующих рецепторы к секретлируемым APC цитокинам – IL-27 (CD3⁺gp130⁺) и IL-12 (CD3⁺IL-12R β 2⁺).

Закономерным также является вопрос о связи нарушений Т-клеточного звена иммунитета при ТБ легких с механизмами клеточно-индуцированной иммунной супрессии, важная роль в которых отводится Treg с иммуносупрессорной активностью.

В настоящее время описан целый ряд Т-регуляторных клеток с иммуносупрессорной активностью – естественных (тимических) и адаптивных (индуцированных на периферии) с различными иммунофенотипами и спектром гуморальных продуктов, основными из которых являются IL-10 и TGF- β . Главная их функция – контроль силы и продолжительности иммунного ответа через регуляцию функций субпопуляций ключевых регуляторных клеток – Т-лимфоцитов-хелперов (Th1, Th2) и цитотоксических Т-лимфоцитов. Однако наибольшее внимание в патогенезе инфекционных заболеваний уделяется изучению иммуносупрессорных свойств различных субпопуляций индуцированных Treg-лимфоцитов, маркерами которых являются высокий уровень экспрессии молекул CD25 (α -цепи рецептора к IL-2) и экспрессия внутриклеточного фактора Foxp3 [8, 14]. Важную роль в поддержании иммунного баланса между острым воспалительным

процессом и иммунной супрессией, а также в контроле размножения микобактерий выполняют моноциты и макрофаги (M2-клетки) с толерогенной и иммунорегуляторной функциями [12, 16].

Прикладное значение имеет анализ связи иммуносупрессии с отрицательными результатами внутрикожных тестов *in vivo* для иммунодиагностики туберкулезной инфекции (латентной и активной), в связи с чем активно обсуждается вопрос о недостаточной информативности их применения и замены на тесты *in vitro*.

В ранее проведенном исследовании из 140 обследованных больных ТБ легких туберкулиновая анергия обнаруживалась в 32,86% случаев (у 46 пациентов). Была выявлена ее связь с множественной лекарственной устойчивостью *M. tuberculosis*, увеличением количества CD3⁺CD4⁺CD25^{high}, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ и CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg-лимфоцитов в крови и гиперсекрецией ингибиторных Treg-цитокинов IL-10, TGF- β *in vitro*. Были установлены корреляции между количеством Treg и показателями пролиферации (отрицательные) и апоптоза (положительные) лимфоцитов и найдены ассоциации между гиперсекрецией ингибиторных цитокинов и носительством полиморфных вариантов C-592A гена *IL10* (аллель A и генотипы CA, AA) и C-509T гена *TGFB* (аллель T и генотипы CT, TT) [5], что могло указывать на генетически детерминированный характер иммуносупрессии у больных ТБ легких.

Показано, что Treg реализуют свое иммуносупрессорное действие не только посредством цитокинов IL-10 и TGF- β , но и контактным способом – через экспрессию ингибиторной молекулы CTLA4 (цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген 4), инактивирующую молекулы костимуляции на Т-клетках и APC [8]. При этом блокируются не только внеклеточный этап активации Т-клетки (посредством костимуляции), но и внутриклеточный – проведение сигнала активации от поверхности к ядру – к генам синтеза IL-2 и его рецептора – при участии транскрипционных факторов NF- κ B, AP-1 и NFAT2, на что указывают результаты моделирования *in vitro* CD3/CD28-зависимой активации Т-лимфоцитов у больных ТБ легких – снижение численности

NF- κ B⁺, AP-1⁺ и NFAT2⁺ и CD28⁺IL2⁺ (активированных) Т-клеток при повышении количества клеток с фенотипом CD3⁺CTLA4⁺.

Наряду с вышеуказанными изменениями обращала на себя внимание связь увеличения количества CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg-лимфоцитов в крови с эозинофильным лейкоцитозом до лечения (до $(0,97 \pm 0,11) \times 10^9/\text{л}$) [8]. Эозинофилия регистрировалась у 18% больных ТБ легких, была более выраженной при диссеминированном, а не при инфильтративном ТБ и сочеталась с деструктивными изменениями и замедлением темпов рассасывания инфильтратов в легких при обеих формах ТБ. Кроме того, именно при диссеминированной форме ТБ легких с эозинофилией регистрировалось сочетанное увеличение *in vitro* секреции цитокинов, поляризирующих дифференцировку «наивных» Т-хелперов (Th0) в Treg, – TGF- β мононуклеарными лейкоцитами и IL-2 эозинофилами крови. Ввиду того что IL-2 – медиатор, в комбинации с TGF- β активирующий конверсию и функции Treg, гиперсекрецию IL-2 эозинофильными гранулоцитами в сочетании с эозинофильной реакцией крови можно расценивать как фактор, потенцирующий механизмы Treg-опосредованной иммуносупрессии при диссеминированном ТБ легких.

В последние годы все больше внимания исследователи уделяют еще одной субпопуляции регуляторных CD4⁺ Т-лимфоцитов-хелперов – Th17-лимфоцитам. Th17-лимфоциты играют роль в патогенезе аутоиммунных заболеваний, защите макроорганизма от внеклеточных бактерий и грибков. Кроме того, обсуждается их роль в развитии протективного иммунного ответа против внутриклеточных патогенов, в частности *M. tuberculosis* [1, 34]. Однако существует мнение о том, что при внутриклеточных инфекциях Th17-ответ носит скорее патологический, нежели протективный характер, что и послужило основанием для поиска ответа на вопрос: «Какова роль Th17-лимфоцитов в патогенезе ТБ легких, это фактор протекции или деструкции?» [1, 34].

Известно, что Th17-лимфоциты вырабатывают уникальный спектр провоспалительных цитокинов – IL-17 и IL-22 – и дифференцируются,

равно как и иммуносупрессорные Treg, из «наивных» Т-лимфоцитов-хелперов (Th0). Дифференцировка Th17 зависит от экспрессии транскрипционных факторов STAT3, RORC2 и концентрации IL-6, TGF- β [34]. При этом у человека TGF- β в низкой концентрации способствует дифференцировке Th17-лимфоцитов, а в высокой (ввиду индукции экспрессии транскрипционного фактора Foxp3) – созреванию Treg.

Почему Th17-лимфоцитам следует уделять внимание при ТБ? Основанием к этому являются следующие факторы:

- Th17 и IL-17 – факторы активации нейтрофилов, воспаления и связанной с ним альтерации;
- IL-17 стимулирует продукцию Th1-цитокинов (в частности, IL-12);
- IL-17 активирует созревание ДК;
- Th17 обладают свойством пластичности ввиду их способности экспрессировать цитокины других клеточных субпопуляций, в частности IFN- γ (IL-17A⁺IFN- γ ⁺ Th17/Th1-клетки);
- BCG-вакцинация вызывает активацию Th17.

Возможно, при ТБ Th17-лимфоциты компенсируют сопровождающий его течение Th1-дефицит, тем более что, согласно полученным нами данным, показатели Th1-ответа не коррелируют с гиперпродукцией IFN- γ (маркер туберкулезной инфекции в QFT-GIT тесте *in vitro*).

Мы обнаружили, что течение ТБ легких сопровождается повышением секреции *in vitro* Th17-цитокинов с наибольшей выраженностью при ЛУ диссеминированном ТБ легких, в то время как количество Th17-лимфоцитов при данной форме заболевания сохраняется в пределах нормы. При других клинико-патогенетических вариантах болезни оно, напротив, было выше, чем у здоровых доноров, с максимальным его повышением при инфильтративном ЛУ ТБ легких. Обращало на себя внимание разнонаправленное изменение секреции мононуклеарными лейкоцитами Th17-праймирующего

цитокина – TGF- β : понижение при ЛУ инфильтративном ТБ легких и повышение – при диссеминированном ЛУ ТБ легких.

На основании вышесказанного можно заключить, что при ТБ легких увеличение числа и цитокин-секреторной активности Th17-лимфоцитов следует рассматривать как фактор компенсации нарушений механизмов Th1-иммунного ответа. При диссеминированном ЛУ ТБ легких гиперсекреция IL-17 может обуславливать активацию нейтрофилов (важный фактор в период бактериемии) и компенсировать гиперсекрецию цитокинов, осуществляющих негативную регуляцию Th1-иммунного ответа (TGF- β) и поддержание Th2-зависимых реакций [34].

Полученные результаты создают основу для разработки патогенетически обоснованных подходов к иммунокоррекции с применением клеточных технологий и лекарственных средств, направленных на активацию факторов врожденного и адаптивного иммунитета.

В настоящее время в дисрегуляции реакций врожденного и адаптивного иммунитета большое значение уделяется сигнальному пути Notch [20, 28, 45]. Он является одним из ключевых в обеспечении межклеточной сигнализации и определении судьбы клеток (пролиферация, дифференцировка, апоптоз) в процессе эмбриогенеза и во взрослом организме [19, 22, 45]. Доказано, что семейство рецепторов Notch и ассоциированный с ними сигнальный путь участвуют в активации макрофагов [36], ДК [45], эффекторных функций периферических Т-лимфоцитов, дифференцировке Th1 (CD4⁺/CD8⁺), Th2, Th17 и Treg-клеток [18, 22, 35, 37]. Динамичный баланс указанных субпопуляций лимфоцитов и координированное взаимодействие с APC обеспечивают эрадикацию вне- и внутриклеточных патогенов, предотвращая распространение инфекции в организме.

В современной литературе накапливаются данные о значении Notch-сигнального пути в формировании иммунного ответа против *M. tuberculosis*. Известно, что микобактериальная инфекция сопровождается повышением количества моноцитов/макрофагов и ДК, экспрессирующих лиганд Notch-рецептора – Dll 4 (Delta-like 4)

[30, 44], а активация перитонеальных макрофагов мышей BCG приводит к увеличению экспрессии Notch-рецепторов и лигандов – Jagged 1, Dll 1 и Dll 4 [41, 45]. Блокада лиганда Dll 4 сопровождается уменьшением продукции IL-17 Т-клетками и образованием более крупных легочных гранулем в модели, индуцированной антигенами *M. tuberculosis* [30].

Центральную роль в регуляции передачи сигналов Notch играет протеолитический белок – γ -секретаза, высвобождающий из клеточной мембраны внутриклеточный домен Notch-рецептора (Notch Intracellular Domain, Notch-ICD – NICD) для последующей транслокации в ядро с целью модуляции экспрессии определенных генов-мишеней (Hes, Hey, MYC, p21, HRT, рецепторы Notch, лиганды Notch, циклин D1 и др.) [19, 20, 24, 46].

Результаты научно-исследовательских работ в области иммунопатогенеза ТБ убедительно демонстрируют наличие иммунной девиации у больных ТБ легких, характеризующейся поляризацией иммунного ответа в направлении Th2-зависимых путей дифференцировки Т-лимфоцитов [15, 31, 48]. Однако молекулярные механизмы формирования популяционного превосходства клеток, обуславливающих преобладание клеточно-опосредованных или гуморальных иммунных реакций при ТБ, вызванном *M. tuberculosis* с различной чувствительностью к противотуберкулезным средствам основного ряда, до конца не установлены. Определяющее значение сигнального Notch-пути в процессах созревания и дифференцировки различных клеток макроорганизма позволяет рассматривать нарушения его функционирования как потенциальный молекулярный механизм поляризации иммунного ответа при ТБ легких.

Условием формирования адаптивного иммунного ответа на действие антигенов различной этиологии является динамичный баланс и кооперация различных пулов иммунокомпетентных клеток, основанные на юкстакринных и паракринных механизмах взаимодействия [38]. Ключевое значение популяции антиген-специфических CD4⁺ Т-лимфоцитов в развитии протективных реакций при ТБ

определяется их регулируемыми физиологическими функциями: повышением фагоцитарной активности макрофагов [42], стимуляцией хемокин-опосредованной миграции и цитолитической активности CD8⁺ Т-клеток, секреции ими цитокинов (IFN- γ , TNF- α) и гранзимов, обеспечивающих апоптоз инфицированных клеток [38]. Антитело-зависимые реакции иммунного ответа (активация системы комплемента, опсонизация, фагоцитоз, лизосомальная деградация) также могут быть потенциально эффективными против *M. tuberculosis* [17].

Маркерные транскрипционные факторы T-bet и GATA3, определяющие направление дифференцировки Th1- и Th2-лимфоцитов, локализованы в генах совместно, и селекция клеток осуществляется по принципу перекрестной регуляции. Эндогенный T-bet подавляет экспрессию GATA3 во время поляризации Th1-лимфоцитов. Напротив, транскрипционный белок GATA3 угнетает экспрессию STAT4, T-bet и продукцию IFN- γ , обеспечивая Th2-поляризацию дифференцировки [21, 27].

Повышение числа Th1- и Th2-лимфоцитов, установленное в интактных культурах больных с инфильтративным и диссеминированным ТБ легких, свидетельствует об активации клеточно-эффекторных и гуморальных реакций в ответ на инвазию *M. tuberculosis*. Вместе с тем увеличение доли Th2-клеток может рассматриваться в качестве одного из факторов, способствующих прогрессии патологического процесса. Известно, что повышение продукции основного Th2-цитокина – IL-4 ассоциировано с угнетением TNF- α -индуцированного апоптоза инфицированных клеток, снижением активности iNOS, повышением доступности железа для *M. tuberculosis*, а также активацией пролиферации антиген-специфических регуляторных Т-лимфоцитов, обуславливающих развитие иммуносупрессии [43].

Ведущее значение в развитии ТБ играют высоковирулентные ранние белки *M. tuberculosis* – ESAT6 и CFP10 [3]. Белок ESAT-6 способствует проникновению возбудителя в клетки и, дестабилизируя фагосомы, позволяет микобактериям избежать лизиса. Антиген

CFP-10 образует комплекс с ESAT-6 и обеспечивает его доставку к месту действия. Гибридный рекомбинантный специфический белок ESAT-6–CFP10 обладает высокой чувствительностью и предназначен для диагностики инфицирования *M. tuberculosis* [4]. Установленное у больных инфильтративным ЛУ и диссеминированным ТБ легких обеих подгрупп повышение числа Th1- и Th2-лимфоцитов при добавлении в культуры мононуклеаров белка ESAT-6–CFP10 является отражением физиологического ответа клеток на антигенную стимуляцию в условиях *in vitro* и может указывать на сохранение антигенпрезентирующей функции и эффективности реакций кооперативного межклеточного взаимодействия. Отсутствие изменений популяционного состава лимфоцитов при стимуляции культур антигенами, установленное у пациентов с инфильтративным ЛЧ ТБ легких, возможно, обусловлено гипоэкспрессией костимулирующих молекул (CD28), а также нарушением каскада реакций сигнальной трансдукции [2]. Зарегистрированное более выраженное увеличение числа Th1- и Th2-лимфоцитов у больных с инфильтративным ЛУ ТБ легких свидетельствует о сенсibilизации клеток к антигенам *M. tuberculosis* и указывает на гиперергическую их реактивность.

Ключевым молекулярным механизмом, регулирующим направление дифференцировки различных типов клеток, является высоко консервативный сигнальный путь Notch, реализуемый через взаимодействие трансмембранных лигандов семейств Jagged (Jagged 1 и 2) и Delta (Delta-like 1, 3 и 4) с рецепторами Notch (Notch1–4). Фермент γ -секретаза катализирует протеолитическое отщепление внутриклеточного домена рецептора Notch. Последующее перемещение NICD в ядро, образование комплекса с фактором транскрипции RBPJk/CSL и семейством кофакторов MAML1–3 активируют экспрессию целевых генов-мишеней, регулирующих дифференцировку клеток [9, 20, 40, 50]. Фундаментальный каскад Notch рассматривается как механизм усиления транскрипции генов-мишеней, направляющий поляризацию дифференцировки Т-лимфоцитов путем их сенсibilизации к цитокинам и другим регуляторным сигналам, что дает

возможность индукции образования клеток разных линий [20]. Подавление активности γ -секретазы с помощью ингибитора DAPT (– N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester) активно изучается с позиции установления роли нарушений функционирования сигнального пути Notch в патогенезе онкологических, нейродегенеративных и инфекционных заболеваний, а также разработки потенциальных лекарственных средств для их терапии [24, 29, 33, 39, 40].

В работах по изучению особенностей патогенеза ТБ легких установлена ассоциация прогрессирующего течения болезни с поляризацией иммунного ответа в направлении Th2-зависимых реакций [15, 23, 26, 49]. У больных ТБ легких с подтвержденным бактериовыделением регистрируется повышение основных Th2-цитокинов – IL-4 и IL-10 [26, 32]. IL-10, подавляя продукцию провоспалительных цитокинов (IFN- γ , IL-2) и антигенпрезентирующую функцию макрофагов, ограничивает пролиферацию антигенспецифического клона Th1-лимфоцитов и эрадикацию *M. tuberculosis* [25]. Зарегистрированное во всех исследуемых пробах уменьшение числа Th2-лимфоцитов и увеличение индекса соотношения Th1/Th2 в условиях подавления сигнального пути Notch с помощью ингибитора γ -секретазы (DAPT, 10 мкМ/л) может способствовать восстановлению динамического баланса клеточно-опосредованных и гуморальных реакций, а также ограничению интенсивности IL-4-зависимых деструктивных процессов. Увеличение количества Th1-лимфоцитов, установленное в культурах клеток больных с диссеминированным ЛЧ и инфильтративным ЛУ ТБ легких при действии DAPT (10 мкМ/л), может рассматриваться в качестве механизма усиления протективного контроля над распространением инфекции.

Зафиксированные у больных инфильтративным ЛУ ТБ легких при стимуляции мононуклеаров антигенами ESAT-6–CFP10 и сохраняющиеся в условиях инкубации клеток с DAPT (10 мкМ/л) более высокие (чем при ЛЧ варианте заболевания) показатели содержания Th1- и Th2-лимфоцитов указывают на нарушения механизмов реализации эффективного специфического иммунного ответа с развитием гиперергической реакции и риском иммуноопосредованного

повреждения тканей. Определяемое при всех условиях культивирования в культурах клеток больных с ЛУ диссеминированным ТБ легких более низкое (чем при ЛЧ-варианте заболевания) количество Th1-лимфоцитов свидетельствует в пользу дестабилизации реакций кооперативного межклеточного взаимодействия. Установленные особенности изменений популяционного состава Т-лимфоцитов в зависимости от клинико-патогенетического варианта заболевания могут быть связаны как с исходной, так и с индуцированной устойчивыми штаммами *M. tuberculosis* функциональной несостоятельностью клеток, обеспечивающих элиминацию возбудителя.

Заключение

При ТБ легких нарушения иммунного ответа формируются уже на начальном его этапе – в индуктивную фазу. Следствием является дефицит секреции Th1-ассоциированных цитокинов (IL-2, IFN- γ) и развитие Т-лимфоцитопении. В основе – дефицит молекул контактного взаимодействия на DC и Т-лимфоцитах, дефицит секреции и рецепции Th1-активирующих цитокинов, Treg-опосредованная супрессия, ассоциированная с туберкулиновой анергией у больных ТБ легких. Патогенетическими факторами Treg-опосредованной иммуносупрессии при ТБ легких является повышение секреции ингибиторных цитокинов (IL-10, TGF- β) и экспрессии маркерных молекул (Foxp3, CTLA4) с подавлением внеклеточного и внутриклеточного этапов рецептор-зависимой активации Т-лимфоцитов. При этом, что было показано нами ранее [5, 8], факторами, предрасполагающими к иммуносупрессии при ТБ легких, являются полиморфизм генов *IL10*, *TGF β* и эозинофилия крови.

Результаты изменений популяционного состава Th1- и Th2-лимфоцитов при добавлении к культурам мононуклеарных клеток ингибитора γ -секретазы DAPT (в концентрации 10 мкМ/л) свидетельствуют о значительной модулирующей роли сигнального пути Notch в определении направления дифференцировки клеток,

обеспечивающих развитие иммунного ответа при ТБ легких. Уменьшение доли Th2-лимфоцитов и увеличение коэффициента Th1/Th2, регистрируемое в культурах клеток больных ТБ легких вне зависимости от клинико-патогенетического варианта заболевания, указывают на возможность Notch-опосредованной коррекции числа Th2-лимфоцитов, сопровождающейся повышением эффективности клеточно-адаптивных реакций и уменьшением интенсивности деструктивных процессов. Полученные в условиях *in vitro* данные позволяют рассматривать сигнальный путь Notch в качестве возможной потенциальной таргетной мишени патогенетической терапии ТБ легких.

Литература

1. Кононова Т.Е., Уразова О.И., Чурина Е.Г. Роль адаптивных субпопуляций Т-лимфоцитов в патогенезе туберкулеза легких. *Клиническая патофизиология*, 2021;27(3):63–68.
2. Кошкина А.А., Новицкий В.В., Уразова О.И. и др. Особенности CD3/CD28-индуцированной секреции интерлейкина-2 и субпопуляционный состав Т-лимфоцитов крови у больных туберкулезом легких. *Acta Biomedica Scientifica*, 2012;3(2):92–95.
3. Кудлай Д.А. Гибридные белки CFP10 и ESAT6. Путь от разработки молекулы до скрининга населения на туберкулезную инфекцию. *Иммунология*, 2021;42(2):166–174, doi: 10.33029/0206–4952–2021–42–2–166–174
4. Кудлай Д.А., Докторова Н.П. Антигены ESAT-6 и CFP-10 как субстрат биотехнологической молекулы. Возможности применения в медицине. *Инфекция и иммунитет*, 2022;12(3):439–449, doi: 10.15789/2220–7619-EAC-1763
5. Никулина Е.Л., Наследникова И.О., Уразова О.И., Воронкова О.В., Новицкий В.В., Некрасов Е.В., Филинюк О.В., Чурина Е.Г., Михеева К.О., Хасанова Р.Р., Серебрякова В.А., Сухаленцева Н.А. Аллельный полиморфизм генов IFN- γ и TGF- β как фактор модуляции секреции

- цитокинов и подверженности туберкулезу легких. *Туберкулез и болезни легких*, 2010;6:15–19.
6. Новицкий В.В., Воронкова О.В., Уразова О.И. и др. К вопросу о патологии иммунитета при туберкулезе легких. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*, 2008;1:15–18.
 7. Новицкий В.В., Уразова О.И., Стрелис А.К. и др. Патология иммунитета: причина или следствие туберкулезной инфекции? *Бюллетень сибирской медицины*, 2006;5(2):70–74, doi: [10.20538/1682-0363-2006-2-70-74](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2006-2-70-74)
 8. Новицкий В.В., Чурина Е.Г., Уразова О.И. др. Роль регуляторных Т-клеток и эозинофилов в механизмах модуляции иммунного ответа при туберкулезе легких. *Иммунология*, 2012;33(4):184–188.
 9. Серебрякова В.А., Санина А.Е., Уразова О.И. и др. Роль сигнального пути Notch в патогенезе заболеваний легких неинфекционной этиологии. *Цитология*, 2023;65(1):3–10, doi: [10.31857/S0041377123010091](https://doi.org/10.31857/S0041377123010091)
 10. Скорняков С.Н., Шульгина М.В., Журавлев В.Ю. и др. Фтизиатрия. Национальные клинические рекомендации, под ред. П.К. Яблонского. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015, 240 с.
 11. Филинюк О.В., Фелькер И.Г., Уразова О.И. и др. Множественно-лекарственно устойчивый туберкулез: факторы риска, причины неудач в лечении. Томск: Печатная мануфактура, 2012, 124 с.
 12. Чурина Е.Г., Попова А.В., Уразова О.И. и др. Макрофаги и противотуберкулезный иммунитет. *Вестник Томского государственного университета. Химия*, 2022;26:32–59, doi: [10.17223/24135542/26/3](https://doi.org/10.17223/24135542/26/3)
 13. Чурина Е.Г., Ситникова А.В., Уразова О.И. и др. Экспрессия провоспалительных и костимулирующих молекул на макрофагах *in vitro* у больных туберкулезом легких. *Бюллетень сибирской медицины*, 2020;19(4):179–188, doi: [10.20538/1682-0363-2020-4-179-188](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-179-188)
 14. Чурина Е.Г., Уразова О.И., Новицкий В.В., Кононова Т.Е. Иммуносупрессорные эффекты регуляторных Т-лимфоцитов крови при

- диссеминированном туберкулезе легких с множественной лекарственной устойчивостью *M. tuberculosis*. *Бюллетень сибирской медицины*, 2013;12(1):143–146, doi: 10.20538/1682–0363–2013–1–143–146
15. Чурина Е.Г., Уразова О.И., Новицкий В.В. и др. Факторы дисрегуляции иммунного ответа (на различных этапах его реализации) при туберкулезе легких. *Бюллетень сибирской медицины*, 2016;15(5):166–177, doi: 10.20538/1682–0363–2016–5–166–177
 16. Чурина Е.Г., Уразова О.И., Ситникова А.В. и др. Дифференцировка моноцитов крови и особенности цитокинового статуса у больных туберкулезом легких. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*, 2020;64(4):79–87. doi: 10.25557/0031–2991.2020.04.79–87
 17. Achkar J.M., Chan J., Casadevall A. B cells and antibodies in the defense against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunol Rev*, 2015;264(1):167–181, doi: 10.1111/imr.12276
 18. Amsen D., Helbig C., Backer R.A. Notch in T Cell Differentiation: All Things Considered. *Trends Immunol*, 2015;36(12):802–814, doi: 10.1016/j.it.2015.10.007
 19. Antfolk D., Antila C., Kemppainen K. et al. Decoding the PTM-switchboard of Notch. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2019;1866(12):118507, doi: 10.1016/j.bbamcr.2019.07.002
 20. Brandstadter J.D., Maillard I. Notch signalling in T cell homeostasis and differentiation. *Open Biol*, 2019;9(11):190187, doi: 10.1098/rsob.190187
 21. Butcher M.J., Zhu J. Recent advances in understanding the Th1/Th2 effector choice. *Fac Rev*, 2021;10:30, doi: 10.12703/r/10–30
 22. Chiplunkar S.V., Gogoi D. The multifaceted role of Notch signal in regulating T cell fate. *Immunol Lett*, 2019;206:59–64, doi: 10.1016/j.imlet.2019.01.004
 23. Choudhury M., Virivinti J., Kandi S. et al. Th2 immune response by the iron-regulated protein HupB of *Mycobacterium tuberculosis*. *Indian J Tuberc*, 2022;69(1):90–99, doi: 10.1016/j.ijtb.2021.04.011

24. *Gaiimo B.D., Borggreffe T.* Introduction to Molecular Mechanisms in Notch Signal Transduction and Disease Pathogenesis. *Adv Exp Med Biol*, 2018;1066:3–30, doi: 10.1007/978-3-319-89512-3_1
25. *He S., Yang S., Zhao Q. et al.* Association of IL4, IL6, and IL10 polymorphisms with pulmonary tuberculosis in a Tibetan Chinese population. *Oncotarget*, 2018;9(23):16418–16426, doi: 10.18632/oncotarget.23995
26. *He X.Y., Xiao L., Chen H.B. et al.* T regulatory cells and Th1/Th2 cytokines in peripheral blood from tuberculosis patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2010;29(6):643–650, doi: 10.1007/s10096-010-0908-0
27. *Hertweck A., Vila de Mucha M., Barber P.R. et al.* The Th1 cell lineage-determining transcription factor T-bet suppresses TH2 gene expression by redistributing GATA3 away from Th2 genes. *Nucleic Acids Res*, 2022;50(8):4557–4573, doi: 10.1093/nar/gkac258
28. *Hildebrand D., Uhle F., Sahin D. et al.* The Interplay of Notch Signaling and STAT3 in TLR-Activated Human Primary Monocytes. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018;8:241, doi: 10.3389/fcimb.2018.00241
29. *Hur J.Y.* γ -Secretase in Alzheimer's disease. *Exp Mol Med*, 2022;5(4):433–446, doi: 10.1038 /s12276-022-00754-8
30. *Ito T., Connett J.M., Kunkel S.L., Matsukawa A.* Notch system in the linkage of innate and adaptive immunity. *J Leukoc Biol*, 2012;92(1):59–65, doi: 10.1189/jlb.1011529
31. *Jianfang W., Hui W., Le K.* LINC00870 regulates Th1/Th2 via the JAK/STAT pathway in peripheral blood mononuclear cells infected with Mycobacterium tuberculosis. *Int Immunopharmacol*, 2022;102:107188, doi: 10.1016/j.intimp.2020.107188
32. *Kisuya J., Chemtai A., Raballah E. et al.* The diagnostic accuracy of Th1 (IFN- γ , TNF- α , and IL-2) and Th2 (IL-4, IL-6 and IL-10) cytokines response in AFB microscopy smear negative PTB- HIV co-infected patients. *Sci Rep*, 2019;9(1):2966, doi: 10.1038/s41598-019-39048-x

33. Kiyokawa H., Morimoto M. Notch signaling in the mammalian respiratory system, specifically the trachea and lungs, in development, homeostasis, regeneration, and disease. *Dev Growth Differ*, 2020;62(1):67–79, doi: 10.1111/dgd.12628
34. Kononova T.E., Urazova O.I., Novitskii V.V., Churina E.G. Regulation of antibacterial (antitubercular) immunity mediated by T-helper type-17 lymphocytes. *Molecular Biology*, 2013;47(6):769–775, doi: 10.1134/S0026893313050087
35. Laky K., Evans S., Perez-Diez A., Fowlkes B.J. Notch signaling regulates antigen sensitivity of naive CD4⁺ T cells by tuning co-stimulation. *Immunity*, 2015;42(1):80–94, doi: 10.1016/j.immuni.2014.12.027
36. Li Q.F., He X.Y., Xin T. Role of the Notch signaling pathway in children with tuberculosis. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*, 2019;21(10):1012–1015, doi: 10.7499/j.issn.1008–8830.2019.10.011
37. Li Q., Zhang H., Yu L. et al. Down-regulation of Notch signaling pathway reverses the Th1/Th2 imbalance in tuberculosis patients. *Int Immunopharmacol*, 2018;54:24–32, doi: 10.1016/j.intimp.2017.10.026
38. Lu Y.J., Barreira-Silva P., Boyce S. et al. CD4 T cell help prevents CD8 T cell exhaustion and promotes control of Mycobacterium tuberculosis infection. *Cell Rep*, 2021;36(11):109696, doi: 10.1016/j.celrep.2021.109696
39. Majumder S., Crabtree J.S., Golde T.E. et al. Targeting Notch in oncology: the path forward. *Nat Rev Drug Discov*, 2021;20(2):125–144, doi: 10.1038/s41573–020–00091–3
40. McCaw T.R., Inga E., Chen H. et al. Gamma Secretase Inhibitors in Cancer: A Current Perspective on Clinical Performance. *Oncologist*, 2021;26(4):e608–e621, doi: 10.1002/onco.13627
41. Narayana Y., Balaji K.N. NOTCH1 up-regulation and signaling involved in Mycobacterium bovis BCG-induced SOCS3 expression in macrophages. *J Biol Chem*, 2008;283(18):12501–12511, doi: 10.1074/jbc.M709960200

42. *Narinyan W., Poladian N., Orujyan D. et al.* Immunologic Role of Innate Lymphoid Cells against Mycobacterial tuberculosis Infection. *Biomedicines*, 2022;10(11):2828, doi: 10.3390/biomedicines10112828
43. *Rook G.A.* Th2 cytokines in susceptibility to tuberculosis. *Curr Mol Med*, 2007;7(3):327–337, doi: 10.2174/156652407780598557
44. *Schaller M.A., Allen R.M., Kimura S. et al.*, Systemic Expression of Notch Ligand Delta-Like 4 during Mycobacterial Infection Alters the T Cell Immune Response. *Front Immunol*, 2016;7:527, doi: 10.3389/fimmu.2016.00527
45. *Shang Y., Smith S., Hu X.* Role of Notch signaling in regulating innate immunity and inflammation in health and disease. *Protein Cell*, 2016;7(3):159–174, doi: 10.1007/s13238–016–0250–0
46. *Timbergen M.J.M., Smits R., Grünhagen D.J. et al.* Activated Signaling Pathways and Targeted Therapies in Desmoid-Type Fibromatosis: A Literature Review, *Front Oncol*, 2019;9:397, doi: 10.3389/fonc.2019.00397
47. *Urazova O.I., Churina E.G., Hasanova R.R. et al.* Association between polymorphisms of cytokine genes and secretion of IL-12p70, IL-18, and IL-27 by dendritic cells in patients with pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis*, 2019;115:56–62, doi: 10.1016/j.tube.2019.02.003
48. *Wu Q., Huang Y., Zhou Y. et al.* Study of the association of interferon- γ gene polymorphisms and Th1/Th2 balance in tuberculosis susceptibility. *Am J Transl Res*, 2021;13(5):5533–5539.
49. *Zhang J.A., Lu Y.B., Wang W.D. et al.* BTLA-Expressing Dendritic Cells in Patients With Tuberculosis Exhibit Reduced Production of IL-12/IFN- α and Increased Production of IL-4 and TGF- β , Favoring Th2 and Foxp3⁺ Treg Polarization. *Front Immunol*, 2020;11:518, doi: 10.3389/fimmu.2020.00518
50. *Zhou B., Lin W., Long Y. et al.* Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics. *Signal Transduct Target Ther*, 2022;7(1):95, doi: 10.1038/s41392–022–00934-y

3. Влияние фармакологического ингибирования белка МЛУ Р-гр на провоспалительные свойства макрофагов человека

Ерохина М.В., Павлова Е.Н., Лепеха Л.Н.,
Курынина А.В., Щербакова Е.А., Эргешов А.Э.

Введение

Механизмы, снижающие эффективность противотуберкулезных препаратов (ПТП), могут формироваться на двух уровнях организации: (1) за счет резистентности возбудителя и (2) на уровне клеток человека за счет активности белков-транспортеров, получивших название «белки множественной лекарственной устойчивости» (МЛУ). А также было признано, что исследование механизмов транспорта лекарств является одним из важнейших аспектов в проблеме лечения ТБ [8]. При пероральном приеме ПТП, прежде чем они достигнут *M. tuberculosis*, они должны будут пройти через ряд клеточных мембран, взаимодействуя с разными белками МЛУ клеток человека, активно транспортирующим из цитоплазмы во внеклеточное пространство разнообразные субстраты, в том числе и лекарственные препараты. Одним из наиболее значимых МЛУ белков при туберкулезном воспалении является Р-гликопротеин (Р-гр): экспрессия гена Р-гр возрастает при активном туберкулезном процессе у пациентов с ТБ легких и экспрессия гена белка Р-гр *MDR1* в тканях легких больных ТБ по сравнению с генами других МЛУ белков является значительно более высокой [1, 14].

Несмотря на то что Р-гр активно исследуется уже более 40 лет, его способность распознавать и транспортировать широкий спектр

соединений до сих пор недостаточно изучена. Считается, что одной из причин, которая бы могла объяснить широкую субстратную специфичность Р-гр, – это наличие нескольких сайтов связывания с субстратами. Показано, что множественные сайты на Р-гр проявляют комплексные аллостерические взаимодействия, через которые связывание лекарственного средства на одном сайте переключает другие сайты между конформациями высокой или низкой аффинности [24]. В итоге субстраты могут иметь на Р-гр более одного сайта связывания, через которые они затем транспортируются из клеток во внеклеточную среду. Таким образом, существование нескольких сайтов и влияние этих сайтов друг на друга генерирует молекулярную гибкость, что позволяет объяснить широкую субстратную специфичность Р-гр [10].

Кроме субстратов Р-гр описан также целый класс соединений, которые могут влиять на транспортную функцию Р-гр, так называемые модуляторы Р-гр. Эти вещества могут или ингибировать транспортную функцию Р-гр (ингибиторы), или усиливать ее (сенситизаторы). Модуляторы могут ингибировать транспортную функцию Р-гр несколькими способами, и способ их действия на молекулярном уровне не всегда понятен. Наиболее распространенными ингибиторами функции Р-гр являются винбластин и верапамил. Ингибирование Р-гр позволяет лучше понять значимость этого белка-транспортера во многих физиологических и патологических процессах.

В настоящее время наличие разных механизмов, способствующих снижению эффективности противотуберкулезной химиотерапии (ХТ), поставило вопрос о поиске новых терапевтических стратегий, направленных на защитные свойства организма самого больного ТБ. Макрофаги являются ключевыми регуляторами воспалительного процесса, от их функциональной активности зависит успешность элиминации внутриклеточных форм *M. tuberculosis*. Перспективной мишенью для разработки новых терапевтических стратегий являются макрофаги, которые находятся в зоне развития туберкулезного воспаления и участвуют в борьбе с возбудителем *M. tuberculosis* и в формировании гранулемы (рис. 3.1).

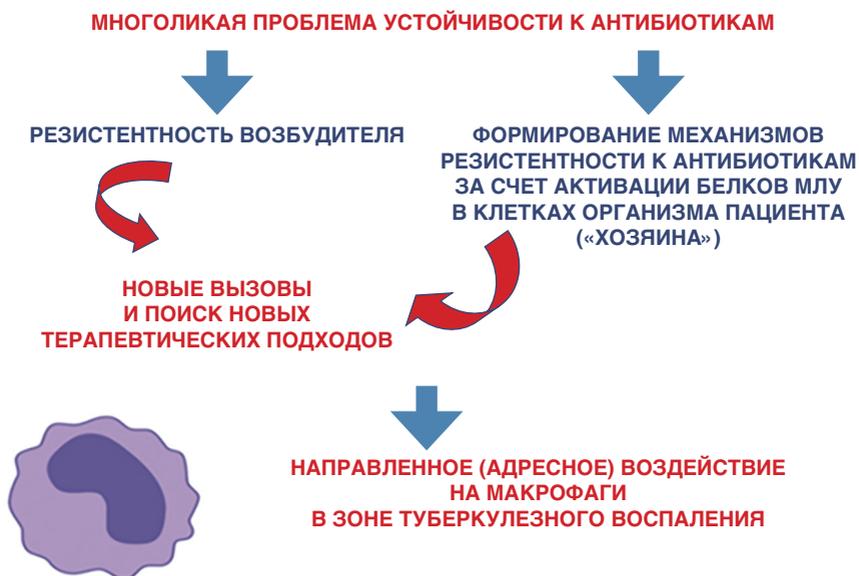


Рисунок 3.1. Проблема устойчивости к антибиотикам и макрофаги, как перспективная мишень для разработки новых терапевтических стратегий у больных ТБ легких

Выделяют два полярных фенотипа активированных макрофагов: классический (M1-макрофаги) и альтернативный (M2-макрофаги) [22]. Такая классификация макрофагов связана с участием Th1 и Th2 в воспалительной реакции, что приводит к секреции макрофагами определенного цитокинового профиля, позволяющего отнести макрофаги к M1 или M2 фенотипу. Согласно современным данным, M1-макрофаги характеризуются синтезом провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 и IL-12), продукцией активных форм кислорода (АФК) и промежуточных продуктов азотного обмена – оксида азота (NO) [21]. На начальной стадии туберкулезного воспаления в очаге преобладают провоспалительные (M1) макрофаги. Именно поэтому в данной работе в качестве модели макрофагов были выбраны M1-макрофаги, полученные из моноцитарной клеточной линии человека THP-1.

Изучение молекулярных и клеточных механизмов, через которые возможно терапевтически «улучшить» или изменить потенциал макрофагов, является актуальным научным направлением для поиска путей повышения эффективности лечения больных ТБ легких. Цель работы: исследовать влияние фармакологического ингибирования Р-гр верапамилом на функциональные свойства провоспалительных макрофагов в процессе их дифференцировки.

Материалы и методы

В качестве модели М1-макрофагов использовалась моноцитарная клеточная линия ТНР-1, индуцированная в макрофагальном направлении 100 нМ форболового эфира. Для ингибирования функциональной активности Р-гр использовали R-верапамил гидрохлорид (VER, Sigma-Aldrich, США) в концентрации 10 мкМ, которая полностью ингибировала функциональную активность Р-гр в макрофагах. Влияние фармакологического ингибирования Р-гр на свойства макрофагов изучали на ранние (3-и сутки) и поздние (7-е сутки) сроки макрофагальной дифференцировки. Препарат добавляли при индукции макрофагальной дифференцировки совместно с форболовым эфиром, а также на 3-и и 5-е сутки дифференцировки. Выбор сроков дифференцировки обусловлен полученными ранее данными о формировании морфофункционального фенотипа макрофагов ТНР-1 [3].

Для количественного определения уровня секретируемых провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6 и TNF- α и противовоспалительного IL-10 использовали набор MILLIPLEX MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel. Количественный анализ концентрации секретируемых в среду цитокинов был выполнен на мультиплексном анализаторе MagPix Luminex.

Для анализа изменения профиля экспрессии гена *MDR1* и генов фагоцитарных рецепторов использовали метод количественной ПЦР в реальном времени. РНК выделяли с помощью TRIReagent

(MRC, UK) в соответствии с инструкциями производителя. Для оценки качества и количества выделенной РНК использовали спектрофотометр Nanodrop 8000. Для дальнейшего синтеза кДНК использовали образцы с соотношением абсорбции на длинах волн 260/280 в диапазоне с 1,9 до 2,1. Один мкг тотальной РНК обрабатывали с помощью ДНКазы I (Thermo Fisher Scientific, США) и кДНК синтезировали с помощью набора RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколу производителя. Все реакции (40 циклов) были запущены на приборе QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США). Относительный уровень экспрессии генов (RQ) рассчитывали по формуле $2^{-\Delta\Delta Ct}$, нормализованные к уровню гена домашнего хозяйства B2M. Для обработки и анализа данных ПЦР в реальном времени использовали программное обеспечение ExpressionSuite Software v.1.3 (Applied Biosystems). Все эксперименты были проведены в 3 биологических повторах. Для биологического повтора использовали усредненное значение 3 технических повторов. Данные представлены как средние значения относительного уровня экспрессии гена биологических повторов (RQ, у.е.) \pm стандартное отклонение.

Таблица 3.1. Ген-специфические праймеры, используемые для ПЦР

Ген	Прямой	Обратный	п.н.
<i>CD64</i>	AGCTGTGAAACAAG TTGCTCT	GGTCTTGCTGCC ATGTAGA	75
<i>CD206</i>	CTACAAGGGATCGGG TTTATGGA	TTGGCATTGCCTAGTA GCGTA	105
<i>CD209</i>	CCAGGTGAAGCGG TТАCTTC	GCTCGTCGTAATCAAAA GTGC	76
<i>B2M</i>	GGGTTTCATCCATCCG ACATTG	ACACGGCAGGCATACTC	161
<i>MDR1</i>	TTGCTGCTTACATTCAAG TTTCA	AGCCTATCTCCTGTC GCATTA	105

Оценка механизмов фагоцитарной активности макрофагов была проведена с применением флуоресцентных латексных частиц, конъюгированных с разными лигандами: желатином (Gel-частицы), маннаном (Man-частицы) и Fc-фрагментом IgG (Fc-частицы). Использованный набор лигандов активирует рецепторные пути фагоцитоза, характерные для провоспалительных (Fc- и Gel-частицы), или противовоспалительных, макрофагов (Man-частицы). Для анализа механизмов фагоцитоза латексные шарики (1 мкм) конъюгировали со следующими лигандами: желатин из рыбьей кожи (FSG, Thermo Fisher Scientific, США), IgG фрагмент Fc (Thermo Fisher Scientific) и маннан из клеточной стенки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma) в соответствии с рекомендациями производителя (Invitrogen). Клетки инкубировали с лигандами в течение 1, 3 и 6 часов. Фагоцитарная активность клеток оценивалась по показателю фагоцитарного числа (ФЧ) – среднего числа поглощенных частиц на клетку на 3-и и 7-е сутки дифференцировки. Клетки дополнительно окрашивали фаллоидином TRITC (Sigma) в течение 40 мин. и монтировали с использованием поливинилового спирта Mowiol 4 88 (Calbiochem, США), содержащего DAPI для ядерного окрашивания и анализировали с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии: микроскоп TCS SPE (Leica), оснащен набором лазеров (405, 488, 532 и 635 нм) и соответствующими фильтрами (RT 30/70, DD 405/532, DD 488/635). Изображения клеток регистрировали с использованием 40× и 63× цели и анализировали с помощью программы LAS AF. Статистическая обработка данных проводилась с помощью программ Microsoft Office Excel 2012 и Statistica 7.

Результаты и обсуждение

Анализ фагоцитарной активности макрофагов на разных сроках дифференцировки

Макрофагальная дифференцировка клеток THP-1 сопровождается адгезией клеток к субстрату, расплыванием и приобретением макрофагального фенотипа. Рецепторы фагоцитоза относятся

к молекулярным детерминантам, позволяющим выявить направление активации макрофагов и их функциональную зрелость. Данные о фагоцитарной активности разных фенотипов макрофагов немногочисленны. Отмечается, что для M1-макрофагов характерным является фагоцитоз через рецепторы FcR-семейства и рецепторы комплемента (CR), тогда как для M2-макрофагов – через «неопсонинные» рецепторы (ManR, DC-SIGN, Dectin-1, интегрины и «scavenger»-рецепторы) [20]. Одновременно с вышеперечисленными рецепторами макрофаги M1 и M2 могут осуществлять захват частиц путем конститутивного фагоцитоза [9].

Иллюстрация локализации Fc-, Gel- и Man-частиц в цитоплазме макрофагальных клеток приведены на рисунке 3.2.

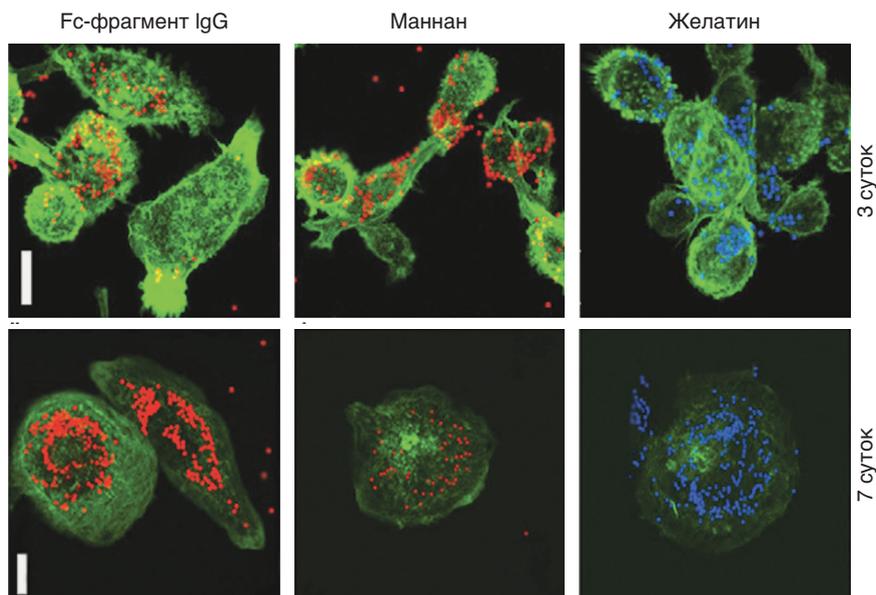


Рисунок 3.2. Локализация Fc-, Man- и Gel-латексных частиц в клетках THP-1 при индукции дифференцировки на 3-и сутки и 7-е сутки. Диаметр частиц 1 мкм; зеленый цвет – маркирование актиновых микрофиламентов FITC-фаллоидином. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. Масштабный отрезок = 10 мкм

К 7-м суткам дифференцировки происходит интенсификация фагоцитарного процесса с участием разных механизмов фагоцитоза и локализация лигандов преимущественно в околядерной зоне макрофагов.

Оценка механизмов фагоцитарной активности макрофагов показала, что на 3-и сутки дифференцировки средние показатели ФЧ через 3 и 6 часов после добавления в среду культивирования соответствующих латексных частиц составляют: для Fc-частиц – 18 и 47, для Man- и Gel-частиц – 10 и 20 соответственно. Показатели ФЧ для Fc-частиц выше в 1,8–2,35 раза, чем для Gel- и Man-частиц, то есть на данный срок дифференцировки фагоцитоз через Fc-рецепторы является преобладающим. На 7-е сутки дифференцировки ФЧ для Fc-частиц составляет 60 и 104, для Gel-частиц – 44 и 100, для Man-частиц – 22 и 69 соответственно. Через 3 часа культивирования поглощение Fc-частиц преобладает в 1,3 раза над Gel-частицами и в 2,7 раза над Man-частицами. Через 6 часов культивирования ФЧ для Fc- и Gel-частиц возрастают в 1,5–2,2 раза и выходят на один уровень интенсивности.

Полученные данные свидетельствуют о фагоцитарной активности макрофагов ТНР-1 через рецепторы, характерные для провоспалительного типа и о возрастании их функциональной активности в процессе дифференцировки. На 3-и сутки дифференцировки клетки характеризуются реализацией конститутивного пути фагоцитоза и фагоцитоза через Fc-рецепторы. На 7-е сутки происходит активация поглощения латексных частиц не только через Fc- и Gel-рецепторы, но и через ManR. Следует отметить, что в отличие от фагоцитоза Gel- и Fc-частиц на активацию именно этого пути клеткам требуется больше временных затрат, что описано и другими авторами [4, 15].

Таким образом, полученные данные подтверждают активацию клеток ТНР-1 по провоспалительному типу M1-макрофагов. А также демонстрируют, что в процессе макрофагальной дифференцировки происходит становление функциональной зрелости этих клеток уже к 3-м суткам дифференцировки с более активной ее реализацией на 7-е сутки. Ранее нами также было показано, что в процессе

макрофагальной дифференцировки клеток ТНР-1 происходит возрастание экспрессии гена *ABCB1* (синоним *MDR1*, кодирует белок Р-gp) и функциональной активности Р-gp [2, 5].

Эффекты фармакологического ингибирования Р-gp на секрецию цитокинов и фагоцитарные рецепторы

В нашей работе мы сравнили профили секреции макрофагами ТНР-1 цитокинов, имеющих значение при туберкулезном воспалении: IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-10 при воздействии верапамилом (VER) на разных сроках макрофагальной дифференцировки. В выбранной экспериментальной модели к 7-м суткам дифференцировки макрофагов увеличивается уровень секреции IL-1 β в 2 раза (с $243,23 \pm 11,30$ до $540,33 \pm 26,34$ пг/мл), а также более чем в 4 раза уровни секреции IL-6 ($18,3 \pm 1,99$ до $80,1 \pm 7,01$ пг/мл) и IL-10 (с $16,29 \pm 1,95$ до $73,5 \pm 7,87$ пг/мл). При этом уровень секреции TNF α возрастает незначительно: с $902,15 \pm 123,94$ до $1137,98 \pm 93,24$ пг/мл (рис. 3.3).

Полученные данные свидетельствует об усилении провоспалительных свойств макрофагов и становлении из зрелого фенотипа в процессе прохождения дифференцировки.

Уровень секреции IL-1 β , IL-6 и TNF- α значительно снижается под воздействием VER на ранних сроках макрофагальной дифференцировки (в 2 раза в среднем) по сравнению с контролем. Но к 7-м суткам дифференцировки уровень секреции IL-1 β , IL-6 и TNF- α возрастает, практически достигая контрольных значений (IL-6 и TNF- α) или демонстрируя более низкий уровень (IL-1 β). Таким образом, фармакологическое ингибирование Р-gp оказывает разное воздействие на М1-макрофаги в зависимости от стадии их дифференцировки. Мы предполагаем, что фармакологическое ингибирование Р-gp может препятствовать секреции IL-1 β . Для подтверждения гипотезы об ингибировании секреции IL-1 β требуется дальнейшая проверка путем сравнения уровней внутриклеточных и секретируемых цитокинов под воздействием VER в макрофагах.

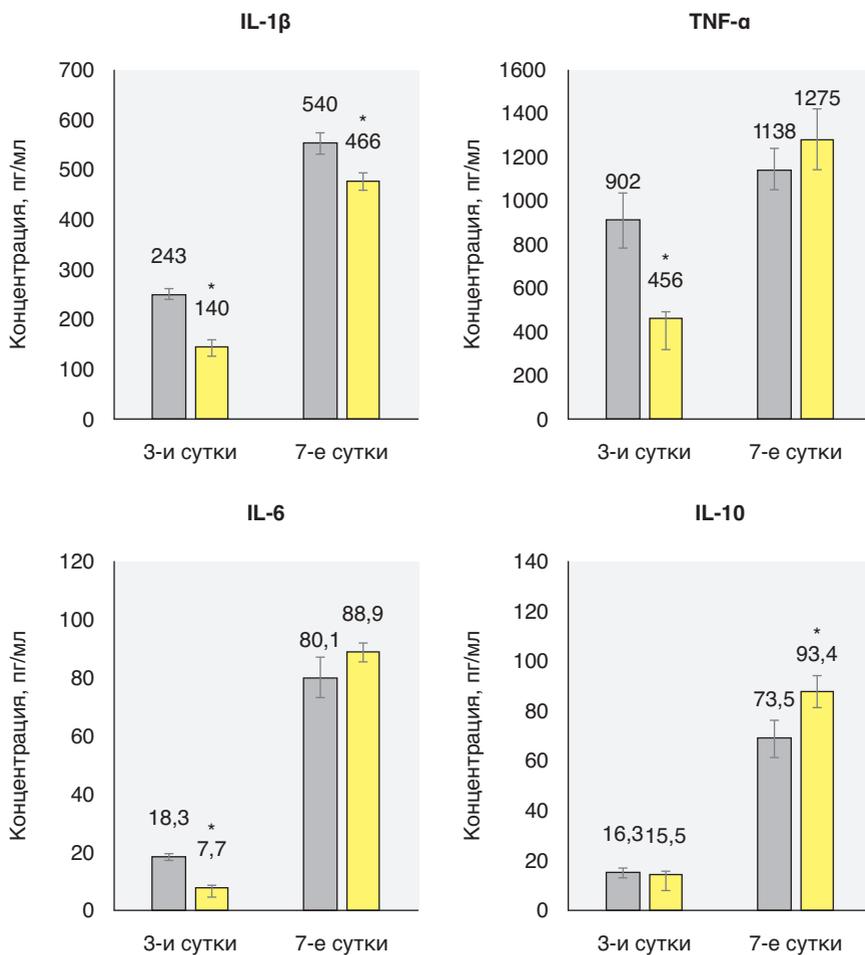


Рисунок 3.3. Влияние фармакологического ингибирования на экспрессию (А) и секрецию (Б) генов макрофагов ТНР-1 в процессе дифференцировки (3-и и 7-е сутки). Относительный уровень секреции цитокинов в контроле на 3-и и 7-е сутки макрофагальной дифференцировки принят за 1. Серый цвет – контроль, желтый цвет – VER; * – статистически значимые различия по сравнению с контролем ($p < 0,05$)

Ранее было показано, что фармакологическое ингибирование Р-гр снижает секрецию TNF- α , IL-2, IL-4, IL-12, INF- γ , [13, 23]. Так, в работе Abate G. и соавт. [6] было обнаружено, что, несмотря на то что

верапамил ингибировал внутриклеточный рост *M. tuberculosis* дозозависимым образом, препарат не активировал макрофаги человека. Верапамил в концентрации 100 мкМ не оказывал влияния на уровень секреции IL-1 β , TNF- α или IFN- γ в инфицированных BCG штаммом макрофагах человека, полученных из моноцитов крови по сравнению с контролем. То, что автору не удалось обнаружить изменение в уровнях секреции по сравнению с контролем, может указывать не на тот факт, что VER не активируется макрофаги, а на то, что он ингибирует P-гр, препятствуя секреции исследованных цитокинов. Таким образом, если уровень секреции данных цитокинов в среде был сопоставим с контролем, то вполне возможно, что внутриклеточные уровни данных цитокинов были повышены.

Высокая функциональная активность P-гр может не только снижать внутриклеточную концентрацию препаратов, но и сам белок может регулировать иммунный ответ, что также является актуальным при туберкулезном воспалении. Так, мыши с нокаутом по генам *Mdr1a/Mdr1b* характеризуются сниженной секрецией провоспалительных цитокинов и меньшим количеством иммунных клеток в зоне воспаления по сравнению с контролем [11, 19]. Также есть данные, что P-гр может участвовать в транспорте цитокинов из иммунных клеток. Фармакологическое ингибирование P-гр снижает секрецию TNF- α , IL-2, IL-4, IL-12, INF- γ [13, 23]. А именно эти цитокины играют важную роль в патогенезе ТБ.

В выбранной модели макрофагальной дифференцировки макрофаги характеризуются наиболее высоким уровнем активности фагоцитоза IgG-опсонизированных латексных частиц [3]. В зависимости от поляризации макрофагов будут преобладать разные рецепторы фагоцитоза: в M1-макрофагах CD64 (маркер FcR), в M2-макрофагах – CD206 и CD209 (маркеры ManR). В выбранной модели макрофагальной дифференцировки M1-макрофаги характеризуются крайне низким уровнем экспрессии маннозного рецептора CD206 по сравнению с другим лектиновым рецептором CD209, присутствующим на поверхности как макрофагальных, так и дендритных клеток.

Действие VER на 3-и сутки дифференцировки макрофагов приводило к существенному возрастанию уровня экспрессии как гена CD64, так и гена CD209 – в среднем в 1,5–2 раза по сравнению с контролем (принят за 1). К 7-м суткам дифференцировки активность экспрессии генов снижалась, но для CD64 все равно оставалась на более высоком уровне, чем в контроле (рис. 3.4).

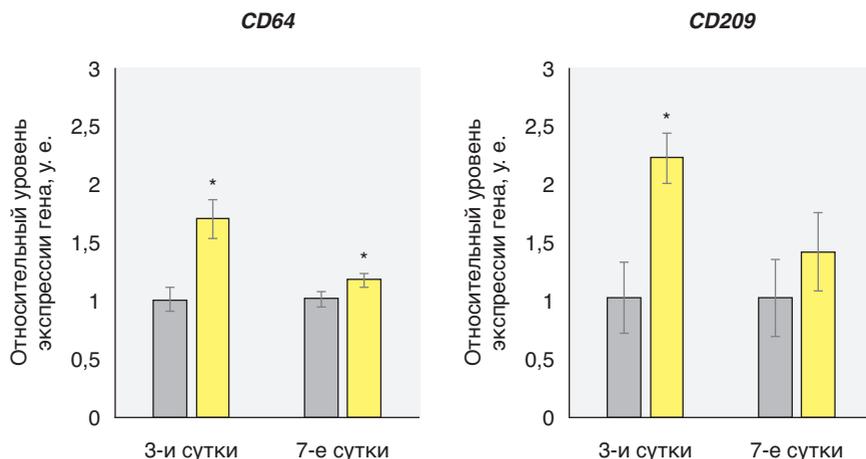


Рисунок 3.4. Влияние верапамила на экспрессию фагоцитарных рецепторов в макрофагах THP-1 в процессе дифференцировки (3-и и 7-е сутки). Относительный уровень экспрессии генов в контроле на 3-и и 7-е сутки макрофагальной дифференцировки принят за 1. Серый цвет – контроль, желтый цвет – VER; * – статистически значимые различия по сравнению с контролем ($p < 0,05$)

Полученные результаты свидетельствуют о функциональной значимости P-gr в реализации разных вариантов рецепторного фагоцитоза, что требует дальнейшего изучения на инфицированных *M. tuberculosis* макрофагах человека.

TNF- α – один из цитокинов, который играет важное значение в патогенезе туберкулеза. Он продуцируется преимущественно моноцитами и макрофагами. TNF- α способствует миграции иммунных

клеток к месту инфицирования и повышает способность макрофагов к внутриклеточному убийству бактерий. Низкий уровень TNF- α может способствовать внутриклеточному выживанию *M. tuberculosis*, в то же время чрезмерно высокий уровень TNF- α может запускать некроз в инфицированных макрофагах и тем самым способствовать распространению микобактерий. Таким образом, влияние препаратов на уровень TNF- α может как способствовать лечению ТБ, так и препятствовать ему в зависимости от исходного уровня цитокина на момент начала лечения.

Уровень секреции IL-1 β под воздействием VER снижается по сравнению с контролем на всех сроках макрофагальной дифференцировки при всех вариантах фармакологического воздействия, что может свидетельствовать о том, что фармакологическое ингибирование P-гр может препятствовать секреции IL-1 β . IL-1 β также является одним из ключевых цитокинов для борьбы макрофагов с микобактериями. Так, мыши с нокаутом рецептора в IL-1 или цитокина IL-1 β более восприимчивы к инфекции, проявляющейся более высокой бактериальной нагрузкой в легких и повышенной смертностью на ранней стадии инфекции [18]. Снижение экспрессии IL-1 β при ингибировании активности P-гр может негативно влиять на борьбу с возбудителем.

Ранее было показано, что для внутриклеточной элиминации *M. tuberculosis* при ингибировании функциональной активности P-гр в макрофагах требовались значительно меньшие концентрации рифампицина и этамбутола, чем в контроле [17]. Также использование фармакологического ингибитора P-гр верапамила совместно с рифампицином способствовало усилению бактерицидных эффектов антибиотика, в том числе и в отношении устойчивых к рифампицину штаммов *M. tuberculosis* [12, 16]. Также верапамил усиливает бактерицидный эффект бедаквилина [7, 25, 26]. Это позволило сделать предположение, что использование фармакологических ингибиторов P-гр совместно с антибиотиками может рассматриваться в качестве перспективной стратегии повышения эффективности противотуберкулезной ХТ.

Заключение

Белок транспортер Р-гр является клинически значимым МЛУ белком при туберкулезном воспалении. Макрофаги являются первыми клетками врожденного иммунитета, которые вступают в борьбу с возбудителем *M. tuberculosis*, в связи с чем именно в них функциональная активность Р-гликопротеина представляет первоочередной интерес. Фармакологическое ингибирование Р-гр оказывает эффекты на секрецию провоспалительных цитокинов в М1-макрофагах, а также на их фагоцитарную активность, что свидетельствует об участии Р-гр в формировании провоспалительного фенотипа макрофагов человека. При этом вопрос изучения роли Р-гр в снижении эффективности действия ПТП, а также в регуляции туберкулезного воспаления является чрезвычайно актуальным и находится только на стадии разработки и накопления данных.

Литература

1. Ерохина М.В., Лепеха Л.Н., Эргешов А.Э. и др. Белки множественной лекарственной устойчивости соматических клеток легкого и особенности их экспрессии при фиброзно-кавернозном туберкулезе. *Туберкулез и болезни легких*, 2016;9:53–58.
2. Ерохина М.В., Павлова Е.Н., Тарасова Е.К. и др. Наночастицы полимера молочной кислоты с рифампицином снижают активность мультилекарственного транспортера Р-гр в макрофагах человека. *Вестник Московского Университета. Серия 16: Биология*, 2022;77(3):166–172.
3. Курынина А.В., Ерохина М.В., Макаревич О.А и др. Пластичность фагоцитарной активности клеток человека линии ТНР-1 при макрофагальной дифференцировке. *Биохимия*, 2018;83(3):309–325.
4. Монастырская Е.А., Лямина С.В., Малышев И.Ю. М1 и М2 фенотипы активированных макрофагов и их роль в иммунном ответе и при патологии. *Патогенез* 2008;6(4):31–39.

5. Павлова Е.Н., Ерохина М.В., Рыбалкина Е.Ю. и др. Влияние рифампицина на индукцию активности MDR1/P-gp в провоспалительных макрофагах человека. *Антибиотики и химиотерапия*, 2022;67(3–4):16–22, doi: 10.37489/0235–2990–2022–67–3–4–16–22
6. Abate G., Ruminiski P.G., Kumar M. et.al. New Verapamil Analogs Inhibit Intracellular Mycobacteria without Affecting the Functions of Mycobacterium-Specific T Cells. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015;60(3):1216–1225, doi: 10.1128/AAC.01567–15
7. Adams K.N., Szumowski J.D., Ramakrishnan L. Verapamil, and its metabolite norverapamil, inhibit macrophage-induced, bacterial efflux pump-mediated tolerance to multiple anti-tubercular drugs. *J Infect Dis*, 2014;210(3):456–466, doi: 10.1093/infdis/jiu095
8. de Brake L., de Knecht G.J., de Steenwinkel J.E. et.al. The Role of Efflux Pumps in Tuberculosis Treatment and Their Promise as a Target in Drug Development: Unraveling the Black Box. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 2018;58:271–291. doi: 10.4161/viru.23724
9. Canton J., Khezri R., Glogauer M., Grinstein S. Contrasting phagosome pH regulation and maturation in human M1 and M2 macrophages. *Mol Bio. Cell*, 2014;25:3330–3341, doi: 10.1091/mbc.E14–05–0967
10. Chufan E.E., Kapoor K., Sim H-M. et.al. Multiple transport-active binding sites are available for a single substrate on human P-glycoprotein (ABCB1). *PLoS One*, 2013;8(12): e82463, doi: 10.1371/journal.pone.0082463
11. van der Deen M., Timens W., Timmer-Bosscha H. et.al. Reduced inflammatory response in cigarette smoke exposed Mrp1/Mdr1a/1b deficient mice. *Respiratory research*, 2007;8(1):49, doi: 10.1186/1465–9921–8–49
12. Demitto F.O., Ribeiro do Amaral R.C., Maltempe F.G. et.al. In vitro activity of rifampicin and verapamil combination in multidrug-resistant mycobacterium tuberculosis. *PLoS One*, 2015;10(7): e0133343, doi: 10.1371/journal.pone.0116545

13. *Drach J., Gsur A., Hamilton G. et.al.* Involvement of P-glycoprotein in the transmembrane transport of interleukin-2 (IL-2), IL-4, and interferon-gamma in normal human T lymphocytes. *Blood*, 1996;88(5):1747–1754, doi: 10.1182/blood.V88.5.1747.1747
14. *Erokhina M., Lepekha L., Rybalkina E. et al.* Expression of MDR1 gene encoding P-glycoprotein is significantly increased in active pulmonary tuberculomas. *European Respiratory Journal*, 2021;58: PA2467
15. *Genin M., Clement F., Fattaccioli A. et.al.* M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer*, 2015;15:577, doi: 10.1186/s12885–015–1546–9
16. *Gupta S., Tyagi S., Bishai W.R.* Verapamil increases the bactericidal activity of bedaquiline against Mycobacterium tuberculosis in a mouse model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2015;59(1):673–676, doi: 10.1128/AAC.04019–1
17. *Hartkoorn R.C., Chandler B., Owen A. et.al.* Differential drug susceptibility intracellular and extracellular tuberculosis, and the impact of P-glycoprotein. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 2007;87(3):248–255, doi: 10.1016/j.tube.2006.12.001
18. *Juffermans N.P., Florquin S., Camoglio L. et.al.* Interleukin-1 signaling is essential for host defense during murine pulmonary tuberculosis. *The Journal of infectious diseases*, 2000;182(3):902–908, doi: 10.1086/315771
19. *Kooij G., Backer R., Koning J.J. et.al.* P-glycoprotein acts as an immunomodulator during neuroinflammation. *PloS one*, 2009;4(12): e8212, doi: 10.1371/journal.pone.0008212
20. *Leidi M., Gotti E., Bologna L. et.al.* M2 macrophages phagocytose rituximab-opsonized leukemic targets more efficiently than M1 cells in vitro. *J Immunol*, 2009;182:4415–4422, doi: 10.4049/jimmunol.0713732
21. *Martinez F.O., Gordon S.* The M1 and M2 Paradigm of Macrophage Activation: Time for Reassessment. *F1000Prime Reports*, 2014;6:13, doi: 10.12703/P6–13

22. Mills C.D., Kincaid K., Alt J.M. et.al. M1/M2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol*, 2000;164:6166–6173, doi: 10.4049/jimmunol.164.12.6166
23. Pawlik A., Baskiewicz-Masiuk M., Machalinski B., Gawronska-Szklarz B. Involvement of P-gp in the process of apoptosis in peripheral blood mononuclear cells *Int Immunopharmacol*, 2005;5(5):821–828, doi: 10.1016/j.intimp.2004
24. Safa A.R. Identification and characterization of the binding sites of P-glycoprotein for multidrug resistance-related drugs and modulators. *Current Medicinal Chemistry. Anti-Cancer Agents*, 2004;4(1):1–17, doi: 10.2174/1568011043482142
25. Viljoen A., Raynaud C., Johansen M.D. et.al. Verapamil Improves the Activity of Bedaquiline against Mycobacterium abscessus In vitro and in Macrophages. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2019;63(9): e00705–19, doi: 10.1128/AAC.00705–19
26. Xu J., Tasneen R., Peloquin C.A. et.al. Verapamil Increases the Bioavailability and Efficacy of Bedaquiline but Not Clofazimine in a Murine Model of Tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017;62(1): e01692–17, doi: 10.1128/AAC.01692–17

4. Влияние полиморфизма генов комплекса *H2* на течение туберкулезной инфекции и эффективность вакцинации BCG

Коротецкая М.В., Горбачева Д.В., Байкузина П.Г., Ант А.С.

Введение

Генетические подходы к проблеме

Для генетического анализа связи между генотипом и фенотипом обычно используют два основных подхода – прямую генетику (от фенотипа к гену) и обратную генетику (от гена к фенотипу). Каждый из них имеет свои плюсы и минусы.

Обратная генетика – это исторически более новый подход, который стал доступен по мере развития молекулярной биологии и биоинженерии в конце прошлого века. Смысл данного подхода в получении нокаут-мутаций в интересующем исследователя гене, а затем исследование того, к чему приводит нарушение работы этого гена [12, 15]. Этот подход дает ответ быстрее, чем прямая генетика, но в некотором смысле он более грубый. При нокаут-мутации результаты сразу говорят о том, что будет в отсутствие интересующей нас молекулы и какие механизмы зависят от данной молекулы. Однако это слишком сильное нарушение в работе клетки и организма, которое вряд ли могло бы закрепиться в популяции при естественном отборе, следовательно, в природе подобные варианты генома редки и быстро элиминируются. К тому же в организме всегда предусмотрены альтернативные биохимические пути, работа которых мешает изучать механизмы работы изначально интересующей исследователей молекулы.

Прямая генетика – это классический и более долгий путь получения данных о гене. Изначально необходимо найти контрастные фенотипы, а затем определить область генома, в которой находятся генетические различия между носителями таких фенотипов. Если речь идет о лабораторных животных, то носителей разных фенотипов скрещивают, а в полученных гибридах исследуют на носительство разнообразных генетических маркеров и проверяют на проявление интересующего фенотипа. В результате сегрегационного анализа определяют характер наследования генов-кандидатов, а затем с помощью специальной системы скрещиваний выводят новые гомозиготные (инбредные) линии. Получение набора таких рекомбинантных линий дает возможность затем охарактеризовать фенотипически каждую из них и определить, какая именно область генома связана с проявлением фенотипа. В ходе получения рекомбинантных линий нужно стремиться получить максимально короткие участки генетических вставок от одной линии на генетическую основу другой линии, которые достаточны для проявления изучаемого фенотипа. Тем самым будет сужаться генетический интервал вплоть до того, что можно будет провести позиционное клонирование искомым генов. В нашей работе мы используем именно прямой генетический подход и получаем новые линии мышей для идентификации генов, контролирующей тяжесть течения ТБ. Поскольку в основе этой работы лежат давно выведенные инбредные линии мышей, необходима небольшая историческая справка.

В 1909 году во вновь созданном Институте Басси (Гарвард) американский генетик К. Литтл (С. Little) начал выводить первые линии инбредных мышей для изучения генетической основы наследования окраски шерсти и способности отторгать пересаженные опухоли. Его работа увенчалась успехом и привела к созданию первой инбредной линии мышей – DBA. В лаборатории Колд-Спринг-Харбор (Нью-Йорк) к исследованиям Литтла присоединился Л. Стронг (L. Strong), в результате их совместной работы были выведены несколько наиболее распространенных инбредных линий мышей, используемых

до сих пор во всем мире. Одной из этих линий мышей была C57BL/6, которая послужила родительской линией для самой широко используемой линии C57BL/6J – первой инбредной линией мышей – первых животных, которых выбрали для полного секвенирования ДНК после человека в 2002 году (Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002) [9]. Затем уже другой исследователь – Дж. Снелл (G. Snell) из знаменитой Джексонской лаборатории (The Jackson Laboratory Bar Harbor, Main), – в 1930–1940-е годы исследуя генетику совместимости тканей, открыл комплекс *H2* у мышей, который регулирует основы иммунного ответа, что принесло ему и двум другим знаменитым генетикам, Б. Бенацерафу и Ж. Доссе, Нобелевскую премию 1980 года [24].

В прошлом веке с помощью методов трансплантации были выведены основные инбредные линии, которые сейчас используются в лабораториях всего мира. Сначала использовалась трансплантация опухолей, затем пересадка кожного лоскута. Дж. Снеллом были получены первые конгенно-резистентные линии, которые отличаются друг от друга только одним генетическим локусом (комплексом *H2*), чего оказалось достаточно для отторжения трансплантатов кожи [24]. В таблице 4.1 приведен краткий список конгенных линий на разных генетических основах, которые наиболее часто использовались в исследованиях по иммуногенетике в разных лабораториях мира.

Таблица 4.1. Список конгенных инбредных линий мышей с указанием варианта гаплотипа *H2*-комплекса и МНС принадлежности [25]

Линия мышей	Гаплотип <i>H-2</i>	Родительская основа	Происхождение <i>H2</i>
A	a	A	d
A.BY	b	A	Brackyury
A.CA	f	A	Caracal
A.SW	s	A	Swiss
BALB/c	d	BALB/c	BALB/c
BALB.B	b	BALB/c	C57BL/10

Линия мышей	Гаплотип <i>H-2</i>	Родительская основа	Происхождение H2
BALB.K	k	BALB/c	C3H
B6.AKR-H-2k	k	C57BL/6	AKR
B6.SJL	s	C57BL/6	SL
B10	b	C57BL/10	C57BL/10
B10.A	a	C57BL/10	A
B10.D2	d	C57BL/10	DBA/2
B10.M	f	C57BL/10	Outbred
B10.BR	k	C57BL/10	C57BR
B10.SM	v	C57BL/10	SM
B10.RIII	r	C57BL/10	RIII
B10.PL	u	C57BL/10	PL/J
C3H	k	C3H	C3H
C3H.SW	b	C3H	Swiss
C3H.JK	j	C3H	JK
C3H.NB	p	C3H	NB
D1.C	d	DBA/1	BALB/c
D1.LP	b	DBA/1	LP

Мыши очень удобны для выведения генетически разнообразных линий из-за относительно невысокой стоимости самих животных и их содержания, высокой плодовитости, короткого срока беременности (21–22 дня). К этим естественным преимуществам добавляются высокий уровень изученности их генетики и геномики, иммунного ответа, биохимии, а также бесконечное разнообразие имеющихся на рынке реактивов и антител против разнообразных антигенов и маркеров.

Механизмы иммунного ответа и эффективность вакцинации

В качестве единственной противотуберкулезной вакцины BCG одобрена для профилактики ТБ в 150 странах мира [29]. Вакцина BCG предотвращает развитие ТБ у младенцев, но менее эффективна

в предотвращении заболевания легких у подростков и практически не эффективна против легочного ТБ у взрослых [2, 5, 16, 23]. Различная эффективность вакцины BCG в разных географических регионах усложняет ее использование [8]. Низкая эффективность BCG в профилактике ТБ у взрослых объясняется многими факторами, включая генетику человека, воздействие микобактерий окружающей среды, ко-инфекций вирусами или паразитами и, что немаловажно, социально-экономическими и пищевыми условиями [18]. Также переменная эффективность вакцинации может объясняться генетической вариабельностью среди разных штаммов вакцины BCG [7].

Хотя разработка более эффективных противотуберкулезных вакцин является важным направлением исследований, мы во многом не понимаем, по какому именно механизму идет развитие защитного иммунного ответа против ТБ [18]. Что же касается моделирования вакцинации и инфекции на животных, модель ТБ у приматов близка к клинической ситуации [3, 10], но и у модели на мышах, помимо стоимости и удобства работы, есть одно преимущество перед другими моделями – наличие разнообразных инбредных линий, каждая из которых представлена генетически идентичными особями. Используя генетически однородных хозяев и возбудителей, мы получаем минимальные случайные отклонения, что незаменимо для установления механизмов биологических процессов.

M. tuberculosis, как все бактериальные внутриклеточные патогены, стремится выжить и размножиться в фагосомах зараженной клетки. Было показано, что фагосомы дендритных клеток и макрофагов, в которых содержатся вирулентные *M. tuberculosis*, быстро сливаются с лизосомами. Уже через сутки после заражения у клеток, которые содержат патоген и не ушли в апоптоз, нарастает переход *M. tuberculosis* из фагосом в цитозоль. Процесс перехода зависит от секреции микобактериями гликопротеинов CFP-10 и ESAT-6, компонентов секреторной системы ESX-1, которые представляют собой типичные секреторные факторы вирулентности. При этом данные продукты не токсичны для клеток хозяина, что приводит в конечном

итоге к блокировке запуска апоптоза через митохондриальный путь активации [11]. После выхода в цитозоль *M. tuberculosis* размножаются в условиях сильно сниженного давления со стороны клетки хозяина, что через неделю приводит к гибели клетки по некротическому механизму [27]. BCG не имеет локуса *esx-1*, что обеспечивает достаточное ослабление вирулентности по сравнению с *M. tuberculosis*, чтобы использовать BCG в качестве вакцины.

Вскоре после введения BCG со стороны организма хозяина происходит активация реакций врожденного иммунитета, вызванная набором специфических молекул, характерных для клеточной стенки микобактерий: пептидогликаны, арабиногалактан и миколовые кислоты, которые взаимодействуют с TLR и другими рецепторами врожденного иммунитета [26]. Резидентные макрофаги начинают выделять провоспалительные цитокины. При анализе клеточного инфильтрата в месте вакцинации выявляются преимущественно нейтрофилы, а также лимфоциты и моноциты [17]. Макрофаги и ДК, захватившие BCG, транспортируются в лимфатические узлы, где происходит антиген-зависимая активация Т-клеток CD4⁺ и CD8⁺ [18].

Влияние путей введения вакцины на ее эффективность вызывает много споров. Аэрозольное введение вакцины BCG дает много преимуществ перед подкожным введением, так как вакцина попадает непосредственно в орган, который и поражается при легочном заболевании. Предварительный контакт ткани органа с низко вирулентной культурой приводит к более выраженному ограничению поражения ткани и не допускает выход патогена в другие органы, в частности в селезенку [19, 20]. Исследование фенотипов антиген-специфических Т-клеток памяти показало, что индуцированные вакцинацией популяции Т-клеток CD4⁺ и CD8⁺ в основном имеют фенотип клеток центральной памяти (TCM) и переходной эффекторной памяти (TransEM) и что частота TCM и TransEM в популяции CD8⁺ была значительно выше у животных, вакцинированных BCG через дыхательные пути [28]. Патология легких зараженных животных была значительно умереннее у вакцинированных животных по сравнению

с контрольной группой, а внелегочная патология была значительно снижена у животных, вакцинированных аэрозолем BCG по сравнению с группой, иммунизированной подкожно [28]. Таким образом, аэрозольная вакцинация BCG может оказаться эффективнее подкожного введения.

Обсуждаются также внутривенная вакцинация и ее сравнительная эффективность. Например, есть данные, что аэрозольная иммунизация BCG усиливала продукцию IFN- γ , но эта продукция была значительно отложена по сравнению с внутривенной вакцинацией. При внутривенном введении также быстрее происходило накопление секретируемых про-воспалительных цитокинов и хемокинов и было выше количество антиген-специфических Т-клеток CD4⁺ и CD8⁺, так что не исключено, что эффективность внутривенной вакцинации еще выше, чем аэрозольной [6, 13].

Задачи исследования

В нашей работе мы изучали два разных фенотипа. Один из них – это отсутствие вакцинного эффекта BCG у мышей линии B10.M (H2^d). Второй – чрезвычайно высокая чувствительность к ТБ мышей линии B10.SM (H2^v). Обе линии отличаются от линии-прототипа B10 только по сегменту 17-й хромосомы, в которой находится комплекс H2. Важно отметить, что эффективность вакцинации BCG и чувствительность к ТБ во многих случаях наследуются независимо, в частности, высокая эффективность вакцинации BCG наблюдается у мышей чувствительной линии B10.SM [4], а отсутствие эффекта вакцинации BCG у мышей линии B10.M проявляется на фоне умеренной чувствительности к ТБ [1].

Хотя, по справочным данным, мыши B10.M и B10.SM отличаются от мышей B10 только участком 17-й хромосомы, эти линии были выведены во времена, когда генетическое картирование проводилось по отторжению трансплантатов кожи, то есть очень неточно. Поэтому первой задачей было точно определить границы перенесенного

на генетическую основу B10 участка генома в миллионах пар оснований (Mbp) с помощью методов современного генетического типирования.

Материалы и методы

Подбор маркеров

Для типирования потомства при скрещивании инбредных линий и генетического картирования определяют либо одно-нуклеотидный полиморфизм (SNP), либо простые полиморфизмы длины последовательности (SSLP или MIT-маркеры), хромосомная плотность которых намного выше, чем плотность морфологических и биохимических маркеров. Как правило, для большинства пар линий полиморфны от сотен до тысяч маркеров (база данных Ensembl [14]).

Экспериментальные животные

Для работы использовались следующие инбредные линии мышей: B10.M/SnEgYCit (H2f), B10.SM/SnEgYCit (H2v) и B10/SnEgYCit (H2b). Данные линии поддерживаются братско-сестринскими скрещиваниями в питомнике ФГБНУ «ЦНИИТ» в обычных условиях, с доступом к корму и воде *ad libitum*. Использовались самки массой 20–22 г в начале эксперимента.

Генетическое типирование

Определение генетических полиморфизмов внутри сегмента хромосомы 17, включающего комплекс H2 и прилежащие области, проводили методом ПЦР для маркеров Mit. Праймеры для определения Mit были взяты из открытой базы данных. Проводилось пробное типирование мышей B10, B10.M и B10.SM, и для следующей работы отбирались те маркеры, которые давали четкие отличия по размеру ПЦР-продуктов при электрофорезе в 4%-ном агарозном геле.

Культуры микобактерий, вакцинация и заражение

В работе использовали *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (МБТ) из коллекции лаборатории иммуногенетики ФГБНУ «ЦНИИТ». Подготовка культур и заражение мышей в аэрозольной камере GlasCol (США) описаны ранее [21, 22]. *M. bovis* BCG, штамм *Pasteur*, из коллекции лаборатории иммуногенетики ФГБНУ «ЦНИИТ» размножали в жидкой среде Дюбо и хранили аликвотами по 108 КОЕ/мл при -70°C . Мышей вакцинировали однократно 5×10^7 BCG в 0,2 мл физиологического раствора с 0,005% Tween 20 подкожно в холку.

Определение количества МБТ и BCG в органах

Стерильно выделяли легкие и селезенки зараженных и/или вакцинированных животных, гомогенизировали в 2 мл физиологического раствора, а затем готовили серийные десятикратные разведения гомогенатов органов и высевали на чашки Петри с агаром Дюбо (Difco, США) по 50 мкл на чашку. Чашки инкубировали при 37°C , через 21 день подсчитывали количество колоний на чашке и пересчитывали их количество на орган (КОЕ/орган).

Приготовление суспензий клеток селезенки, лимфоузлов и легких

Методика приготовления суспензий клеток детально описана в более ранних работах из нашей лаборатории [14]. Для работы с первичными культурами клеток легкого, лимфоузлов или селезенки выделенные клетки помещали в среду для культивирования (RPMI-1640, содержащая 5% FCS, 1 mM пируват, 4 mM L-глутамат, 50 мкг/мл смеси антибиотиков стрептомицина и пеницилина, 5×10^{-5} M β -меркаптоэтанол, 10 mM HEPES, все компоненты производства HiClone, Logan, UT, USA).

Анализ продукции IFN- γ проводили в супернатантах культур клеток селезенки, лимфоузлов или легких после 72-часовой инкубации при 37°C и 5% CO₂ методом ELISA с использованием набора DuoSet

ELISA Development kit (DY485) и с соблюдением всех рекомендаций фирмы производителя (R&D).

Приготовление гистологических срезов и окрашивание препаратов

Для определения степени воспаления и других патологических изменений в легких у исследуемых мышей большую долю легкого замораживали в режиме температурного градиента от -60°C до -20°C в течение 10 минут в электронном криотоме (ThermoShandon, Великобритания). Получали срезы толщиной 8–10 мкм. Срезы высушивали на воздухе, фиксировали в этаноле и окрашивали гематоксилином и эозином.

Статистическая обработка результатов

Полученные данные обрабатывали с помощью программы GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc.) по методам корреляционного и вариационного анализа (ANOVA) и критерия Манна – Уитни. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Вакцинация BCG

С помощью методов прямой генетики мы провели следующую работу:

- 1) определили точные размеры перенесенного участка генома на генетическую основу линии B10;
- 2) охарактеризовали тип наследования изучаемых фенотипов;
- 3) получили первую серию рекомбинантных линий с вставками гаплотипа $H2^f$ в 17-ю хромосому генетической основы B10.

Для решения вопроса о типе наследования фенотипа «отсутствие эффекта вакцинации» были получены гибриды первого поколения

F1 при скрещивании двух родительских линий В10 и В10.М. Мы исследовали тип наследования в гибридах (В10 × В10.М) F1, сравнивая сроки выживания при первичном заражении и при заражении животных, вакцинированных BCG. Предполагалось, что комбинация между гаплотипами $H2^b$ и $H2^f$ приведет либо к доминированию «полноценного» варианта $H2^b$, либо к проявлению эффекта, подобного гетерозису у гибридов F1. Это генетическое исследование подтвердило, что восприимчивость к первичной инфекции и эффективность вакцинации BCG – это признаки с независимым наследованием. В то время как у не вакцинированных мышей В10 и В10.М оказались одинаковые сроки выживания после заражения и гибридный эффект гетерозиса обнаруживался у гибридов F1, картина у вакцинированных животных была другой. Как и в предыдущих исследованиях, вакцина BCG продлевала срок жизни мышам В10, но не В10.М и, неожиданно, не гибридам F1. Такой эффект соответствует модели доминирования «дефектного» аллеля $H2^f$ и заставляет предполагать существование какого-то специфического активного механизма, мешающего распознаванию вакцины мышам генотипа $H2^f$. Мы собираемся исследовать это явление после получения новых мышей с четко установленной генетической структурой участка $H2^f$.

Высокая чувствительность к туберкулезной инфекции

Вторая часть представленной здесь работы посвящена изучению фенотипа чувствительности животных при первичном заражении ТБ, но уже в паре линий мышей В10 и В10.М. При работе с мышами линии В10.М было показано, что эта линия проявляет очень высокую чувствительность к туберкулезной инфекции. Линия В10.М очень мало изучена и на данный момент ведется в племенном разведении только в нашей виварии, так как в лаборатории Jackson [31] эта линия находится в виде замороженных эмбрионов. Для более подробного описания фенотипа данной линии мы заразили животных

аэрозольно разными дозами микобактерий. В модели более острой инфекции (доза 600 КОЕ/мышь) мы обнаружили распадение всей группы на более чувствительную и менее чувствительную подгруппы. Это феномен может быть связан с тем, что изначально (в 40-е годы прошлого века) гаплотип *H2^v* был перенесен на генетическую основу B10 в составе такого большого участка хромосомы 17, что мог нести не один, а несколько генов, влияющих на чувствительность к туберкулезной инфекции. Снижение дозы микобактерий при аэрозольном заражении приводило к более однородной реакции, и фенотип в таких условиях оставался однородным. Размножение микобактерий в легких и продукция INF- γ клетками легких полностью соответствовали данным, которые были получены по выживаемости животных этих двух линий.

При изучении влияния генетики хозяина на течение инфекционного процесса очень важно знать, каким является тип наследования гена-кандидата или генов-кандидатов, если их несколько. Чтобы ответить на этот вопрос, мы заразили гибридов первого поколения F1 между двумя родительскими линиями B10 и B10.SM. По предварительным данным можно сказать, что тип наследования промежуточный, то есть при анализе такого фенотипического проявления, как выживаемость после первичного заражения МБТ, среднее значение по времени выживаемости у гибридов первого поколения F1 находится между значениями родительских линий. Следовательно, в данном случае имеет место наследование по типу неполного доминирования. Такой тип наследования проявляется и в случае других фенотипических проявлений этих групп, таких как размножение микобактерий в легких и выработка INF- γ клетками легких в ответ на антигены МБТ.

Тот же результат удалось подтвердить и в опытах с гибридами второго поколения F2, где был получен промежуточный фенотип при гетерозиготном варианте *v/b*. На данный момент необходимо набрать большую выборку животных, чтобы подтвердить все вышеперечисленные результаты.

В процессе длительного выведения линий происходит накопление спонтанных мутаций, которые могут оказаться в важных участках генома и приводить к изменению изначального фенотипа данной линии, несмотря на соблюдения всех правил выведения чистых линий в вивариях. Линии В10 и В10.SM ведутся отдельно более 80 лет, и вполне возможно, что они накопили различные спонтанные мутации, создающие различия не только по комплексу *H2*, но и по другим участкам генома. Мы провели дополнительные возвратные скрещивания с родительской линией В10 с последующим отбором именно животных с генотипом $H2^{v/v}$. Это дало возможность проверить, не была ли связана высокая чувствительность к ТБ с накопившимися мутации за пределами *H2*-области. После аэрозольного заражения ТБ группы у мышей из «старой» и «новой» линий В10.SM кривые выживаемости полностью совпали. Следовательно, искомым ген (или гены) действительно находятся именно в области *H2*.

Имея данные о возможном влиянии комплекса *H2* на эффективность вакцинации BCG, описанные выше, а также стремясь более полно описать фенотип линии В10.SM, мы провели вакцинацию животных вакциной BCG. Полученные данные свидетельствуют о том, что животные хорошо вакцинируются (данные по срокам выживания, динамике развития кахексии и КОЕ микобактерий в легких). Мыши В10.SM сверхчувствительны к ТБ, что может помочь в изучение разброса реакции на туберкулезную инфекцию в человеческой популяции.

Выводы

1. У мышей гаплотипа $H2^f$ многократно подтвержден фенотип неэффективности вакцинации BCG.
2. Пути введения вакцины BCG не влияют на этот фенотип.
3. Гаплотип $H2^v$ определяет очень высокую чувствительность к туберкулезной инфекции.

4. Наследование чувствительности к инфекции идет по типу неполного доминирования.
5. Возвратные скрещивания мышей В10.SM на родительскую линию В10 показывают, что регулирующий элемент находится в области *H2* 17-й хромосомы.
6. Мыши *H2^v* эффективно вакцинируются BCG, что подтверждает независимый характер наследования эффективности вакцинации и восприимчивости к первичному заражению.

Литература

1. Коротецкая М.В., Байкузина П.Г., Апт А.С. Неэффективность вакцины BCG для защиты от туберкулезной инфекции у мышей линии В10.М (H2f). *Туберкулез и болезни легких*, 2019;97(7):48–55.
2. Abubakar I., Pimpin L., Ariti C. et al. Systematic review and meta-analysis of the current evidence on the duration of protection by bacillus Calmette-Guerin vaccination against tuberculosis, *Health Technol Assess*, 2013;17(37):1–372.
3. Ahmed M., Thirunavukkarasu S., Rosa B.A. et al. Immune correlates of tuberculosis disease and risk translate across species. *Sci Transl Med*, 2020;12(528): eaay0233.
4. Apt A.S., Avdienko V.G., Nikonenko B.V. et al. Distinct H-2 complex control of mortality, and immune responses to tuberculosis infection in virgin and BCG-vaccinated mice. *Clinical & Experimental Immunology*, 1993;94(2)322–329.
5. Colditz G.A., Brewer T.F., Berkey C.S. et al. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *JAMA*, 1994;271(9):698–702.
6. Darrah P.A., Zeppa J.J., Maiello P. et al. Prevention of tuberculosis in macaques after intravenous BCG immunization, *Nature*, 2020;577(7788):95–102.

7. *Dockrell H.M., Smith S.G.* What have we learnt about BCG vaccination in the last 20 years? *Frontiers in immunology*, 2017;8:1134.
8. *Fine P.E.* Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet*, 1995;346(8986):1339–1345.
9. *Flurkey K., Curren J.M., Leiter E.H., Witham B.* The Jackson Laboratory Handbook on Genetically Standardized Mice. Bar Harbor: The Jackson Laboratory, Sixth Edition, 2009, 396 p.
10. *Flynn J.L., Gideon H.P., Mattila J.T., Lin P.L.* Immunology studies in non-human primate models of tuberculosis. *Immunol Rev*, 2015;264(1):60–73.
11. *Gröschel M.I., Sayes F., Simeone R. et al.* ESX secretion systems: mycobacterial evolution to counter host immunity. *Nature Reviews Microbiology*, 2016;14(11):677–691.
12. *Koller B., Smithies O.* Altering genes in animals by gene targeting. *Ann Rev Immunol*, 1992;10:705–730.
13. *Larson E.C., Ellis-Connell A.L., Rodgers M.A. et al.* A Vaccination with intravenous BCG protects macaques with pre-existing SIV infection from tuberculosis. *The National Library of Medicine*. 2023; rs.3.rs-2802306, pre-print.
14. *Lyadova I.V., Eruslanov E.B., Yeremeev V.V. et al.* Comparative analysis of T lymphocytes recovered from the lungs of mice genetically susceptible, resistant, and hyperresistant to Mycobacterium tuberculosis – triggered disease. *J Immunol*, 2000;165(10):5921–5931.
15. *Mak T.W., Penninger J.M., Ohashiet P.S.* Knockout mice: a paradigm shift in modern immunology. *Nature Rev Immunol*, 2001;1(1):11–19.
16. *Mangtani P., Abubakar I., Ariti C. et al.* Protection by BCG vaccine against tuberculosis: a systematic review of randomized controlled trials. *Clin Infect Dis*, 2014;58(4):470–480.
17. *Minassian A.M., Satti I., Poulton I.D. et al.* A Human Challenge Model for Mycobacterium tuberculosis Using M ycobacterium bovis Bacille Calmette-Guérin. *Journal of Infectious Diseases*, 2012;205(7):1035–1042.

18. *Moliva J.I., Turner J., Torrelles J.B.* Immune responses to bacillus Calmette–Guérin vaccination: why do they fail to protect against *Mycobacterium tuberculosis*? *Frontiers in immunology*, 2017;8:407.
19. *Nagpal P.S., Kesarwani A., Sahu P., Upadhyay P.* Aerosol immunization by alginate coated mycobacterium (BCG/MIP) particles provide enhanced immune response and protective efficacy than aerosol of plain mycobacterium against *M.tb. H37Rv* infection in mice. *BMC Infect Dis*, 2019;19(1):568.
20. *Nuermberger E.L., Yoshimatsu T., Tyagi S.* Paucibacillary Tuberculosis in Mice after Prior Aerosol Immunization. *Infection and Immunity*, 2004;72(2):1065–1071.
21. *Radaeva T.V., Kondratieva E.V., Sosunov V.V. et al.* A human-like TB in genetically susceptible mice followed by the true dormancy in a Cornell-like model. *Tuberculosis*, 2008;88(6):576–585.
22. *Radaeva T.V., Nikonenko B.V., Mischenko V.V. et al.* Direct comparison of low-dose and Cornell-like models of chronic and reactivation tuberculosis in genetically susceptible I/St and resistant B6 mice. *Tuberculosis*, 2005;85(1–2):65–72.
23. *Roy A., Eisenhut M., Harris R.J. et al.* Effect of BCG vaccination against *Mycobacterium tuberculosis* infection in children: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, 2014;349:4643.
24. *Snell G.D.* “Congenic Resistant Strains of Mice” in *Origins of Inbred Mice*. New York: Morse HE III Academic Press, 1978.
25. *Sykes M., Auchincloss H. Jr., Sachs D.H.* *Fundamental Immunology*. Chapter 47 Transplantation Immunology. LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, 5th edition, 2003.
26. *Tsuji S., Matsumoto M., Takeuchi O. et al.* Infection and immu Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette–Guerin: involvement of toll-like receptors. *Infection and immunity*, 2000;68(12):6883–6890.

27. *van der Wel N., Hava D., Houben D. et al.* M. tuberculosis and M. leprae translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell*. 2007;129:1287–1298.
28. *White A.D., Sarfas Ch., Sibley L.S.* Protective Efficacy of Inhaled BCG Vaccination Against Ultra-Low Dose Aerosol M. tuberculosis Challenge in Rhesus Macaques. *Pharmaceutics*, 2020;12(5):394.
29. WHO Global Tuberculosis Report 2021–2022 г.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФ № 23–14–00030.

5. Актуальные представления о таксономии, экологии и эпидемиологии нетуберкулезных микобактерий

Смирнова Т.Г., Андреевская С.Н., Ларионова Е.Е., Черноусова Л.Н.

История открытия и таксономическая иерархия нетуберкулезных микобактерий

К нетуберкулезным микобактериям (НТМБ) в настоящее время относятся около 200 видов кислотоустойчивых палочек, объединенных определенными биологическими свойствами. История открытия НТМБ как причины инфекционных заболеваний уходит во вторую половину XIX века. В 1860 году была впервые описана болезнь цыплят с признаками, похожими на ТБ человека. Официально годом открытия НТМБ можно считать 1873 год, когда норвежский врач Герхард Хансен описал возбудителя проказы *Mycobacterium leprae* [12]. После 1882 года, ознаменовавшегося великим открытием самого яркого представителя рода *Mycobacterium* Робертом Кохом, сообщения о существовании других видов микобактерий публиковались и докладывались учеными-микробиологами регулярно:

- 1899 год – описан вид *Mycobacterium phlei*;
- 1901 год – описан вид *Mycobacterium avium*;
- 1923 год – описан вид *Mycobacterium paratuberculosis*;
- 1949 год – описан вид *Mycobacterium intracellulare*;
- 1953 год – описан вид *Mycobacterium abscessus*;
- 1955 год – описан вид *Mycobacterium kansasii*;
- 2001 год – описан вид *Mycobacterium heckeshornense*;
- 2004 год – описан вид *Mycobacterium chimaera* и др.

После разработки и внедрения в повседневную практику секвенирования этот метод стали широко применять для идентификации до вида возбудителей различных заболеваний и начался настоящий бум по открытию новых видов НТМБ, а также уточнению названий уже существующих видов НТМБ.

Современная таксономическая иерархия НТМБ

Таксономическая иерархия, объединяющая все виды микобактерий в один род *Mycobacterium* согласно [45, 53, 54] и действовавшая до 2018 года, представлена в таблице 5.1.

В 2018 году было опубликовано большое исследование канадских ученых, касающееся изучения филогеномики микобактерий [20]. Используя современные методы биоинформатики, авторы проанализировали геномы более чем 188 видов микобактерий, внесенных к 2018 году в международную базу NCBI, и пришли к выводу, что род *Mycobacterium* не так однороден, как было принято считать ранее, а виды микобактерий формируют 5 близкородственных линий: *Tuberculosis-Simiae*, *Terrae*, *Triviale*, *Fortuitum-Vaccae* и *Abscessus-Cheloniae*. По результатам исследования авторы предложили полностью пересмотреть таксономию микобактерий и выделить в семействе *Mycobacteriaceae* не один род, а пять. К роду *Mycobacterium* авторы отнесли членов МБТК, *M. leprae* и все остальные медленнорастущие НТМБ, а быстрорастущие виды распределились по четырем новым родам: род *Mycobacteroides* включил *M. abscessus* с подвидами, *M. chelonae*, *M. immunogenum* и пр., род *Mycolicibacterium* объединил *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. smegmatis*, *M. mucogenicum* и др., в род *Mycolicibacillus* вошли *M. trivialis*, *M. koreensis*, *M. parakoreensis*, род *Mycolicibacter* включил почвенных сапрофитов *M. terrae*, *M. arupense*, *M. heraclionense* и др. На рисунке 5.1. представлена схема новой таксономической иерархии микобактерий.

Таблица 5.1. Таксономия рода *Mycobacterium* (до 2018 года)

Домен	<i>Bacteria</i>		
Тип	<i>Actinobacteria</i>		
Класс	<i>Actinobacteria</i>		
Порядок	<i>Mycobacteriales</i>		
Семейство	<i>Mycobacteriaceae</i>		
Род	<i>Mycobacterium</i>		
Вид	Микобактерии туберкулезного комплекса	<i>M. tuberculosis, M. bovis, M. bovis BCG, M. africanum, M. canetti, M. microti, M. caprae, M. pinnipedii, M. suricattae, M. mungi, M. dassie, M. oryx</i>	
		<i>M. leprae</i>	
	Нетуберкулезные микобактерии	медленно-растущие	<i>M. avium, M. intracellulare, M. chimaera, M. colombiense, M. yongonense, M. paraintracellulare, M. gordonae, M. paragordonae, M. kansasii, M. xenopi, M. simiae, M. heckeshornense, M. interjectum, M. intermedium, M. lentiflavum</i> и др.
	быстро-растущие	<i>M. abscessus group, M. chelonae, M. fortuitum, M. parafortuitum, M. peregrinum, M. smegmatis, M. terrae, M. arupense, M. trivialis, M. mucogenicum, M. immunogenum, M. phlei, M. diernhoferi</i> и др.	
			Туберкулез
			Лепра (проказа)
			Инфекции, вызванные нетуберкулезными микобактериями (микобактериоз)

Вышедшая статья удовлетворяла всем критериям, по которым осуществляется пересмотр названий видов и родов микроорганизмов, поэтому в настоящее время идет переименование видов в международных базах данных бактериальных геномов и белков, а также и в других открытых источниках. Необходимо отметить, что внесение изменений в таксономию микобактерий пока приносит больше вреда для клиницистов, чем пользы, так как клиническое определение

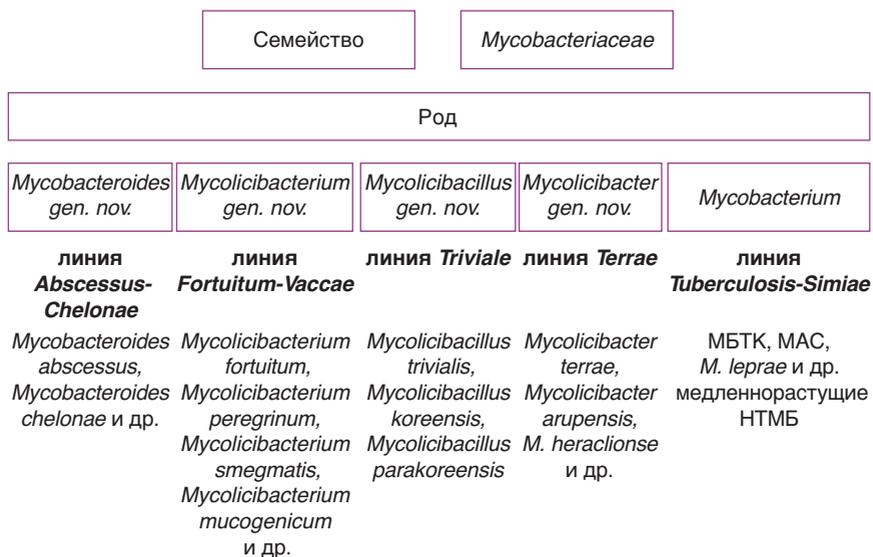


Рисунок 5.1. Новая таксономическая иерархия семейства *Mycobacteriaceae* (согласно Gupta R.S. et al., 2018) [20].

заболевания, вызванного кислотоустойчивыми палочками, подразумевает определение возбудителей как НТМБ, тогда как по новой классификации некоторые возбудители, часто вызывающие патологические процессы у человека и животных, более не являются микобактериями в принципе (например, *Mycobacteroides abscessus*). Поэтому работа Gupta R.S. [20] вызвала неоднозначный и скорее негативный отклик среди известных ученых, занимающихся не только фундаментальными исследованиями в области генома микобактерий, но имеющих непосредственное отношение к изучению распространения и лечению инфекций, вызванных НТМБ. Вышли комментарии к статье с указанием ошибок авторов в отнесении тех или иных видов НТМБ к быстрорастущим и медленнорастущим [59]. В статье, вышедшей в 2019 году, ряд ученых, признав правильность выводов, форму представления результатов и оценив огромную работу, сделанную Gupta R.S. с коллегами, тем не менее призвали мировое сообщество игнорировать новые названия видов НТМБ. Они объяснили

это путаницей, которая немедленно возникла среди врачей-практиков в постановке точного диагноза пациентам [60]. В статье указывается, что НТМБ – не обычные бактерии, изучение их свойств имеет не столько фундаментальный, сколько практический интерес, так как они являются возбудителями хронического, трудно поддающегося излечению смертельного заболевания, имеющего схожие симптомы. В конце статьи авторы призвали лабораторных работников и врачей игнорировать новые названия НТМБ, так как это не нарушает правила номенклатуры прокариот, согласно которому можно использовать любое валидное название микроорганизма, когда-либо зафиксированное в официальной номенклатуре [25, 59, 60]. В 2021 году вышла еще одна работа, призывающая вернуть старую номенклатуру рода *Mycobacterium* [46], в которой авторы также ссылались на правило наименования вновь открытых видов, запрещающее присвоение имен, способных причинить какой-либо вред, а также были приведены данные, доказывающие, что из всех вновь выделенных Gupta R.S. родов на самостоятельное существование может претендовать только *Mycobacteroides*.

Далее по тексту нами будет использована старая номенклатура семейства *Mycobacteriaceae* [38, 53, 54].

Среда обитания нетуберкулезных микобактерий

Все без исключения виды НТМБ являются факультативными паразитами, то есть их естественная экологическая ниша – это внешняя среда, но при этом они прекрасно могут размножаться в других живых организмах – людях, животных и даже простейших [27, 51]. Микобактерии встречаются повсеместно, но наибольшее разнообразие их обнаружено в местах, где присутствует вода. В природе это различные водоемы – пруды, озера, реки, дождевая и талая вода, а также морская и океаническая вода (некоторые виды НТМБ, например *M. marinum*, способны выживать при концентрации NaCl в воде более

3% [27, 24]). Кроме воды, НТМБ были найдены в земле и пыли, включая угольную пыль. Опасность получить заболевание легких имеют работники сельского хозяйства, шахтеры, строители (при копке котлованов и траншей, прокладывании подземных тоннелей). Источниками инфекции могут служить и дикие животные. НТМБ были причиной заболеваний млекопитающих (олений, лосей, антилоп, кабанов, слонов) [17, 18, 19]. Дикие птицы также могут служить источниками инфекции НТМБ [61]. НТМБ способны размножаться и в холоднокровных животных, например в пресмыкающихся (крокодилах и морских черепахах) [44, 45], земноводных [17], рыбах [21], моллюсках [39]. НТМБ были выделены из насекомых. В исследовании [52] авторы выявили *M. avium*, *M. gordonae* и *M. kansasii* из тараканов, в работе [31] исследователи доложили о выявлении *M. gordonae*, *M. kumamotoense*, *M. terrae*, *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. intracellulare*, *M. peregrinum* и *M. triplex* из паутины пауков, обитающих в карстовых пещерах Чехии. Домашние животные также являются резервуаром для заражения человека НТМБ, профессиональные риски имеют работники сельского хозяйства и жители сельской местности. Молекулярно-генетические исследования показали, что в европейской части земного шара высока вероятность заражения *M. avium* сотрудников ферм от свиней, тогда как для Японии практически все случаи заражения человека *M. avium* вызваны использованием старых душевых леек, джакузи или водных небулайзеров [11, 33]. Особую опасность для человека представляют микобактерии, размножающиеся в трубах водоснабжения жилых домов, включая магистральные трубопроводы [13, 33]. Самым распространенным путем заражения легочными инфекциями, вызванными *M. avium*, признан аэрозольный из-за вдыхания микобактериальных клеток, присутствующих в каплях воды, взвешенных в воздухе душевых кабин или ваннных комнат при использовании душевых леек или джакузи [10, 55]. НТМБ также были найдены в жилых домах в тех местах, где подолгу находится вода: например, в карбоновых фильтрах для очистки водопроводной воды, включая фильтры, импрегнированные серебром [23].

M. avium в высоких титрах обнаруживали в домашней пыли и кондиционерах в местах проживания пациентов с поражениями лимфатических узлов [34]. *M. avium* также находили в сыром мясе и слабосоленой рыбе [42]. Кроме того, в большом исследовании [15] живые клетки *M. avium* были обнаружены в табаке, фильтрах и сигаретной бумаге сигарет четырех известных производителей. Причем после выкуривания сигарет клетки *M. avium* продолжали сохранять свою жизнеспособность в сигаретных фильтрах. *M. chelonae* может стать причиной заболеваний кожи после посещения тату-салонов – микобактерии этого вида были найдены в воде для разведения татуировочных чернил [49].

Кроме приведенных исследований существует множество работ, доказывающих нахождение НТМБ в окружающей человека среде и связанные с этим случаи заболеваний микобактериальной природы не только у пациентов с иммунодефицитами, но и иммунокомпетентных людей.

Эпидемиология инфекций, вызванных НТМБ

Заболеваемость микобактериозом в мире неуклонно растет. Это связано с многими факторами: совершенствованием лабораторной базы, всплеском интереса ученых к НТМБ, внедрением новых методов ускоренного выявления и видовой идентификации НТМБ, основанных на ПЦР, а также повышением настороженности врачей в отношении этих инфекций. Из общих причин, способствующих возрастанию случаев заболеваемости микобактериозом, называют ухудшение экологической обстановки на планете, снижение иммунитета у населения и появление во второй половине XX века такого заболевания, как СПИД. Кроме того, существует теория, что в тех странах, где снижается бремя ТБ, освобождающуюся экологическую нишу начинают занимать другие виды микобактерий [16, 32]. Надо отметить, что заболеваемость инфекциями, вызванными НТМБ, возрастает и в странах, где отмечается также и рост заболеваемости ТБ,

например в странах Азии [36]. Несмотря на рост заболеваемости микобактериозами, эпидемиологическим исследованиям инфекций, вызываемых НТМБ, до сих пор уделяется недостаточно внимания. В немногих странах ведутся национальные регистры пациентов с микобактериозом. Наиболее изученным в плане распространения НТМБ в человеческой популяции считается Европейская часть земного шара. Заболеваемость микобактериозом в 2020 году в Европе в среднем составила 6,2 случая на 100 000 населения [57]. Исследователи отмечают, что уровень распространения заболеваний, связанных с НТМБ, в Европе гораздо ниже, чем в Азии и на Американском континенте [57]. В качестве основного патогена, вызывающего легочные формы заболевания, на территории Европы, доминируют члены МАС (*M. avium*, *M. intracellulare*) [28]. Сведения о частоте встречаемости видов НТМБ в различных странах приведены в таблице 5.2.

Таблица 5.2. Преваляирование различных видов НТМБ в странах мира (Nontuberculous Mycobacteria Network European Trials Group, <http://www.ntm-net.org/>)

Страна	Превалялирующие виды медленнорастущих НТМБ	Превалялирующие виды быстрорастущих НТМБ
Бельгия	МАС, <i>M. xenopi</i>	<i>M. fortuitum</i> , <i>M. abscessus-chelonae</i> complex
Франция	МАС, <i>M. gordonae</i>	<i>M. fortuitum</i>
Германия	МАС, <i>M. gordonae</i>	<i>M. fortuitum</i> , <i>M. abscessus-chelonae</i> complex
Дания	МАС, <i>M. gordonae</i>	<i>M. abscessus</i>
Норвегия	МАС, <i>M. gordonae</i>	<i>M. fortuitum</i> , <i>M. abscessus</i>
Швеция	МАС абс. лидер	<i>M. abscessus</i>
Финляндия	МАС, <i>M. gordonae</i>	<i>M. fortuitum</i> , <i>M. abscessus</i>
Австрия	МАС, <i>M. gordonae</i>	<i>M. fortuitum</i> , <i>M. abscessus</i>
Греция	МАС	<i>M. fortuitum</i> , <i>M. chelonae</i>
Италия	МАС, <i>M. gordonae</i>	<i>M. fortuitum</i> <i>M. abscessus-chelonae</i> complex

Страна	Преобладающие виды медленнорастущих НТМБ	Преобладающие виды быстрорастущих НТМБ
Испания	MAC, <i>M. gordonae</i>	<i>M. fortuitum</i>
Португалия	MAC, <i>M. gordonae</i>	<i>M. fortuitum</i> , <i>M. abscessus-chelonae</i> complex
Польша	<i>M. kansasii</i> , MAC, <i>M. xenopi</i>	<i>M. fortuitum</i> , <i>M. abscessus-chelonae</i> complex
Словакия	<i>M. kansasii</i> , MAC	<i>M. chelonae</i>
Венгрия	<i>M. xenopi</i> , MAC	<i>M. fortuitum</i>
Великобритания	<i>M. kansasii</i> , MAC	<i>M. fortuitum</i> , <i>M. abscessus-chelonae</i> complex
США	MAK, <i>M. kansasii</i>	<i>M. abscessus</i>
Канада	MAK, <i>M. xenopi</i>	<i>M. abscessus-chelonae</i> complex, <i>M. fortuitum</i>
Бразилия	MAK, <i>M. kansasii</i>	<i>M. fortuitum</i> , <i>M. abscessus-chelonae</i> complex
Великобритания	<i>M. kansasii</i> , MAC <i>M. malmoense</i>	<i>M. fortuitum</i> , <i>M. abscessus-chelonae</i> complex
Южная Корея	MAC, <i>M. kansasii</i>	<i>M. abscessus</i>
Китай	MAC, <i>M. kansasii</i> , <i>M. gordonae</i>	<i>M. abscessus</i>
Япония	MAC, <i>M. kansasii</i>	<i>M. abscessus</i>
Индия	MAC	<i>M. abscessus</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. fortuitum</i>
Таиланд	MAC	<i>M. abscessus</i>

НТМБ – нетуберкулезные микобактерии, MAC–**M.** *avium* complex

Во всех исследованиях, посвященных распространению НТМБ среди населения, эпидемиологи европейских стран отмечают неуклонный рост заболеваемости микобактериозом в последнее десятилетие. Например, пятилетнее исследование в Германии продемонстрировало рост заболеваемости с 2,3 до 3,3 случая на 100 000 [56]. Спектр видов НТМБ несколько различается в северных и южных странах Европы. Так, в северных странах (Дания, Норвегия, Германия,

Бельгия, Австрия) основную часть выделенных видов составляют медленнорастущие НТМБ. В странах южной Европы (Италия, Португалия, Греция) доля быстрорастущих НТМБ, выделенных от пациентов с микобактериозом, существенно выше [26]. Во всех странах Европы без исключения преобладающими видами являются члены МАС. В Чехии спектр видов НТМБ сильно не отличается от такового в странах центральной Европы (основными видами НТМБ, вызывающими микобактериоз у населения, были признаны *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii* и *M. xenopi* [47], Польша и Словакия характеризуются существенно более частым выделением от больных *M. kansasii* (35 и 36% соответственно). В Венгрии *M. xenopi* составила практически половину из всех выделенных видов – 49%. В Хорватии представители МАС составляют всего 10% от всех остальных видов НТМБ, а преобладающими видами являются *M. xenopi* и *M. gordonae* [26].

В Великобритании, одной из самых продвинутых стран, ведущей многочисленные эпидемиологические исследования по микобактериозу, имеющей свои рекомендации по лечению больных микобактериозом и национальный регистр больных микобактериозом [26], отмечается быстрый рост заболеваемости инфекциями, вызванными НТМБ: с 1995 по 2012 год заболеваемость микобактериозом возросла с 0,9 до 7,6 на 100 000 населения и достигла уровня заболеваемости ТБ [40]. Спектр медленнорастущих видов НТМБ, выявляемых от пациентов из Великобритании, включает в себя МАС, *M. kansasii*, *M. xenopi* и *M. malmoense* [14, 48].

В странах Азии за последние 10 лет также наблюдается рост числа случаев заболевания микобактериозом, даже на фоне растущей заболеваемости ТБ. Так, в Южной Корее с 2009 по 2015 год уровень заболеваемости микобактериозом повысился почти в два раза (с 6,8 до 12,9 на 100 000 населения), при этом заболеваемость ТБ тоже выросла с 86 до 95 на 100 000 [35]. Согласно данным этого же исследования, наиболее распространенными видами НТМБ в стране явились *M. intracellulare* (38,9%), *M. avium* (23,1%), *M. abscessus* (8,4%) и *M. kansasii* (7,7%).

Большое исследование, проведенное в 72 противотуберкулезных учреждениях 31 крупнейшей провинции Китая, показало, что 60% выделенных изолятов НТМБ относились к медленнорастущим, 40% – к быстрорастущим. Из медленнорастущих преобладали члены МАС, из быстрорастущих – *M. abscessus* [41]. В другом исследовании, длившемся с 2013 по 2018 год в крупном госпитале Пекина, были обследованы 1508 пациентов с подозрением на ТБ. Авторы отметили ежегодное возрастание доли выявления НТМБ. Превалирующими видами из медленнорастущих НТМБ были члены МАС (*M. intracellulare* (31,8%), *M. avium* (13,5%)), а также *M. gordonae* (11,7%) и *M. kansasii* (7,6%). Из быстрорастущих НТМБ наибольшее распространение получила *M. abscessus* [30].

В Японии, одной из немногих стран, проводящих официальные эпидемиологические исследования по заболеваемости микобактериозом, существует национальная статистика по этому заболеванию. В статье [50] описывается рост случаев микобактериоза, зарегистрированных в 884 госпиталях пульмонологического профиля. Глубина исследования составила 35 лет – с 1980 по 2015 год. Исследователи отмечают, что для разных видов НТМБ динамика роста заболеваемости была разной. Так, число заболеваний, вызванных *M. abscessus*, за исследуемый период увеличилось практически вдвое, а число случаев выявления *M. kansasii* у пациентов осталось стабильным. Среди видов НТМБ превалировали МАС, далее по частоте встречаемости шли *M. kansasii* и *M. abscessus*.

В странах Южной Азии с высоким бременем ТБ (Индия, Таиланд и др.) проводится не так много эпидемиологических исследований по выявлению распространенности НТМБ среди населения. Согласно [58] заболеваемость микобактериозом в Индии выросла с 0,9% (в 2001–2010 годах) до 1,6 (в 2011–2020 годах). Превалирующими видами можно считать МАС (19%), *M. chelonae* (10%), *M. fortuitum* (9,8%), *M. abscessus* (8,8%). В статье исследователей из Таиланда [36] были представлены данные по заболеваемости микобактериозом, а также показан видовой состав НТМБ, выделенных

из респираторных и экстрапульмонарных образцов материала от 150 пациентов, проживающих на севере Таиланда. Заболеваемость микобактериозом была прослежена в течение 5 лет (с 2012 по 2016 год) и оставалась приблизительно на одинаковом уровне – 3,7 на 100 000 населения. На первом месте по встречаемости была *M. abscessus*, далее следовали МАС.

Эпидемиологические исследования, касающиеся микобактериоза легких в Австралии, приводят данные о возрастании заболеваемости. Согласно отчетам Министерства народного здравоохранения, заболеваемость микобактериозом легких за пять лет (с 2012 по 2016 год) возросла с 17 до 27,5 случая на 100 000 населения [29]. Видовое разнообразие НТМБ в Австралии характеризуется абсолютным превалированием МАС (71% от всех выделенных видов НТМБ) [26].

Эпидемиологическая ситуация по микобактериозу в странах Северной Америки также имеет тренд к росту заболеваемости, которая в последние годы достигла 13,9 на 100 000 населения [37, 43]. Часто встречающиеся виды НТМБ в США – это МАС и *M. kansasii* – около 80% от всех выявляемых видов [26]. Штатами США с самым высоким уровнем заболеваемости инфекциями, вызванными НТМБ, являются Гавайи, Калифорния, Нью-Йорк, Луизиана, Пенсильвания, Флорида, Оклахома и Висконсин [9]. Так же, как и в Европе, северные и южные штаты отличаются по соотношению медленнорастущих и быстрорастущих видов НТМБ – в южных штатах число случаев выявления быстрорастущих НТМБ, в основном *M. abscessus*, выше, чем в северных [22].

Изучение распространения НТМБ на территории России велось еще в СССР несколькими группами ученых [3, 5]. В Центральном НИИ туберкулеза этой проблемой занималась Н.М. Макаревич. По ее данным, частота выделения НТМБ в различных регионах Советского Союза колебалась от 1 до 3,9% от общего числа выделенных культур [3].

В Российской Федерации распространению НТМБ среди населения начали уделять больше внимания в последние десять лет. Появились

статьи, описывающие спектр видов НТМБ, выделенных от пациентов с легочным и внелегочным микобактериозами. К сожалению, полную эпидемиологическую картину по распространению НТМБ в России пока составить невозможно. В работе [7] авторы проанализировали 745 культур НТМБ, полученных от пациентов с микобактериозом, проживающих на Северо-Западе России, за период 2012–2018 годы. Анализ показал превалирование *M. avium* (56,4%). В различных регионах были обнаружены особенности в спектре видов НТМБ, например, в Республике Коми преобладали *M. lentiflavum*, в Архангельской области – *M. gordonae*. В исследовании [4] показано, что в Оренбургской области наиболее часто встречающимися видами НТМБ являются МАС, *M. xenopi*, *M. gordonae*. В статье [6] представлен достаточно большой материал по распространению НТМБ среди населения отдельных регионов Российской Федерации. Были исследованы 1204 культуры НТМБ, выделенные на плотных и жидких питательных средах от 727 больных с подозрением на ТБ/микобактериоз, за период с 2011 по 2017 год. Всего было идентифицировано 17 видов НТМБ (11 видов относились к группе медленно-растущих и 6 – быстрорастущих). Преобладали медленно-растущие НТМБ (77,58%), а наиболее распространенным видом была *M. avium* (28,89%). Также встречались *M. gordonae* (13,62%), *M. intracellulare* (9,35%), *M. lentiflavum* и *M. fortuitum* (по 9,08%), *M. abscessus* (6,74%), *M. kansasii* (6,6%), *M. xenopi* (3,99%). Описаны региональные особенности встречаемости видов НТМБ. Было показано, что в Центральном федеральном округе (ЦФО), европейской части Приволжского федерального округа и г. Калининграде распределение видов НТМБ совпадало с европейским: превалирование МАС (33–39%), *M. gordonae* (10–20%) и *M. fortuitum* (5–13%). Спектр видов НТМБ, выделенных от пациентов из Москвы и Московской области, включал наибольшее число видов, что, вероятнее всего, было связано с большой выборкой. Совсем другое распределение видов НТМБ было показано для Перми и Сыктывкара, столиц смежных областей. Для этих регионов было характерным небольшое число случаев выявления *M. avium*

и превалирование *M. fortuitum*. В Ханты-Мансийске превалирующим видом НТМБ была *M. gordonae*, *M. avium* и другие МАС встречались существенно реже. В статье [1] описывается небольшая выборка пациентов (28 человек) из Московского региона с верифицированным диагнозом микобактериоза. Спектр видов НТМБ, выделенных от этих пациентов, совпадает со спектром видов НТМБ, выделенных от пациентов из ЦФО в исследовании [6]. Превалирующими были медленнорастущие НТМБ (22 случая), быстрорастущих видов было существенно меньше (6 случаев). Из медленнорастущих чаще всего встречались МАС, следом шли *M. kansasii* и *M. xenopi*. Из быстрорастущих были выделены *M. fortuitum* и *M. chelonae*. В другой статье тех же авторов, выпущенной одним годом позже, приводятся данные о 40 пациентах из Московского региона с микобактериозом и выделением НТМБ в респираторном диагностическом материале [2]. Частота встречаемости различных видов НТМБ не изменилась: МАС – 35%, *M. kansasii* – 25%, *M. xenopi* – 20%, *M. fortuitum* – 12,5% и *M. chelonae* – 7,5%. Еще одно исследование, проведенное в ФГБНУ «ЦНИИТ», в котором приведены данные о частоте выявления видов НТМБ, охватывает период с 2011 по 2014 год. В другом исследовании проанализировано 6240 историй болезни пациентов, находящихся на лечении в ФГБНУ «ЦНИИТ» с 2011 по 2014 год [8]. У 156 пациентов были выявлены НТМБ, что составило 2,5%. Спектр видов НТМБ выглядел следующим образом: превалировали медленнорастущие НТМБ (76,7%) – *M. avium* (39,2%), *M. kansasii* (12,5%), *M. intracellulare* (12,5%). Гораздо реже выявлялись быстрорастущие НТМБ (23,2%), из быстрорастущих основным видом являлся *M. abscessus* (17,8%).

В заключение необходимо отметить, что эпидемиологические исследования заболеваемости, смертности, распространения видов НТМБ ведутся недостаточно полно в ряде стран мира, включая и Российскую Федерацию. Отсутствие национальных регистров пациентов с инфекциями, вызванными НТМБ, крайне затрудняет сбор статистических данных и прогнозирование распространения заболевания. Необходим комплексный подход к решению

проблемы – от совершенствования клинико-лабораторной базы для выявления этих опасных возбудителей до создания отечественных регламентирующих документов по профилактике и лечению пациентов с микобактериозом.

Литература

1. Гунтупова Л.Д., Борисов С.Е., Соловьева И.П. и др. Микобактериозы во фтизиопульмонологической практике: обзор литературы и собственный опыт. *Практическая медицина*, 2011;(51):39–50.
2. Гунтупова Л.Д., Борисов С.Е., Макарова М.В., Хачатурьянц Е.Н. Микобактериозы органов дыхания: эпидемиология, микробиологические и клинические аспекты диагностики. *Эпидемиология и инфекционные болезни*, 2012;(2):8–14.
3. Макаревич Н.М., Рудой Н., Ильина Т.Б. Распространение нетуберкулезных микобактерий в отдельных регионах Советского Союза и их роль в заболевании человека. Сб. науч. тр. Кирг. НИИТ. Фрунзе, 1985, с. 73–79.
4. Михайловский А.М., Чуркин С.А., Пашкова Н.А., Лепеха Л.Н. Частота выявления и особенности морфологии нетуберкулезного микобактериоза у больных на поздней стадии ВИЧ-инфекции (по данным оренбургской области). *Туберкулез и болезни легких*, 2016;94(12):57–61, doi: [10.21292/2075-1230-2016-94-12-57-61](https://doi.org/10.21292/2075-1230-2016-94-12-57-61)
5. Оттен Т.Ф., Васильев А.В. Микобактериоз. СПб., 2005, 224 с.
6. Смирнова Т.Г., Андреевская С.Н., Ларионова Е.Е. и др. Мониторинг видового разнообразия нетуберкулезных микобактерий в ряде областей РФ с использованием ДНК-стрипов GenoType Mucobacterium CM/AS (Hain Lifescience, Германия). *Туберкулез и болезни легких*, 2017;95(5):54–59, doi: [10.21292/2075-1230-2017-95-5-54-59](https://doi.org/10.21292/2075-1230-2017-95-5-54-59)
7. Старкова Д.А., Журавлев В.Ю., Вязовая А.А. и др. Видовое разнообразие нетуберкулезных микобактерий у больных микобактериозом

- на территориях Северо-Западного федерального округа России. *Туберкулез и болезни легких*, 2019;97(6):16–22, doi: 10.21292/2075–1230–2019–97–6–16–22
8. Шмелев Е.И., Ковалевская М.Н., Эргешов А.Э. и др. Микобактериозы в практике врача-пульмонолога: состояние проблемы. *Практическая пульмонология*, 2016(3):37–42.
 9. Adjemian J., Olivier K.N., Seitz A.E. et al. Spatial clusters of nontuberculous mycobacterial lung disease in the United States. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012;186(6):553–558, doi: 10.1164/rccm.201205–0913OC
 10. BaoYing Z., XiaoJun L., HaiQun B. et al. Contamination and transmission of Mycobacteria in indoor environments of public buildings. *Cent Eur J Public Health*, 2022;30(1):26–31, doi: 10.21101/cejph.a5198. PMID: 35421295
 11. Bono M., Jemmi T., Bernasconi C. et al. Genotypic characterization of Mycobacterium avium strains recovered from animals and their comparison to human strains. *Appl Environ Microbiol*, 1995;61(1):371–373, doi: 10.1128/aem.61.1.371–373.1995
 12. Bull O.B., Hansen G.A. The leprous diseases of the eye, with 6 coloured plates. Christiania: A. Cammermeyer, 1873
 13. Carson L.A., Bland L.A., Cusick L.B. et al. Prevalence of nontuberculous mycobacteria in water supplies of hemodialysis centers. *Appl Environ Microbiol*, 1988;54:3122–3125.
 14. Davies B.S., Roberts C.H., Kaul S. et al. Non-tuberculous slow-growing mycobacterial pulmonary infections in non-HIV-infected patients in south London. *Scand J Infect Dis*, 2012;44(11):815–819, doi: 10.3109/00365548.2012.694469
 15. Eaton T., Falkinham J.O. 3rd, von Reyn C.F. Recovery of Mycobacterium avium from cigarettes. *J Clin Microbiol*, 1995;33(10):2757–2758, doi: 10.1128/jcm.33.10.2757–2758.1995
 16. Furuuchi K., Morimoto K., Yoshiyama T. et al. Interrelational changes in the epidemiology and clinical features of nontuberculous mycobacterial

- pulmonary disease and tuberculosis in a referral hospital in Japan. *Respir Med*, 2019;152:74–80, doi: 10.1016/j.rmed.2019.05.001
17. Gcebe N., Hlokwwe T.M. Non-tuberculous Mycobacteria in South African Wildlife: Neglected Pathogens and Potential Impediments for Bovine Tuberculosis Diagnosis. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017;30:7–15. doi: 10.3389/fcimb.2017.00015
 18. Ghielmetti G., Hilbe M., Friedel U. et al. Mycobacterial infections in wild boars (*Sus scrofa*) from Southern Switzerland: Diagnostic improvements, epidemiological situation and zoonotic potential. *Transbound Emerg Dis*, 2021;68(2):573–586, doi: 10.1111/tbed.13717
 19. Goosen W.J., Clarke C., Kleynhans L. et al. Culture-Independent PCR Detection and Differentiation of *Mycobacteria* spp. in Antemortem Respiratory Samples from African Elephants (*Loxodonta africana*) and Rhinoceros (*Ceratotherium Simum*, *Diceros Bicornis*) in South Africa. *Pathogens*, 2022;11(6):709, doi: 10.3390/pathogens11060709
 20. Gupta R.S., Lo B., Son J. Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Robustly Support Division of the Genus *Mycobacterium* into an Emended Genus *Mycobacterium* and Four Novel Genera. *Front Microbiol*, 2018;9:67, doi: 10.3389/fmicb.2018.00067
 21. Guz L., Puk K. Antibiotic Susceptibility of Mycobacteria Isolated from Ornamental Fish. *J Vet Res*, 2022;66(1):69–76, doi: 10.2478/jvetres-2022-0011
 22. Halstrom S., Price P., Thomson R. Review: Environmental mycobacteria as a cause of human infection. *Int J Mycobacteriol*, 2015;4(2):81–91, doi: 10.1016/j.ijmyco.2015.03.002
 23. Hamilton K.A., Ahmed W., Toze S., Haas C.N. Human health risks for *Legionella* and *Mycobacterium avium* complex (MAC) from potable and non-potable uses of roof-harvested rainwater. *Water Res*, 2017;119:288–303
 24. Hashish E., Merwad A., Elgaml S. et al. *Mycobacterium marinum* infection in fish and man: epidemiology, pathophysiology

- and management; a review. *Vet Q*, 2018;38(1):35–46, doi: 10.1080/01652176.2018.1447171
25. *Haworth C.S., Banks J., Capstick T. et al.* British Thoracic Society guidelines for the management of non-tuberculous mycobacterial pulmonary disease (NTM-PD). *Thorax*, 2017;72(Suppl 2): ii1-ii64, doi: 10.1136/thoraxjnl-2017-210927
26. *Hoefsloot W., van Ingen J., Andrejak C. et al.* Nontuberculous Mycobacteria Network European Trials Group. The geographic diversity of non-tuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: an NTM-NET collaborative study. *Eur Respir J*, 2013;42(6):1604–1613, doi: 10.1183/09031936.00149212
27. *Honda J.R., Hasan N.A., Davidson R.M. et al.* Environmental Nontuberculous Mycobacteria in the Hawaiian Islands. *PLoS Negl Trop Dis*, 2016;10(10): e0005068, doi: 10.1371/journal.pntd.0005068
28. *Honda J.R., Viridi R., Chan E.D.* Global Environmental Nontuberculous Mycobacteria and Their Contemporaneous Man-Made and Natural Niches. *Front Microbiol*, 2018;9:2029, doi: 10.3389/fmicb.2018.02029
29. *Holt M.R., Baird T.* Treatment Approaches to Mycobacterium abscessus Pulmonary Disease. *Clin Chest Med*, 2023;44(4):785–798, doi: 10.1016/j.ccm.2023.06.010
30. *Huang J.J., Li Y.X., Zhao Y.* Prevalence of nontuberculous mycobacteria in a tertiary hospital in Beijing, China, January 2013 to December 2018. *BMC Microbiol*, 2020;20(1):158, doi: 10.1186/s12866-020-01840-5
31. *Hubelova D., Ulmann V., Mikuska P. et al.* Nontuberculous Mycobacteria Prevalence in Aerosol and Spiders' Webs in Karst Caves: Low Risk for Speleotherapy. *Microorganisms*, 2021;9(12):2573, doi: 10.3390/microorganisms9122573
32. *Ide S., Nakamura S., Yamamoto Y. et al.* Epidemiology and clinical features of pulmonary nontuberculous mycobacteriosis in Nagasaki, Japan. *PLoS One*, 2015;10: e0128304

33. Iwamoto T., Nakajima C., Nishiuchi Y. et al. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* strains isolated from humans, pigs, and human living environment. *Infect Genet Evol*, 2012;12(4):846–852, doi: 10.1016/j.meegid.2011.06.018
34. Kaevska M., Slana I., Kralik P. et al. *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* in neck lymph nodes of children and their environment examined by culture and triplex quantitative real-time PCR. *J Clin Microbiol*, 2011;49(1):167–72, doi: 10.1128/JCM.00802–10
35. Kee S.J., Suh S.P. Increasing Burden of Nontuberculous *Mycobacteria* in Korea. *J Korean Med Sci*, 2017;32(8):1215–1216, doi: 10.3346/jkms.2017.32.8.1215
36. Kham-Ngam I., Chetchotisakd P., Ananta P. et al. Epidemiology of and risk factors for extrapulmonary nontuberculous mycobacterial infections in Northeast Thailand. *Peer J*, 2018;6: e5479, doi: 10.7717/peerj.5479
37. Khan K., Wang J., Marras T.K. Nontuberculous mycobacterial sensitization in the United States: national trends over three decades. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007;176(3):306–313, doi: 10.1164/rccm.200702–2010C
38. Lehmann K.B., Neumann R. Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik [Atlas and Outline of Bacteriology and Textbook of Special Bacteriological Diagnostics] (1st ed.), München: J.F. Lehmann, 1896.
39. Lescenko P., Matlova L., Dvorska L. et al. Mycobacterial infection in aquarium fish. *Vet Med – Czech*, 2003;48:71–78.
40. Lipman M., Cleverley J., Fardon T. et al. Current and future management of non-tuberculous mycobacterial pulmonary disease (NTM-PD) in the UK. *BMJ Open Respir Res*, 2020;7(1): e000591, doi: 10.1136/bmjresp-2020–000591
41. Liu C.F., Song Y.M., He W.C. Nontuberculous mycobacteria in China: incidence and antimicrobial resistance spectrum from a nationwide survey. *Infect Dis Poverty*, 2021;10(1):59, doi: 10.1186/s40249–021–00844–1

42. Lorencova A., Vasickova P., Makovcova J., Slana I. Presence of *Mycobacterium avium* subspecies and hepatitis E virus in raw meat products. *J Food Prot*, 2014;77(2):335–338, doi: 10.4315/0362-028X.JFP-13-252
43. MacNeil B.A., Hudson C.C., Nadkarni P., Dempsey K. A case report of a male patient receiving treatment for anorexia nervosa and comorbid obsessive compulsive disorder who was later diagnosed with nontuberculosis *Mycobacterium*. *Eat Weight Disord*, 2021;26(5):1691–1695, doi: 10.1007/s40519-020-00967-8.
44. Maluta A., Zajac M., Krajewska-Wędzina M. et al. Mixed Infection of *Mycobacterium szulgai*, *M. lentiflavum*, and Gram-Negative Bacteria as a Cause of Death in a Brown Caiman *Caiman crocodylus*: A Case Report. *Vet Sci*, 2022;9(3):133, doi: 10.3390/vetsci9030133
45. Männikkö N. Etymologia: *Mycobacterium chelonae*. *Emerg Infect Dis*, 2011;17:1712.
46. Meehan C.J., Barco R.A., Loh Y.E. Reconstituting the genus *Mycobacterium*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2021;71(9):004922, doi: 10.1099/ijsem.0.004922
47. Modrá H., Ulmann V., Čaha J. et al. Socio-Economic and Environmental Factors Related to Spatial Differences in Human Non-Tuberculous Mycobacterial Diseases in the Czech Republic. *Int J Environ Res Public Health*, 2019;16(20):3969, doi: 10.3390/ijerph16203969
48. Moore J.E., Kruijshaar M.E., Ormerod L.P. et al. Increasing reports of non-tuberculous mycobacteria in England, Wales and Northern Ireland, 1995–2006. *BMC Public Health*, 2010;10:612, doi: 10.1186/1471-2458-10-612
49. Mudedla S., Avendano E.E., Raman G. Non-tuberculous mycobacterium skin infections after tattooing in healthy individuals: A systematic review of case reports. *Dermatol Online J*, 2015;21(6):13030/qt8mr3r4f0
50. Namkoong H., Kurashima A., Morimoto K. et al. Epidemiology of Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Disease, Japan. *Emerg Infect Dis*, 2016;22(6):1116–1117, doi: 10.3201/eid2206.151086

51. Ovrutsky A.R., Chan E.D., Kartalija M. et al. Cooccurrence of free-living amoebae and nontuberculous Mycobacteria in hospital water networks, and preferential growth of *Mycobacterium avium* in *Acanthamoeba lenticulata*. *Appl Environ Microbiol*, 2013;79(10):3185–3192, doi: 10.1128/AEM.03823–12
52. Pai H.H., Chen W.C., Peng C.F. Isolation of non-tuberculous mycobacteria from hospital cockroaches (*Periplaneta americana*). *J Hosp Infect*, 2003;53:224–228.
53. Parte A.C. LPSN – List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2018;68:1825–1829, doi: 10.1099/ijsem.0.002786
54. Parte A.C., Sardà Carbasse J., Meier-Kolthoff J.P. et al. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2020;70:5607–5612, doi: 10.1099/ijsem.0.004332
55. Pfaller S., King D., Mistry J.H., Donohue M. Occurrence revisited: *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* in potable water in the USA. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2022;106(7):2715–2727, doi: 10.1007/s00253–022–11849–7
56. Ringshausen F.C., Wagner D., de Roux A. et al. Prevalence of Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease, Germany, 2009–2014. *Emerg Infect Dis*, 2016;22(6):1102–1105, doi: 10.3201/eid2206.151642
57. Schildkraut J.A., Gallagher J., Morimoto K. et al. NTM-NET. Epidemiology of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease in Europe and Japan by Delphi estimation. *Respir Med*, 2020;173:106164, doi: 10.1016/j.rmed.2020.106164
58. Sharma S.K., Upadhyay V. Non-tuberculous mycobacteria: a disease beyond TB and preparedness in India. *Expert Rev Respir Med*, 2021;15(7):949–958, doi: 10.1080/17476348.2021.1925545

59. Tortoli E., Brown-Elliott B.A., Chalmers J.D. et al. Same meat, different gravy: ignore the new names of mycobacteria. *Eur Respir J*, 2019;54(1):1900795, doi: 10.1183/13993003.00795-2019
60. Tortoli E. Commentary: Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Robustly Support Division of the Genus *Mycobacterium* into an Emended Genus *Mycobacterium* and Four Novel Genera. *Front Microbiol*, 2018;9:2065, doi: 10.3389/fmicb.2018.02065
61. Witte C., Fowler J.H., Pfeiffer W. et al. Social network analysis and whole-genome sequencing to evaluate disease transmission in a large, dynamic population: A study of avian mycobacteriosis in zoo birds. *PLoS One*, 2021;16(6): e0252152, doi: 10.1371/journal.pone.0252152

6. Структура и таксономический состав кишечного микробиома больных туберкулезом легких до и после прохождения противотуберкулезной терапии

Юнусбаева М.М., Бородина Л.Я., Закирова А.М., Булатов Ш.Э., Терентьева Д.Р., Юнусбаев Б.Б.

Введение

В последние годы внимание научного сообщества направлено на изучение микробных сообществ кишечника в развитии целого ряда социально значимых заболеваний [11, 28, 39]. Накапливающиеся данные свидетельствуют о том, что нормальная микробиота составляет ту основу жизнедеятельности, которая определяет и формирует здоровье человека. Биоценоз желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) является основополагающим фактором нормального метаболизма, обеспечивая синтез витаминов и других биологически активных веществ, вступает в антагонистические взаимоотношения с патогенными микроорганизмами, обеспечивает колонизационную резистентность, участвует в развитии, формировании и поддержании иммунитета всего организма [3]. Изменения в микробном составе и метаболической активности кишечных сообществ вызывают изменения не только на уровне местного иммунитета, но и связаны с изменениями иммунных реакций всего макроорганизма и развитием заболеваний в других отдаленных от кишечника органах и тканях [1, 4, 13, 23]. Многочисленные исследования показали, что взаимодействия внутри оси «кишечник – легкие» осуществляются посредством регуляции иммунного гомеостаза в кишечнике и легких, а дисбиотические

изменения в них нарушают работу иммунной системы и приводят к возникновению различных заболеваний легких. Так, например, исследования на животных показали, что комменсальная кишечная микробиота может модулировать восприимчивость организма к *Mycobacterium tuberculosis*, способствовать переходу ЛТИ в активный ТБ, а также оказывать влияние на противотуберкулезную ХТ [8, 38]. В ряде недавних исследований было показано, что мыши, пищеварительный тракт которых колонизирован *Helicobacter hepaticus*, плохо контролируют аэрозольную инфекцию *M. tuberculosis*. Иммунная система этих мышей была неспособна контролировать воспаление и развитие тяжелых повреждений в легочной ткани [22]. Противоположный эффект описан в отношении *Helicobacter pylori*. Макаки, кишечник которых был колонизирован *H. Pylori*, имели существенно меньшую вероятность развития активного ТБ по сравнению с неинфицированными животными [25]. Полученные данные позволяют предположить, что различные инфекционные агенты, колонизирующие кишечник, могут обучать иммунную систему и обеспечивать защиту от заболеваний органов дыхательной системы. Так, пероральное введение СЗНеВ/FeJ мышам убитых нагреванием *Mycobacterium manresensis* во время стандартного лечения ТБ значительно снижает бактериальную нагрузку в легких, уровень провоспалительных цитокинов (IFN- γ , TNF- α , IL-6 и IL-17) и гранулематозную инфильтрацию в легких [7]. Тогда как дисбиотические нарушения ЖКТ, вызванные антибиотиками широкого спектра действия, способствуют колонизации и диссеминации легких мышей *M. tuberculosis* [5, 10]. В совокупности эти данные указывают на двунаправленный характер взаимодействий между микробиотой кишечника и иммунной системой хозяина.

Несмотря на многочисленные исследования кишечных бактериальных сообществ в норме и при различной патологии, имеется ограниченное число исследований, посвященных изучению микробиома кишечника больных ТБ легких. Целью данного исследования является определение таксономического состава и биоразнообразия

микробиома кишечника больных ТБ до начала приема ПТП и через два месяца после прохождения интенсивной фазы ХТ в сравнении со здоровым контролем.

Материалы и методы

В работе использовали фекальные образцы, полученные от 23 больных ТБ и 47 здоровых доноров. Больные ТБ легких отбирались на базе ГБУЗ «Республиканский клинический противотуберкулезный диспансер» (ГБУЗ РКПТД) г. Уфы в период с 2019 по 2021 год. В исследование были включены только пациенты с впервые выявленным лучевыми методами диагностики (рентгенография, компьютерная томография, цифровая флюорография) ТБ легких, подтвержденным результатами микробиологических и молекулярно-генетических исследований мокроты на ТБ (ПЦР, микроскопия мазка с окраской по Цилю – Нильсену, люминесцентная микроскопия). Критериями исключения были сопутствующие хронические заболевания, кровохарканье, гипоксия, внелегочный ТБ, лечение по поводу ТБ в анамнезе, прием ПТП в течение последних 30 дней, беременность или кормление грудью, ВИЧ-инфекция. Средний возраст пациентов составлял 43 года (IQR 34,5–55 лет). Гендерный состав представлен 14 (61%) мужчинами и 9 (39%) женщинами. Среди клинических форм ТБ преобладали инфильтративный ТБ легких (65,2%), диссеминированный ТБ (30,4%) и казеозная пневмония (4,3%). На основании результатов определения ЛЧ возбудителя всем пациентам, включенным в исследование, был назначен I режим ХТ (HRZE) согласно Федеральным клиническим рекомендациям по диагностике и лечению туберкулеза органов дыхания [2].

Взятие образцов фекалий у больных с впервые выявленным ТБ легких осуществлялось дважды: первый раз – при поступлении в стационар, строго до начала приема ПТП (ТБ-1), второй сбор биоматериала у этих же пациентов производился через два месяца прохождения

интенсивной фазы ХТ (ТБ-2). Таким образом, от каждого больного были получены две пробы (до начала лечения и через два месяца от начала ХТ). Свежие образцы стула участников собирали в стерильные одноразовые контейнеры, которые доставлялись в бактериологическую лабораторию ГБУЗ РКПТД и замораживались при температуре -80°C . Контролем служили образцы фекалий здоровых добровольцев, которые собирали на базе КДЛ «МедиаЛаб». Взятие биоматериала осуществляли в соответствии с нормами и требованиями законодательства Российской Федерации. Все пациенты и здоровые добровольцы предоставили информированное согласие на участие в исследовании, одобренное локальным этическим комитетом ГБУЗ РКПТД.

Метагеномную ДНК экстрагировали из 200 мг фекалий с использованием набора QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Nederland). Библиотеки секвенирования были созданы с использованием набора для подготовки образцов TruSeq DNA PCR-Free (Illumina, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Полногеномное секвенирование проводилось на платформе Illumina HiSeq2500. Длина прочтений составляла 150 пар нуклеотидов. В среднем для каждого образца получено более 20 млн ридов секвенирования, что классифицируется как глубокое секвенирование (deep sequencing).

Первоначальный контроль качества данных секвенирования, удаление адаптеров и чрезмерно коротких ридов, а также деконтаминация ДНК человека были выполнены последовательно с помощью программ FastQC v0.11.9, fastp v0.23.2 и KneadData v0.10.0. Определение таксонов микроорганизмов и оценка относительной численности проводились на базе маркерных генов с использованием программы MetaPhlan4 [5]. Последующий анализ метагеномных данных проводился с использованием пакетов программ microbiome программной среды R (<https://www.r-project.org/>). Индекс Шеннона рассчитывали в пакете программ vegan R, достоверность различий между индексами Шеннона определяли с помощью

теста Колмогорова. Суммарное сходство микробиоты между донорами визуализировали методом главных компонент (PCA) на основе дистанций Брея – Кертиса в программе vegan. Для установления таксонов, характеризующих дифференциацию микробиоты между группами больных и контролей, был использован линейный дискриминантный анализ LEfSe (<https://huttenhower.sph.harvard.edu/lefse/>). Для каждого таксона, вносящего вклад в дифференциацию, также оценили индивидуальный вклад в виде LDA коэффициента. Для определения дифференциально представленных таксонов в парных данных больных ТБ до и после лечения был использован Т-критерий Вилкоксона для зависимых выборок (Matched-pair Wilcoxon Rank Sum Test).

Результаты

Оценка биоразнообразия кишечных бактериальных сообществ

Для получения исчерпывающего описания микробиома кишечника нами был проведен поиск как известных, так и неизвестных микробных таксонов (metagenome-assembled genomes, MAGs). В отличие от традиционных подходов, которые дают усеченную картину микробного разнообразия, новый подход, реализованный в MetaPhlan4, обеспечивает более полное описание микробного состава [6]. В общей сложности в группах больных ТБ до начала лечения (ТБ-1), пациентов после 2 месяцев противотуберкулезной ХТ (ТБ-2) и здорового контроля было обнаружено 719, 632 и 983 микробных таксонов соответственно. Сравнение альфа-разнообразия (индекс Шеннона) бактериальных сообществ не выявило различий между исследуемыми группами ($p = 0,89$). Каждая из анализируемых групп характеризуется богатым внутривидовым разнообразием бактериальных сообществ (рис. 6.1А). Однако при оценке бета-разнообразия (дистанция Брея – Кертиса) нами была обнаружена статистически значимая дифференциация видового

состава микробиомов больных ТБ-1 и ТБ-2 от контроля ($p = 0,00747$ и $p = 0,00001$ соответственно). При этом статистически значимых различий между больными ТБ до и после лечения не обнаружено ($p = 0,241$) (рис. 6.1Б).

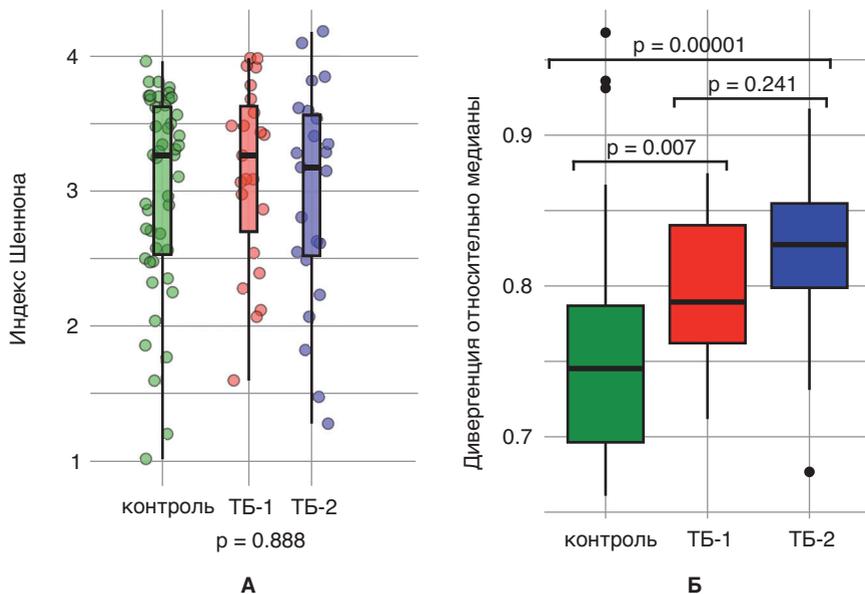


Рисунок 6.1. Сравнение альфа- (А) и бета-разнообразия (Б) кишечных микробиомов у больных ТБ до начала лечения (ТБ-1), больных ТБ после лечения (ТБ-2) и здоровых добровольцев (контроль)

Анализ главных компонент вариабельности бактериальных таксонов (РСА) между донорами показал, что общая структура микробиома кишечника больных ТБ до начала лечения (ТБ-1) сильно **раз-**личается от здорового контроля (рис. 6.2А). Это свидетельствует о существенном сдвиге бактериального состава кишечника у впервые выявленных больных ТБ. Попарное сравнение видового состава кишечных микробиомов больных ТБ до начала (ТБ-1) и после 2 месяцев лечения (ТБ-2) не показало отличий между анализируемыми выборками (рис. 6.2Б).

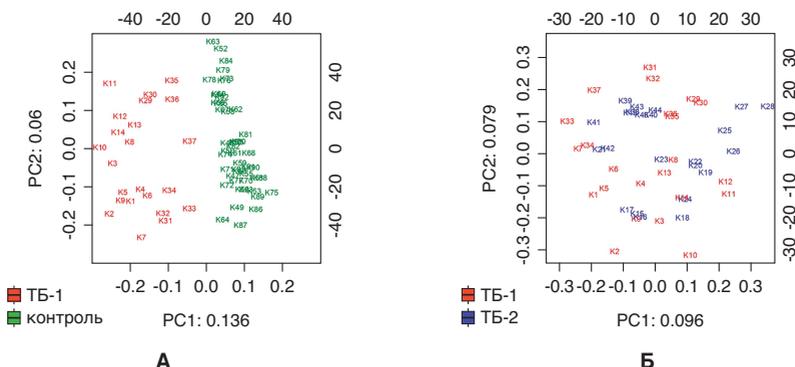


Рисунок 6.2. Анализ главных компонент вариабельности микробного состава кишечника (PCA). А – график сравнения микробного состава кишечника больных ТБ до начала лечения (ТБ-1) и здоровых доноров; Б – график сравнения микробного состава кишечника больных ТБ до начала лечения (ТБ-1) с больными ТБ после лечения (ТБ-2)

Сравнительный анализ таксономического состава микробных сообществ кишечника больных ТБ и здорового контроля

Анализ таксономического состава микробиома кишечника трех исследуемых групп на уровне типов (phylum) показан на рисунке 6.3.

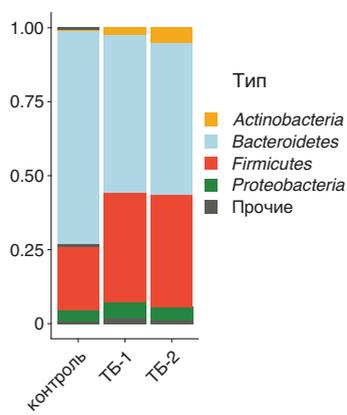


Рисунок 6.3. Таксономический состав микробиоты кишечника у пациентов ТБ-1, ТБ-2 и группы контроля на уровне типа

Доминирующими типами у всех анализируемых категорий были представители *Bacteroidetes* и *Firmicutes*. Однако кишечная микробиота у больных ТБ отличалась от микробиоты группы здорового контроля существенным снижением доли *Bacteroidetes* за счет увеличения численности представителей типов *Firmicutes*, *Proteobacteria* и *Actinobacteria*. Так, у больных ТБ до начала лечения (ТБ-1) доля представителей типа *Firmicutes* составляла 36,4%, тогда как в группе контроля – 21,3% ($p = 0,03$). Количество представителей типа *Bacteroidetes* было существенно снижено у больных ТБ-1 (54%) по сравнению с контролем (72,2%, $p = 0,01$). При сравнении больных ТБ после противотуберкулезной ХТ (ТБ-2) с контролем также наблюдается существенный сдвиг в сторону увеличения представителей *Firmicutes* (38,2% у больных ТБ-2 против 21,3% в контроле, $p = 0,01$), *Proteobacteria* (4,3% против 3,8%, $p > 0,05$) и *Actinobacteria* (4,7% против 0,2%, $p = 0,02$) (рис. 6.3). Однако, как видно на рисунке 6.3, составы микробных сообществ кишечника у больных ТБ-1 и ТБ-2 практически не отличались друг от друга, за исключением небольших сдвигов в доле *Actinobacteria* и *Proteobacteria* ($p > 0,05$). Данный факт свидетельствует об отсутствии влияния ПТП первого ряда на бактериальный состав кишечного микробиома. Кроме того, это также может свидетельствовать о наличии антибиотикорезистентных штаммов среди представителей данных типов бактерий. Некоторые микроорганизмы, такие как *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitides*, *Streptococcus pneumoniae* и *Rhodococcus equi*, обладают природной устойчивостью к рифампицину [14].

Сравнение микробных сообществ кишечника больных ТБ до начала лечения (ТБ-1) с контролем

Для того чтобы определить, какие конкретно микробные таксоны отличают микробиом кишечника больных ТБ легких до начала лечения (ТБ-1) от здоровых людей, был проведен линейный дискриминантный анализ LfSe. Для каждого таксона, вносящего вклад в дифференциацию, также был оценен LDA (Latent Dirichlet Allocation) индекс, который отражает информативность для дифференциации. При сравнении

больных ТБ-1 с контролем были выявлены 188 таксонов, дифференциально представленных в группе больных ТБ до начала лечения ($p < 0,05$, $LDA \geq 2$). Чтобы получить представление о биологии таксонов, определяющих наблюдаемую дифференциацию, нами были выделены наиболее информативные таксоны с $LDA \geq 4,5$. Так, виды *Phocaeicola dorei*, *Escherichia coli*, *Prevotella copri clade C*, *Akkermansia muciniphila* и др. были сильно обогачены у больных ТБ-1, тогда как *Phocaeicola vulgatus*, *Alistipes putredinis*, *Prevotella copri clade B*, *Prevotella SGB1589* были многочисленны в группе контроля (рис. 6.4). Примечательно,

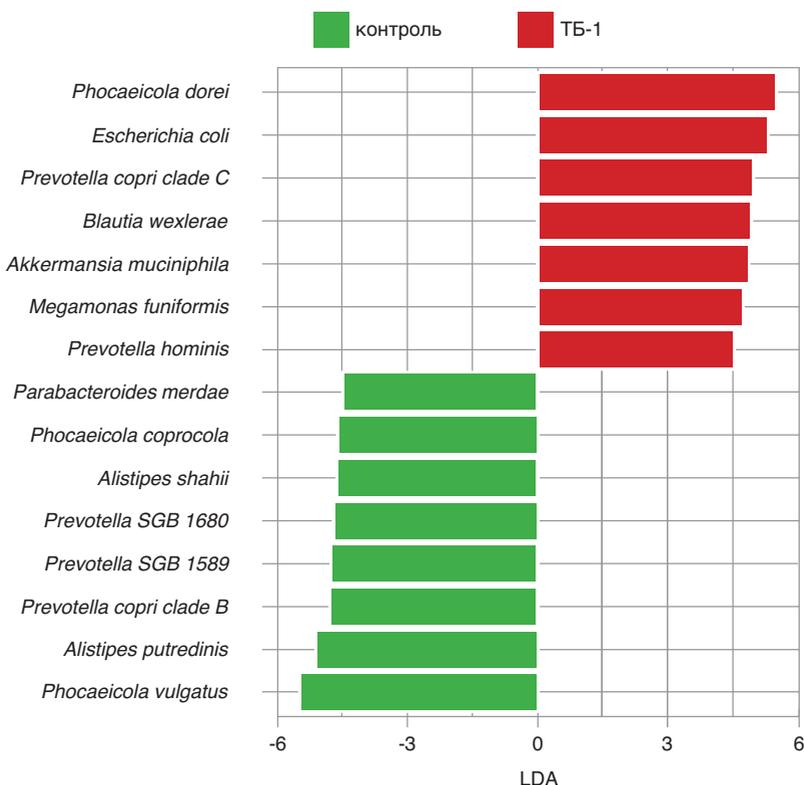


Рисунок 6.4. График дифференциально представленных таксонов кишечных бактерий между здоровым контролем и больными ТБ до лечения (ТБ-1). Представлена только часть наиболее информативных таксонов, характеризующихся максимальной дифференциацией (LDA индекс выше 4,5)

что многие из обнаруженных нами бактерий (*E. coli*, *A. muciniphila*, *M. funiformis*, *C. boltea*) ранее были ассоциированы с различными воспалительными и инфекционными заболеваниями [18, 29, 31, 39, 40].

Сравнение микробных сообществ кишечника больных ТБ: до начала лечения (ТБ-1) и после 2 месяцев противотуберкулезной ХТ (ТБ-2)

Для того чтобы определить, какие изменения в таксономическом составе микробного сообщества кишечника происходят в условиях приема ПТП, было проведено сравнение микробиома больных ТБ до начала лечения и через два месяца противотуберкулезной ХТ по I режиму (HRZE). Поскольку данные микробиома представляют парные данные для каждого пациента (до и после), для анализа был использован критерий Вилкоксона для парных данных (Matched-pair Wilcoxon Rank Sum Test). Всего было обнаружено 28 дифференциально представленных таксонов бактерий ($p < 0,05$), из которых 3 вида (*Bacteroides cellulosilyticus*, *Enterocloster aldensis*, *Clostridium spiroforme*) были более распространены у больных ТБ-2 после лечения (рис. 6.5А),

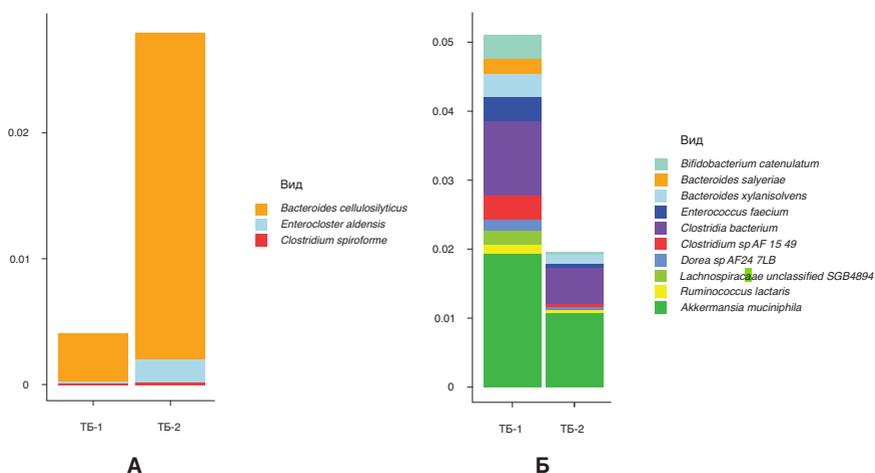


Рисунок 6.5. Частота дифференциально представленных таксонов, выявленных между больными ТБ-2 (А) и ТБ-1 (Б)

тогда как у больных ТБ-1 преобладали *Akkermansia muciniphila*, *Clostridia bacterium*, *Clostridium sp AF15_49*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Enterococcus faecium*, *Bacteroides salyersiae*, *Bacteroides xyloxylium* и др. (рис. 6.5Б). Многие из обнаруженных бактерий относятся к представителям филумов *Firmicutes* (порядок *Clostridiales* и *Eubacteriales*) и *Bacteroides* (порядок *Bacteroidales*).

Обсуждение

В данном исследовании проведена сравнительная оценка био-разнообразия и таксономической структуры кишечного микробиома больных ТБ легких до начала лечения (ТБ-1), пациентов после 2-месячной противотуберкулезной ХТ (ТБ-2) и здоровых добровольцев. Нами подтверждены различия видового состава кишечных сообществ бактерий у больных ТБ легких с таковыми у здоровых доноров, что согласуется с рядом исследований, в которых также были обнаружены существенные различия в таксономическом составе и био-разнообразии микробных сообществ кишечника больных ТБ и здоровых лиц [30, 33, 36]. Анализ таксономического состава микробиома кишечника продемонстрировал изменения в соотношении представителей *Firmicutes/Bacteroidetes* и увеличение доли представителей *Proteobacteria/Actinobacteria/Verrucomicrobia* в кишечном микробиоме больных ТБ легких по сравнению со здоровыми добровольцами.

В целом стоит отметить, что микробиом кишечника больных с впервые диагностированным активным ТБ легких (ТБ-1) характеризуется измененной структурой бактериального сообщества с преобладанием видов, способствующих и поддерживающих воспаление в кишечнике. В первую очередь микробиота кишечника пациентов ТБ-1 характеризуется преобладанием бактерий, относящихся к *Firmicutes (Clostridiales)* и *Proteobacteria (Enterobacterales)*. Стоит отметить, что уже на момент поступления в стационар многие пациенты имели характерные признаки дисбиоза кишечника, вызванные существенным снижением облигатно-анаэробных бактерий

и обогащением факультативно-анаэробных и патогенных микроорганизмов. В свою очередь, дисбиоз может ослаблять барьерную функцию кишечника и способствовать выходу из него бактериальных клеток, бактериальной ДНК, липополисахаридов и других факторов патогенности, которые по системе лимфатических сосудов попадают в различные органы и ткани, способствуя развитию хронического воспалительного процесса в организме и усугубляя течение туберкулезной инфекции. Так, в исследовании Li S. et al. (2022) было показано, что дисбиоз кишечной микробиоты, наблюдаемый у больных туберкулезным менингитом, обусловлен высокой долей видов *Escherichia-Shigella* в кишечном микробиоме больных и повышенным уровнем провоспалительных цитокинов в крови (TNF- α и IL-6) [19]. Сравнение кишечного микробиома у впервые выявленных больных ТБ, пациентов с рецидивом ТБ и здоровых доноров выявило значительное увеличение представителей фило *Actinobacteria* и *Proteobacteria* в группе больных с рецидивом ТБ [21]. Напротив, микробное разнообразие *Bacteroidetes*, содержащего множество полезных комменсальных организмов, было снижено в группе пациентов с рецидивом ТБ. Такая же картина со снижением количества бутират-синтезирующих бактерий и повышением провоспалительных бактерий рода *Prevotella* и *Enterococcus* наблюдалась у детей, больных ТБ легких [20]. В целом анализ литературных данных подтверждает полученные нами результаты об обогащении микробиоты кишечника впервые выявленных больных ТБ бактериальными таксонами, способствующими развитию воспаления в кишечнике [15, 33].

Таким образом, многие бактериальные таксоны, обнаруженные в группе больных с впервые выявленным ТБ легких (ТБ-1), ассоциированы с развитием воспалительных и дисбиотических нарушений кишечника. Как известно, воспалительные реакции в кишечнике изменяют pH среды и способствуют образованию реактивных форм азота и активных форм кислорода. Реактивные формы азота, образующиеся в качестве побочных продуктов воспалительной реакции хозяина, могут быть использованы *E. coli* и, вероятно, другими

условно-патогенными энтеробактериями в качестве терминальных акцепторов электронов для анаэробного дыхания и получения энергии для роста [35]. Способность *E. coli* и других условно-патогенных бактерий использовать неферментируемые субстраты позволяет получать селективное преимущество в воспаленном кишечнике, а также способствует преимущественному размножению микроорганизмов, способных к нитратному дыханию. Таким образом, воспалительный фон, возникающий, например, в результате инфицирования легких микобактериями туберкулеза, может избирательно усиливать рост патобионтов и способствовать формированию альтернативного кишечного микробиома.

Другим важным аспектом в анализе микробиомных данных у больных ТБ является оценка влияния ПТП на разнообразие и состав микробиоты кишечника. Длительная многокомпонентная ХТ является основным способом лечения ТБ. Однако антибактериальные препараты оказывают негативное воздействие на микробиом хозяина. Причем речь идет не только о кратковременных эффектах, но и о долгосрочном комплексном влиянии антимикробных препаратов на состав и состояние микробиома. Многочисленные исследования подтвердили пагубное влияние антибиотиков широкого спектра действия на микробиоту кишечника, серьезным последствием которого является развитие антибиотикоустойчивых штаммов бактерий и, как результат, возникновение суперинфекций [24, 26]. По прогнозам экспертов, из-за устойчивости бактерий к антибиотикам число летальных исходов к 2050 году может достигнуть 10 млн человек [27].

В данном исследовании было изучено влияние приема ПТП на состав и биоразнообразие кишечного микробиома больных ТБ. Лечение пациентов с ТБ легких в течение двух месяцев изониазидом, рифампицином, пиразинамидом и этамбутолом (HRZE) не привело к снижению разнообразия бактериальных таксонов и существенным сдвигам в бактериальном составе кишечного микробиома при сравнении пациентов ТБ-1 и ТБ-2 друг с другом. Полученные нами результаты по некоторым показателям отличаются

от опубликованных ранее. Так, в работе Hu Y. et al. (2019) назначенная терапия HRZE вызвала быстрые и существенные изменения в структуре микробиома, а именно резкое истощение биоразнообразия бактериальных таксонов [16]. Однако стоит отметить, что наблюдаемые изменения были выявлены через одну и две недели приема ПТП. Авторы отметили резкое снижение численности представителей рода *Clostridiales* типа *Firmicutes* в период проведения противотуберкулезной ХТ, в то время как многие представители рода *Bacteroides*, включая *Bacteroides OTU230* и *Bacteroides fragilis*, оказались среди таксонов, число которых увеличилось. Наблюдаемые изменения, выявленные в первые недели приема антибактериальных препаратов, связаны исключительно с бактериостатическим и бактерицидным действием ПТП. Однако, как было показано в работе [37], наблюдаемое в первые недели истощение большинства бактериальных таксонов в дальнейшем восстанавливается. Даже в условиях длительного приема HRZE у больных ТБ в период между двумя и шестью месяцами устанавливается альтернативный состав микробиома кишечника [37]. Анализируя полученные нами данные, мы можем предположить, что отсутствие снижения альфа-разнообразия в группе больных ТБ-2 можно охарактеризовать адаптацией кишечного бактериального сообщества к длительному приему ПТП и установлению альтернативного бактериального состава кишечника. В исследовании, проведенном группой Wipperfurth M.F. et al. (2017), также было показано, что длительное лечение ТБ не нарушает общего разнообразия кишечного микробиома, но тем не менее резко истощает множество иммунологически значимых комменсальных бактерий. Наблюдаемые нарушения могут сохраняться в течение как минимум 1,2 года, что свидетельствует о длительном эффекте противотуберкулезной ХТ [36].

Многие бактерии, обнаруженные в кишечном микробиоме больных ТБ, подвергшихся длительной антибиотикотерапии, могут оказывать патологическое воздействие на своего хозяина. Так, *Clostridium spiroforme*, обнаруженный в кишечнике больных после

двухмесячной противотуберкулезной ХТ (ТБ-2), продуцирует энтеротоксин CST, основное повреждающее действие которого заключается в нарушении организации актинового цитоскелета клетки [9, 17]. Установлено, что данный токсин вызывает изменения в системе микротрубочек с образованием выпячиваний, которые расширяют клеточную поверхность, что, в свою очередь, способствует адгезии бактерий и облегчает колонизацию кишечника [12]. Многие виды бактерий рода *Bacteroides*, к которым относится *B. cellulosilyticus*, демонстрируют самые высокие показатели устойчивости к антибиотикам среди всех анаэробных патогенов [34]. Показано, что эти бактерии обладают повышенной устойчивостью ко многим антибиотикам, включая цефокситин, клиндамицин, метронидазол, карбапенемы и фторхинолоны [32, 34]. Наличие в их геноме различных детерминант устойчивости и патогенности дает колоссальное преимущество в захвате освободившейся экологической ниши, например, вследствие длительной антибиотикотерапии. В заключение можно отметить, что лечение ТБ ПТП оказывает сильное воздействие на кишечный микробиом и имеет длительные негативные последствия для организма в целом. Антибактериальные препараты прежде всего влияют на микрофлору и барьерную функцию слизистой оболочки кишечника. Окислительно-восстановительный потенциал, индуцированный антибиотиками, способствует повышенной оксигенации эпителия кишечника, что, в свою очередь, может способствовать положительному отбору патобионтов, толерантных к присутствию в среде кислорода и устойчивых к действию антибиотиков.

Заключение

Видовой состав микробиома кишечника больных ТБ легких отличается от микробиома здорового человека. Существенные сдвиги в таксономическом составе и биоразнообразии микробиома кишечника наблюдаются среди представителей типов

Firmicutes (*C. spiroforme*, *E. aldensis*, *E. faecium*, *P. bacterium* и др.), *Proteobacteria* (*E. coli*, *K. pneumoniae* и другие представители семейства *Enterobacteriaceae*) и *Actinobacteria* (*B. catenulatum*).

Микробиом кишечника впервые выявленных больных ТБ характеризуется дисбиотическими нарушениями с превалированием таксонов, способствующих и поддерживающих воспалительный процесс в организме. В первую очередь наблюдается разрастание представителей семейства *Enterobacteriaceae*, яркими представителями которого являются *E. coli* и *K. pneumoniae*.

Применение ПТП оказывает сильное воздействие на кишечный микробиом и имеет длительные негативные последствия для всего организма в целом. В условиях длительной многокомпонентной антибактериальной терапии микробиом кишечника больных ТБ обогащается таксонами, относящимися к классу *Clostridia* (*C. spiroforme*, *E. aldensis*, *P. bacterium*, *R. lactaris*) и роду *Bacteroides* (*P. dorei*, *B. salyersiae*). Обнаруженные бактерии обладают различными генетическими детерминантами, позволяющими получать селективное преимущество в росте и размножении в условиях массивной антибактериальной терапии.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (№ 22–25–00272, <https://www.rscf.ru/project/22–25–00272/>).

Литература

1. Беляев В.С., Червинец В.М., Червинец Ю.В. Ось кишечник–легкие. Пульмонология, 2023;33(5):663–669, doi: 10.18093/0869–0189–2022–3053
2. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению туберкулеза органов дыхания. М.; Тверь: Триада, 2014, 56 с.
3. Шабашова Н.В. Микробиоценоз и внутриэпителиальная иммунная система желудочно-кишечного тракта человека. Вестник

- Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова*. 2011;3(2):166–78.
4. *Aktaş B., Aslim B. Gut-lung axis and dysbiosis in COVID-19. Turk J Biol, 2020;44:265–272, doi: 10.3906/biy-2005–102*
 5. *Barbosa-Amezcuа M., Galeana-Cadena D., Alvarado-Peña N., Silva-Herzog E. The Microbiome as Part of the Contemporary View of Tuberculosis Disease. Pathogens, 2022;11(5):58411, doi: 10.3390/pathogens11050584*
 6. *Blanco-Míguez A., Beghini F., Cumbo F. et al. Extending and improving metagenomic taxonomic profiling with uncharacterized species using MetaPhlan 4. Nat Biotechnol, 2023;41:1633–1644, doi: 10.1038/s41587–023–01688-w*
 7. *Cardona P., Marzo-Escartín E., Tapia G. et al. Oral Administration of Heat-Killed Mycobacterium manresensis Delays Progression toward Active Tuberculosis in C3HeB/FeJ Mice. Front Microbiol, 2015;6:1482, doi: 10.3389/fmicb.2015.01482*
 8. *Comberinati P., Di Cicco M., Paravati F. et al. The Role of Gut and Lung Microbiota in Susceptibility to Tuberculosis. Int J Environ Res Public Health, 2021;18(22):12220, doi: 10.3390/ijerph182212220*
 9. *De Roo A.C., Regenbogen S.E. Clostridium difficile Infection: An Epidemiology Update. Clin Colon Rectal Surg, 2020;33:49–57, doi:10.1055/s-0040–1701229*
 10. *Dumas A., Corral D., Colom A. et al. The Host Microbiota Contributes to Early Protection Against Lung Colonization by Mycobacterium tuberculosis. Front Immunol, 2018;9:2656, doi:10.3389/fimmu.2018.02656*
 11. *Elsen L.W.J., Poyntz H.C., Weyrich L.S. et al. Embracing the gut microbiota: the new frontier for inflammatory and infectious diseases. Clin Transl Immunology, 2017;6: e125, doi:10.1038/cti.2016.91*
 12. *Encyclopedia of Cell Biology. Academic Press, 2015. Available: <https://play.google.com/store/books/details?id=BEabBwAAQBAJ>*

13. *Frati F., Salvatori C., Incorvaia C. et al. The Role of the Microbiome in Asthma: The Gut–Lung Axis. Int J Mol Sci, 2018;20:123, doi:10.3390/ijms20010123*
14. *Goldstein B. Resistance to rifampicin: a review. J Antibiot, 2014;67:625–630, doi: 10.1038/ja.2014.107*
15. *Hu Y., Feng Y., Wu J. et al. The Gut Microbiome Signatures Discriminate Healthy From Pulmonary Tuberculosis Patients. Front Cell Infect Microbiol, 2019;9:90, doi: 10.3389/fcimb.2019.00090*
16. *Hu Y., Yang Q., Liu B. et al. Gut microbiota associated with pulmonary tuberculosis and dysbiosis caused by anti-tuberculosis drugs. J Infect, 2019;78:317–322, doi: 10.1016/j.jinf.2018.08.006*
17. *Johnson EA. Clostridia. In: Schaechter M, editor. Encyclopedia of Microbiology (Third Edition). Oxford: Academic Press, 2009, pp. 87–93, doi: 10.1016/B978-012373944-5.00139-5*
18. *Lee K.-S., Jeong Y.-J., Lee M.-S. Escherichia coli Shiga Toxins and Gut Microbiota Interactions. Toxins, 2021;13(6):416, doi: 10.3390/toxins13060416*
19. *Li S., Guo J., Liu R. et al. Predominance of Escherichia-Shigella in Gut Microbiome and Its Potential Correlation with Elevated Level of Plasma Tumor Necrosis Factor Alpha in Patients with Tuberculous Meningitis. Microbiol Spectr, 2022;10: e0192622, doi: 10.1128/spectrum.01926-22*
20. *Li W., Zhu Y., Liao Q. et al. Characterization of gut microbiota in children with pulmonary tuberculosis. BMC Pediatr, 2019;19:445, doi: 10.1186/s12887-019-1782-2*
21. *Luo M., Liu Y., Wu P. et al. Alternation of Gut Microbiota in Patients with Pulmonary Tuberculosis. Front Physiol, 2017;8:822, doi: 10.3389/fphys.2017.00822*
22. *Majlessi L., Sayes F., Bureau J.-F. et al. Colonization with Helicobacter is concomitant with modified gut microbiota and drastic failure of the immune control of Mycobacterium tuberculosis. Mucosal Immunol, 2017;10:1178–1189, doi: 10.1038/mi.2016.140*

23. Mukherjee S., Hanidziar D. More of the Gut in the Lung: How Two Microbiomes Meet in ARDS. *Yale J Biol Med*, 2018;91:143–149, available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29955219>
24. Patangia D.V., Anthony Ryan C., Dempsey E. et al. Impact of antibiotics on the human microbiome and consequences for host health. *Microbiologyopen*, 2022;11: e1260, doi: 10.1002/mbo3.1260
25. Perry S., de Jong B.C., Solnick J.V. et al. Infection with *Helicobacter pylori* is associated with protection against tuberculosis. *PLoS One*, 2010;5: e8804, doi: 10.1371/journal.pone.0008804
26. Ramirez J., Guarner F., Bustos Fernandez L. et al. Antibiotics as Major Disruptors of Gut Microbiota. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020;10:572912, doi: 10.3389/fcimb.2020.572912
27. Review on Antimicrobial Resistance (London). Grande-Bretagne. Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations. Review on Antimicrobial Resistance, 2014, available: <https://play.google.com/store/books/details?id=b1EOkAEACAAJ>
28. Round J.L., Mazmanian S.K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol*, 2009;9:313–323, doi: 10.1038/nri2515
29. Sheng S., Yan S., Chen J. et al. Gut microbiome is associated with metabolic syndrome accompanied by elevated gamma-glutamyl transpeptidase in men. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022;12:946757, doi: 10.3389/fcimb.2022.946757
30. Shi W., Hu Y., Ning Z. et al. Alterations of gut microbiota in patients with active pulmonary tuberculosis in China: a pilot study. *Int J Infect Dis*, 2021;111:313–321, doi: 10.1016/j.ijid.2021.08.064
31. Tyakht A.V., Manolov A.I., Kanygina A.V. et al. Genetic diversity of *Escherichia coli* in gut microbiota of patients with Crohn's disease discovered using metagenomic and genomic analyses. *BMC Genomics*, 2018;19:1–14, doi: 10.1186/s12864-018-5306-5

32. *Veloo A.C.M., Baas W.H., Haan F.J. et al.* Prevalence of antimicrobial resistance genes in *Bacteroides* spp. and *Prevotella* spp. Dutch clinical isolates. *Clin Microbiol Infect*, 2019;25:1156.e9–1156.e13, doi: 10.1016/j.cmi.2019.02.017
33. *Wang S., Yang L., Hu H. et al.* Characteristic gut microbiota and metabolic changes in patients with pulmonary tuberculosis. *Microb Biotechnol*, 2022;15:262–275, doi: 10.1111/1751–7915.13761
34. *Wexler H.M.* Bacteroides: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin Microbiol Rev*, 2007;20:593–621, doi: 10.1128/CMR.00008–07
35. *Winter S.E., Winter M.G., Xavier M.N. et al.* Host-derived nitrate boosts growth of *E. coli* in the inflamed gut. *Science*, 2013;339:708–711, doi: 10.1126/science.1232467
36. *Wiperman M.F., Fitzgerald D.W., Juste M.A.J. et al.* Antibiotic treatment for Tuberculosis induces a profound dysbiosis of the microbiome that persists long after therapy is completed. *Sci Rep*, 2017;7:10767, doi: 10.1038/s41598–017–10346–6
37. *Wiperman M.F., Bhattarai S.K., Vorkas C.K. et al.* Gastrointestinal microbiota composition predicts peripheral inflammatory state during treatment of human tuberculosis. *Nat Commun*, 2021;12:1141, doi: 10.1038/s41467–021–21475-y
38. *Wood M.R., Yu E.A., Mehta S.* The Human Microbiome in the Fight Against Tuberculosis. *Am J Trop Med Hyg*. 2017;96:1274–1284, doi: 10.4269/ajtmh.16–0581
39. *Zheng M., Han R., Yuan Y. et al.* The role of *Akkermansia muciniphila* in inflammatory bowel disease: Current knowledge and perspectives. *Front Immunol*, 2022;13:1089600, doi: 10.3389/fimmu.2022.1089600
40. *Zou R., Xu F., Wang Y. et al.* Changes in the Gut Microbiota of Children with Autism Spectrum Disorder. *Autism Res*, 2020;13:1614–1625, doi: 10.1002/aur.2358

7. Влияние комбинации стрессовых факторов на выживаемость *m. Tuberculosis* в модели *In Vitro*

Андреевская С.Н., Смирнова Т.Г., Ларионова Е.Е., Черноусова Л.Н.

Введение

Туберкулез (ТБ) у человека, как правило, вызывают адаптированные к человеку виды микобактерий туберкулезного комплекса (МБТК) – *M. tuberculosis* и *M. africanum*. Применение методов молекулярного типирования, в том числе сравнительной геномики, позволило заключить, что адаптированные к человеку МБТК имеют четкую филогенетическую структуру, представленную семью линиями, происходящими от общего предка. В зависимости от наличия в геноме крупной делеции TbD1 филогенетические линии микобактерий туберкулеза (МБТ) разделяются на древние и современные [6, 8]. Штаммы с делецией TbD1, известные как современные, представлены тремя отдельными линиями: Линия 4 (Евро-Американская) широко распространена в Европе, Америке, Африке и на Ближнем Востоке; Линия 2 (Восточно-Азиатская) включает в себя группу Beijing, широко распространена в странах Восточной Азии; Линия 3 – с относительно узким ареалом распространения, включающим Восточную Африку, Центральную и Южную Азию. Древние линии без делеции в TbD1 включают Линию 1 (Индоокеанская), которая распространена на берегах Индийского океана и Филиппинах; Линию 5 (также известную как *M. africanum* West African 1) и Линию 6 (*M. africanum* West African 2), которые географически ограничены странами Западной Африки, а также Линию 7 (Эфиопская линия), представленную исключительно в Эфиопии [17, 19, 22]. В настоящее время широко

обсуждается возможное существование отличий между филогенетическими линиями *M. tuberculosis* по способности инфицировать, вызывать заболевание и передаваться в популяции.

В России преобладают микобактерии Восточно-Азиатской и Евро-Американской линий [4, 32]. Восточно-Азиатская линия *M. tuberculosis* в России представлена в основном штаммами Пекинской сублинии споллиговарианта SIT1, на долю которой приходится 13% штаммов *M. tuberculosis* во всем мире, а в России – 40–60% в зависимости от региона [2, 9, 31, 33, 40]. В ряде работ было высказано предположение, что они обладают повышенной трансмиссивностью по сравнению с *M. tuberculosis* других генотипов [7, 42]. Кроме глобального распространения, штаммы *M. tuberculosis* Пекинской сублинии часто характеризуются лекарственной устойчивостью, в том числе МЛУ и ШЛУ [5, 11, 26, 31, 33, 36, 37].

Есть работы, посвященные доказательству того, что штаммы Пекинской сублинии обладают специфическими биологическими особенностями, которые дают им эволюционное преимущество по сравнению с *M. tuberculosis* других генотипов. Так, в ряде экспериментальных исследований *in vitro* и *in vivo* показана их большая вирулентность по сравнению с *M. tuberculosis* других генотипов [27, 28, 39, 41], но в других исследованиях повышенная вирулентность штаммов *M. tuberculosis* Пекинской сублинии не подтвердилась [1, 13, 45]. Достаточно убедительно на сегодняшний день для штаммов *M. tuberculosis* Пекинской сублинии доказана высокая приспособляемость к выживанию в макрофагах, однако механизмы этого пока не объяснены [4, 16, 26].

Второй по частоте встречаемости в Российской Федерации филогенетической линией *M. tuberculosis* является Евро-Американская линия. Она представлена несколькими сублиниями, в которых выделяются определенные споллиговарианты [3]. Биологические свойства *M. tuberculosis* этой линии изучены недостаточно, однако известно, что в ряде регионов, например в странах Латинской Америки, Гвинеи и Эфиопии, именно штаммы Евро-Американской линии

(сублиния LAM) показывают высокий уровень кластеризации, что свидетельствует об их высокой трансмиссивности [21, 36]. Также показано, что *M. tuberculosis* Евро-Американской линии, относящиеся к Уральской группе штаммов (SIT35 и SIT262), выделенные на территории Российской Федерации и в Молдове, могут обладать МЛУ [30].

Помимо биологических свойств, обусловленных принадлежностью к определенной филогенетической линии, на биологические свойства *M. tuberculosis* может влиять устойчивость к ПТП, обусловленная мутациями в геноме [14, 25, 29]. Изменение белкового продукта гена вследствие геномных альтераций может оказывать неоднозначное влияние на способность возбудителя выживать в макроорганизме и передаваться от человека к человеку, то есть на фитнес штамма.

Для некоторых мутаций, ассоциированных с устойчивостью к рифампицину и изониазиду, определено наличие/отсутствие негативного влияния на жизнеспособность [20, 44].

Важным звеном, определяющим биологические свойства штаммов *M. tuberculosis*, является способность противостоять стрессовым условиям, с которыми возбудитель сталкивается при попадании в организм хозяина.

Резидентные альвеолярные макрофаги, которые фагоцитируют *M. tuberculosis* при попадании в легкие, для уничтожения внутриклеточных микробов задействуют ряд бактерицидных механизмов, включая образование свободных радикалов, таких как активные формы азота и кислорода [15].

Кроме того, попадая в макрофагальную фагосому, *M. tuberculosis* оказываются в условиях, обедненных по кислороду и питательным веществам, поэтому в качестве источника углерода используют липиды клетки хозяина, перестраивая свой метаболизм по пути гликолатного цикла [38], а также они способны переходить в состояние нерепликативной персистенции [34]. Важную роль в адаптации микобактерий к выживанию в макроорганизме играют секретируемые белки и белки клеточной стенки возбудителя [24]. Существуют исследования, которые показывают, что степень воздействия какого-либо

из факторов стресса на клинические штаммы *M. tuberculosis* варьирует [10, 35]. Однако исследованные штаммы не были классифицированы по принадлежности к филогенетическим линиям. Информации о том, как происходит процесс адаптации к выживанию в стрессовых условиях у *M. tuberculosis* разных генетических линий и лекарственной устойчивости, недостаточно.

Учитывая, что в макроорганизме возбудитель подвергается воздействию целого комплекса стрессоров, представлялось полезным создать модель множественного стресса, которая поможет наиболее полно охарактеризовать адаптацию возбудителя к условиям, максимально приближенным к естественным.

Цель исследования: изучение адаптации *in vitro* штаммов *M. tuberculosis* различных генетических линий и лекарственной устойчивости в условиях, наиболее приближенных к тем, с которыми возбудитель сталкивается в гранулема, такими как недостаток питательных веществ, высокая концентрация NO и АФК.

Материалы и методы

Штаммы микобактерий

Исследовано 17 штаммов *M. tuberculosis*: 10 штаммов Пекинской сублинии и 7 штаммов Евро-Американской линии (табл. 7.1).

Все штаммы *M. tuberculosis* Пекинской сублинии были одного сполиговарианта SIT1 и различались между собой только структурой генов устойчивости к основным ПТП. В исследование вошли 4 чувствительных ко всем ПТП штамма *M. tuberculosis* Пекинской сублинии (Vj-1, Vj-2, Vj-3 и Vj-4).

Еще два штамма Пекинской сублинии несли разные мутации в гене *katG*: наиболее распространенную *katG315_Ser->Thr(1)* (штамм Vj-5) и редкую *katG315_Ser->Asn* (штамм Vj-6). Еще три штамма Пекинской сублинии (Vj-7, Vj-8 и Vj-9) несли мутации *katG315_Ser->Thr(1)* и *rhoB531_Ser->Leu* (классический МЛУ-генотип), но имели разный спектр фенотипической устойчивости: все эти штаммы были

Таблица 7.1. Характеристика штаммов *M. tuberculosis*, включенных в исследование

№	Код штамма	Сублинния	SIT	Мутации в генах			
				<i>kafG</i>	<i>inhA</i>	<i>groB</i>	<i>gyrA</i>
Bj-1	Beijing_SIT1_WT-1	Пекинская	1	WT	WT	WT	WT
Bj-2	Beijing_SIT1_WT-2	Пекинская	1	WT	WT	WT	WT
Bj-3	Beijing_SIT1_WT-3	Пекинская	1	WT	WT	WT	WT
Bj-4	Beijing_SIT1_WT-4	Пекинская	1	WT	WT	WT	WT
Bj-5	Beijing_SIT1_katG315(Thr)	Пекинская	1	315_Ser->Thr(1)	WT	WT	WT
Bj-6	Beijing_SIT1_katG315(Asn)	Пекинская	1	315_Ser->Asn	WT	WT	WT
Bj-7	Beijing_SIT1_katG315(Thr)_ groB531(Leu)_HRE	Пекинская	1	315_Ser->Thr(1)	WT	531_Ser->Leu	WT
Bj-8	Beijing_SIT1_katG315(Thr)_ groB531(Leu)_HREZ	Пекинская	1	315_Ser->Thr(1)	WT	531_Ser->Leu	WT
Bj-9	Beijing_SIT1_katG315(Thr)_ groB531(Leu)_HREEth	Пекинская	1	315_Ser->Thr(1)	WT	531_Ser->Leu	WT
Bj-10	Beijing_SIT1_katG315(Thr)_ groB526(Arg)_gyrA90(Val)	Пекинская	1	315_Ser->Thr(1)	WT	526_His->Arg	90_Ala->Val
T1-1	T1_SIT1888_WT	T1	1888	WT	WT	WT	WT
T1-2	T1_SIT172_WT	T1	172	WT	WT	WT	WT
T1-3	T1_SIT196_WT	T1	196	WT	WT	WT	WT
H37Rv	H37Rv_T1_SIT451_WT	T1	451	WT	WT	WT	WT
LAM_RUS-1	LAM_RUS_SIT254_WT	LAM_RUS	254	WT	WT	WT	WT
LAM_RUS-2	LAM_RUS_SIT254_katG315(Thr)_ inhA15(T)_ groB526 (Tyr)_ gyrA95(Tyr)	LAM_RUS	254	315_Ser->Thr(1)	15_C->T	526_His->Tyr	94_Asp->Tyr
LAM9	LAM9_SIT161_katG315(Thr)_ inhA15(T)_ groB516(Val)	LAM9	161	315_Ser->Thr(1)	15_C->T	516_Asp->Val	WT

устойчивы к изониазиду, рифампицину и этамбутолу, один штамм был также устойчив к пиперазину (Vj-8) и еще один – к этионамиду (Vj-9). Последний штамм Пекинской сублинии (Vj-10) имел генотип предширокой лекарственной устойчивости (преШЛУ-генотип), причем в гене *rpoB* была мутация *rpoB526_His->Arg*, которая не очень широко распространена в популяции, но, по полученным нами результатам, не оказывает негативного влияния на трансмиссивность. Мутация *gyrA90_Ala->Val*, по полученным нами данным, также не оказывает негативного влияния на трансмиссивность и является одной из «перспективных» для вида при развитии устойчивости к фторхинолонам.

Также в исследование вошли 4 штамма сублинии T1 Евро-Американской линии. Все они были чувствительными к ПТП. Три штамма клинических: один часто встречающийся штамм (T1-2), отличающийся от прототипного сполиготипа на одну делецию (SIT172), и два редко встречающихся, один из которых отличается от прототипного сполиготипа на 1 делецию (T1-3), другой – на четыре (T1-1). Четвертый штамм сублинии T1 – лабораторный штамм H37Rv.

Два штамма сублинии LAM_RUS были одинакового сполиговарианта, но с разной структурой генов устойчивости к основным ПТП: один с чувствительным генотипом (LAM_RUS-1), другой (LAM_RUS-2) – с преШЛУ-генотипом, причем мутации в *rpoB* и в *gyrA*, по нашим данным, негативно влияют на трансмиссивность.

Штамм сублинии LAM9 был с «неклассическим» МЛУ-генотипом с мутацией *rpoB516_Asp->Val*, которая, по нашим данным, не оказывает негативного влияния на трансмиссивность.

Модель мультистресса

Традиционно фитнес штаммов *M. tuberculosis* в условиях *in vitro* характеризуют, сравнивая массивность роста штамма на среде с эталонным штаммом, например, сравнивая рост

лекарственно-устойчивого штамма с лекарственно-чувствительным. Считается, что чем выше массивность роста штамма на среде и соответственно лучше способность размножаться, тем выше фитнес.

Недостатком этой устоявшейся модели можно считать то, что о свойствах конкретного штамма *M. tuberculosis* судят при культивировании его в оптимальных условиях, что может не отражать ситуацию, с которой возбудитель ТБ сталкивается в макроорганизме, оказываясь в стрессовых для себя условиях. Исходя из этого, представлялось целесообразным изучить параметры роста культур *M. tuberculosis* при воздействии стрессовых факторов.

Разработке модели мультистресса предшествовал анализ литературы, описывающей эксперименты по воздействию на *M. tuberculosis* активных форм азота и кислорода в разных концентрациях.

Далее, основываясь на выбранных концентрациях, была проведена серия экспериментов, позволившая выбрать ту концентрацию активных форм азота/кислорода, воздействие которой давало возможность выявить различия между штаммами по характеру роста культуры непосредственно после воздействия стрессора, то есть такую концентрацию, которая не приводила к полной ингибции роста всех культур, но оказывала подавляющее воздействие на рост разной степени выраженности.

Для моделирования условий недостатка питательных веществ мы отказались от использования классической модели пересева культуры с богатой среды культивирования на фосфатный буфер, так как целью такой модели является перевод *M. tuberculosis* в некультивируемые формы. В нашу задачу не входило полностью ингибировать рост возбудителя, а планировалось создать такие условия недостатка питательных веществ, при которых рост культуры будет сохранен и будут получены межштаммовые различия по этому параметру. Поэтому для того, чтобы достичь недостатка по питательным веществам, среду Дюбо разводили физиологическим раствором в разном процентном соотношении и с такой панелью разведенных сред

проводили предварительные исследования по отбору разведения, на котором будут получены максимальные различия между штаммами по ростовым характеристикам.

Таким образом, для моделирования мультистресса (пероксинитритный стресс в условиях недостатка питательных веществ) были использованы следующие условия культивирования: 25% среда Дюбо с 6 мМ KNO_3 и 0,02% H_2O_2 . Этот вариант мультистресса был назван так, поскольку при взаимодействии активных форм азота и кислорода одним из метаболитов является пероксинитрит (OONO-), который является более бактерицидным, чем каждый из его предшественников по отдельности. Контролем в представленной модели служили штаммы *M. tuberculosis*, культивируемые в оптимальных условиях и в условиях нитрозирующего стресса (6мМ KNO_3).

При росте культур в оптимальных и стрессовых условиях были изучены следующие характеристики:

- 1) массивность роста культуры в стрессовых условиях на жидкой питательной среде Дюбо по сравнению с ростом в оптимальных условиях, что является классическим методом изучения жизнеспособности культуры;
- 2) визуальная оценка состояния клеток *M. tuberculosis* методом микроскопии мазка культуры с окраской по Цилю – Нильсену;
- 3) оценка секрета *M. tuberculosis* при росте в оптимальных и стрессовых условиях методом времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS).

Исходная концентрация бактериальной суспензии составила 5×10^3 КОЕ/мл. Воздействие стрессовых факторов на рост культуры определяли через 1 сутки, 12 суток и 20 суток воздействия.

Контроль роста культуры в условиях стресса через 1 сутки осуществляли посевом 10-кратных разведений бактериальной суспензии

контрольных и тестовых образцов на агар Дюбо с подсчетом микроколоний в день появления роста в контроле, через 12 и 20 суток – методом количественной полимеразно-цепной реакции (ПЦР). Оценку состояния культуры методом микроскопии проводили на 20-е сутки эксперимента, считывание секретома – на 12-е и 20-е сутки эксперимента.

Для определения относительной массивности роста штаммов в условиях стресса для каждого штамма было рассчитано отношение числа КОЕ *M. tuberculosis*, культивируемых в условиях стресса, к величине КОЕ *M. tuberculosis*, культивируемых в оптимальных условиях на каждый срок:

$$\text{Относительная массивность роста} = \frac{\text{Число КОЕ МБТК в условиях стресса}}{\text{Число КОЕ МБТК в оптимальных условиях}}$$

Критерии оценки роста культуры в условиях стресса приведены в таблице 7.2.

Таблица 7.2. Критерии оценки роста культуры *M. tuberculosis* в условиях стресса

№ п/п	Относительная массивность роста	Диапазон величин относительной массивности роста
1	Рост утрачен	0–0,20
2	Рост низкий	0,21–0,80
3	Рост сохранен	0,81–1,20
4	Рост выше среднего	1,21–1,60
5	Рост высокий	1,61–2,40
6	Рост очень высокий	выше 2,40

При микроскопии мазков культуры с окраской по Цилю – Нильсену были предложены критерии степени изменения морфологии микобактериальных клеток, описанные в таблице 7.3.

Таблица 7.3. Степени изменений морфологии микобактериальных клеток

Степень изменений	Состояние культуры	Соотношение в мазке клеток с разными тинкториальными свойствами в поле зрения		
		нормальные клетки	«зерна» ¹	«тени» ²
–	Типичная неизменная культура	100%	Нет	Нет
1	Минимальные изменения	Почти 100%	Единичные в поле зрения	Нет
2	Умеренные изменения	Нормальные клетки и «зерна» в равном соотношении		Нет
3	Значительные изменения	Около 25%	«Зерна» и «тени» в разном соотношении	
4	Абсолютные изменения	Нет	«Зерна» и «тени» в разном соотношении	

Результаты

Рост культуры *M. tuberculosis* в оптимальных и стрессовых условиях

Рост штаммов *M. tuberculosis* в оптимальных условиях

Количество выросших на среде колоний *M. tuberculosis* через 1 сутки культивирования в оптимальных условиях не отличалось достоверно от посевной дозы, поэтому о массивности роста штаммов в оптимальных условиях судили по числу КОЕ на 12-е и 20-е сутки (табл. 7.4).

¹ «Зерна» – при частичной потере кислотоустойчивости клетки визуализируются в виде цепочки «зерен» (участки сохраненной кислотоустойчивости), разделенные слабо окрашенными полосами.

² «Тени» – при полной потере кислотоустойчивости клетки микобактерий видны в мазке в виде «теней» в форме палочек, слабо окрашенных в фиолетово-малиновый цвет

Таблица 7.4. Массивность роста штаммов *M. tuberculosis*, культивируемых в оптимальных условиях

Код штамма	Число <i>M. tuberculosis</i> (КОЕ/мл)		
	1 сутки	12 суток	20 суток
Beijing_SIT1_WT-1	$4,30 \times 10^3$	$1,17 \times 10^6$	$1,02 \times 10^8$
Beijing_SIT1_WT-2	$4,20 \times 10^3$	$1,04 \times 10^6$	$7,50 \times 10^7$
Beijing_SIT1_WT-3	$5,20 \times 10^3$	$1,20 \times 10^6$	$9,45 \times 10^7$
Beijing_SIT1_WT-4	$3,00 \times 10^3$	$1,11 \times 10^6$	$9,24 \times 10^7$
Beijing_SIT1_katG315(Thr)	$8,10 \times 10^3$	$1,22 \times 10^6$	$1,02 \times 10^8$
Beijing_SIT1_katG315(Asn)	$6,10 \times 10^3$	$5,93 \times 10^5$	$5,30 \times 10^7$
Beijing_SIT1_katG315(Thr)_rpoB531(Leu)_HRE	$4,29 \times 10^3$	$1,02 \times 10^6$	$7,58 \times 10^7$
Beijing_SIT1_katG315(Thr)_rpoB531(Leu)_HREZ	$6,00 \times 10^3$	$1,14 \times 10^6$	$7,86 \times 10^7$
Beijing_SIT1_katG315(Thr)_rpoB531(Leu)_HREEth	$4,80 \times 10^3$	$7,08 \times 10^5$	$5,17 \times 10^7$
Beijing_SIT1_katG315(Thr)_rpoB526(Arg)_gyrA90(Val)	$5,00 \times 10^3$	$1,37 \times 10^6$	$8,91 \times 10^7$
T1_SIT1888_WT	$6,10 \times 10^3$	$7,53 \times 10^5$	$4,12 \times 10^7$
T1_SIT172_WT	$9,10 \times 10^3$	$5,00 \times 10^5$	$4,53 \times 10^7$
T1_SIT196_WT	$7,70 \times 10^3$	$7,43 \times 10^5$	$4,21 \times 10^7$
H37Rv_T1_SIT451_WT	$5,50 \times 10^3$	$5,46 \times 10^5$	$3,38 \times 10^7$
LAM_RUS_SIT254_WT	$4,80 \times 10^3$	$1,16 \times 10^6$	$4,56 \times 10^7$
LAM_RUS_SIT254_katG315(Thr)_inhA15(T)_rpoB526(Tyr)_gyrA94(Tyr)	$5,00 \times 10^3$	$7,36 \times 10^5$	$2,80 \times 10^7$
LAM9_SIT161_katG315(Thr)_inhA15(T)_rpoB516(Val)	$5,80 \times 10^3$	$1,24 \times 10^6$	$5,47 \times 10^7$

Массивность роста большинства штаммов *M. tuberculosis* Пекинской сублинии и большинства штаммов Евро-Американской с генами устойчивости к основным ПТП дикого типа, а также с мутациями, не влияющими на фитнес, была выше, чем у лабораторного штамма H37Rv в 1,8 раза и больше. Массивность роста штаммов *M. tuberculosis*

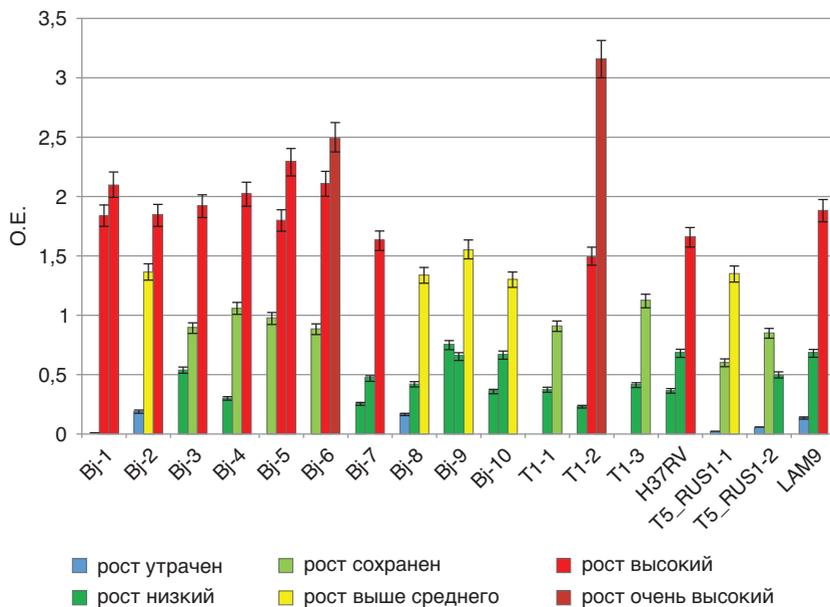
Пекинской сублинии с редкими мутациями в генах устойчивости и штаммов Евро-Американской линии сублинии T1 с генами устойчивости дикого типа была ниже, чем у H37Rv.

Рост штаммов *M. tuberculosis* в условиях стресса

Рост штаммов *M. tuberculosis* исследуемых филогенетических линий с различными детерминантами лекарственной устойчивости в условиях стресса (нитрозирующего стресса и мультистресса) различался.

Активные формы азота при моно-воздействии через сутки подавляли рост культуры, а потом рост культуры в присутствии этих стрессоров восстанавливался до контрольных значений, а у некоторых штаммов стимулировался (рис. 7.1А).

В условиях мультистресса происходило существенное подавление роста культуры, по сравнению с оптимальными условиями и по сравнению с монострессом (рис. 7.1Б).



А

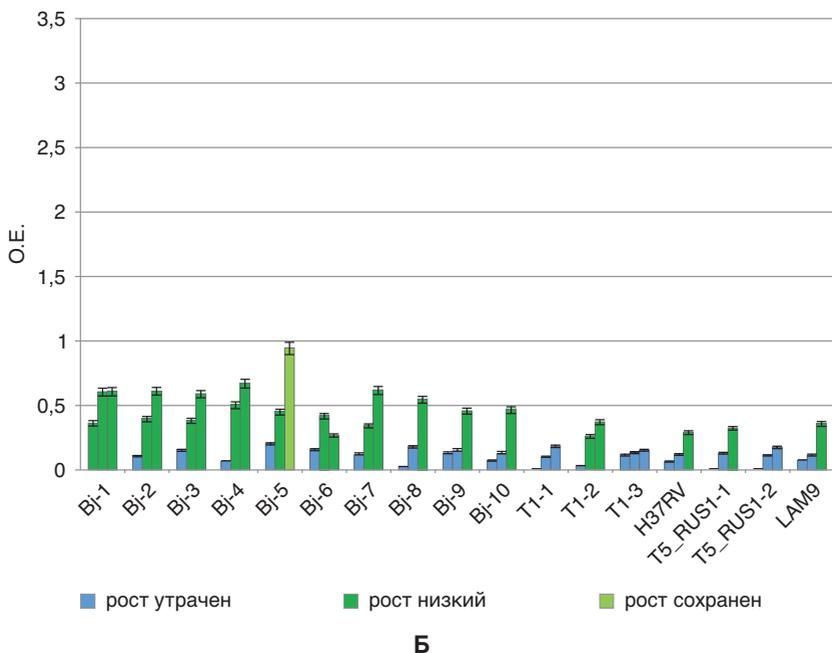


Рисунок 7.1. Рост штаммов *M. tuberculosis* в присутствии активных форма азота (А) и в условиях пероксинитритного стресса в комбинации с недостатком питательных веществ. (Б) Столбцы (слева-направо): 1-е сутки, 12-е сутки, 20-е сутки. О.Е. – относительные единицы

Как видно из рисунка 7.1, девять из десяти штаммов Пекинской сублинии, которые в оптимальных условиях отличались высокой массивностью роста, проявляли сходные черты в условиях нитрозирующего стресса, причем к 20-м суткам наблюдалась стимуляция роста культур по сравнению с ростом в оптимальных условиях. В условиях мультистресса, несмотря на сниженную массивность роста, показатели роста культуры этих штаммов или повышались в динамике или не менялись по отношению к росту культуры в оптимальных условиях.

Исключение из группы изученных штаммов Пекинской сублинии составлял только один штамм с «неклассическим» изониазид-резистентным генотипом, который имел редкую мутацию на уровне *katG* (*katG315_Ser->Asn*). Этот штамм медленнее, чем остальные

представители Пекинской сублинии, рос в оптимальных условиях, а в условиях пероксинитритного стресса при недостатке питательных веществ показатели роста культуры снижались по отношению к росту культуры в оптимальных условиях. В то же время в условиях нитрозирующего стресса этот штамм имел сходные показатели роста с другими штаммами Пекинской сублинии.

В группу штаммов Евро-Американской линии вошли *M. tuberculosis* разных сублиний и разных споллиговариантов, поэтому их реакция на стресс существенно различалась между собой. Так, штаммы сублинии T1 Евро-Американской линии были разных споллиговариантов, но все имели чувствительный генотип. У *M. tuberculosis* этой сублинии был показан большой диапазон реакций на стресс в зависимости от споллиговарианта. Например, широко распространенный споллиговариант SIT172, подобно штаммам Пекинской сублинии с чувствительным генотипом, демонстрировал стимуляцию роста в условиях нитрозирующего стресса даже на ранних сроках эксперимента. В условиях пероксинитритного стресса в сочетании с недостатком питательных веществ динамика роста этого штамма была отрицательной.

Рост лабораторного штамма H37Rv и штамма редкого споллиговарианта SIT1888 под действием активных форм азота и кислорода восстанавливался позже. Так, штамм SIT1888 при всех видах стресса имел очень низкие ростовые характеристики, и динамика роста культуры оставалась неизменной по отношению к росту культуры в оптимальных условиях. Относительный рост культуры лабораторного штамма H37Rv, относящегося к сублинии T1, в условиях нитрозирующего и пероксинитритного стрессов в сочетании с недостатком питательных веществ повышался в динамике. И, наконец, рост еще одного штамма сублинии T1 с редким споллиговариантом SIT196 имел сходные со штаммом SIT1888 параметры роста при нитрозирующем и пероксинитритном стрессе в сочетании с недостатком питательных веществ.

Два штамма сублинии LAM_RUS принадлежали к одному споллиговарианту, который широко распространен в популяции, но отличались по генотипической лекарственной устойчивости: один из них был

с чувствительным генотипом, другой – с преШЛУ-генотипом с редкими мутациями в генах *groB* и *gyrA*. Рост штамма с чувствительным генотипом к 20-м суткам стимулировался активными формами азота, а при мультистрессе демонстрировал очень низкий уровень роста по сравнению с ростом в оптимальных условиях. У штамма LAM_RUS с преШЛУ-генотипом в условиях нитрозирующего стресса и мультистресса ускорялось наступление стационарной фазы роста культуры.

Штамм сублинии LAM9, которая филогенетически близка LAM_RUS, с МЛУ-генотипом с мутациями, не оказывающими негативного влияния на фитнес, демонстрировал те же характеристики роста в условиях нитрозирующего стресса и мультистресса, что и штамм сублинии LAM_RUS с чувствительным генотипом.

Таким образом, в условиях мультистресса происходит существенное подавление роста культуры, по сравнению с оптимальными условиями и с монострессом, вне зависимости от принадлежности штаммов *M. tuberculosis* к определенной генетической линии и от характера генотипической лекарственной устойчивости. В целом массивность роста культуры в условиях стресса у штаммов *M. tuberculosis* Пекинской сублинии была выше, чем у штаммов *M. tuberculosis* Евро-Американской линии. Особенно ярко это проявлялось в условиях мультистресса. Расширение спектра лекарственной устойчивости или наличие мутаций, негативно влияющих на фитнес, ухудшало показатели роста культуры у представителей обеих линий.

Микроскопия клеток *M. tuberculosis* с окраской по Цилю – Нильсену

Микроскопия мазков культур, растущих в оптимальных условиях, не выявила морфологических отличий между исследуемыми штаммами к 20-м суткам эксперимента. Все клетки имели вид тонких, слегка изогнутых палочек, были прокрашены равномерно в малиново-красный цвет, располагались группами. Полученные результаты свидетельствуют о том, что все исследованные штаммы, вне

зависимости от принадлежности к генотипической линии и лекарственной чувствительности, при культивировании в оптимальных условиях в течение 20 суток сохраняли кислотоустойчивость.

При инкубировании в условиях стресса микроскопия мазков культур с окраской по Цилю – Нильсену на 20-е сутки эксперимента выявила клетки микобактерий как с сохраненной кислотоустойчивостью, так и с измененными тинкториальными свойствами в связи с частичной или полной утратой кислотоустойчивости (табл. 7.5).

Таблица 7.5. Морфология клеток *M. tuberculosis* в культуре после 20-дневной инкубации в условиях стресса

Код штамма	Степень изменений морфологии	
	нитро-зирующий стресс	мульти-стресс
Beijing_SIT1_WT-1	Нет	1
Beijing_SIT1_WT-2	Нет	Нет
Beijing_SIT1_WT-3	Нет	Нет
Beijing_SIT1_WT-4	1	1
Beijing_SIT1_katG315(Thr)	1	2
Beijing_SIT1_katG315(Asn)	1	3
Beijing_SIT1_katG315(Thr)_rpoB531(Leu)_HRE	3	2
Beijing_SIT1_katG315(Thr)_rpoB531(Leu)_HREZ	3	2
Beijing_SIT1_katG315(Thr)_rpoB531(Leu)_HREEth	2	2
Beijing_SIT1_katG315(Thr)_rpoB526(Arg)_gyrA90(Val)	2	2
T1_SIT1888_WT	2	3
T1_SIT172_WT	1	2
T1_SIT196_WT	1	2
H37Rv_T1_SIT451_WT	нет	1
LAM_RUS_SIT254_WT	2	3
LAM_RUS_SIT254_katG315(Thr)_inhA15(T)_rpoB526(Tyr)_gyrA94(Tyr)	4	4
LAM9_SIT161_katG315(Thr)_inhA15(T)_rpoB516(Val)	1	2

Как видно из таблицы 7.5, морфология клеток *M. tuberculosis* в культуре в условиях стресса, оцененная на 20-е сутки эксперимента, у ряда изученных штаммов была изменена. Тот факт, что в контроле ни в одном исследуемом случае не было выявлено потери культурой кислотоустойчивости на 20-й день, свидетельствует о том, что изменения морфологии клеток являются специфической реакцией штаммов *M. tuberculosis* на культивирование в стрессовых условиях.

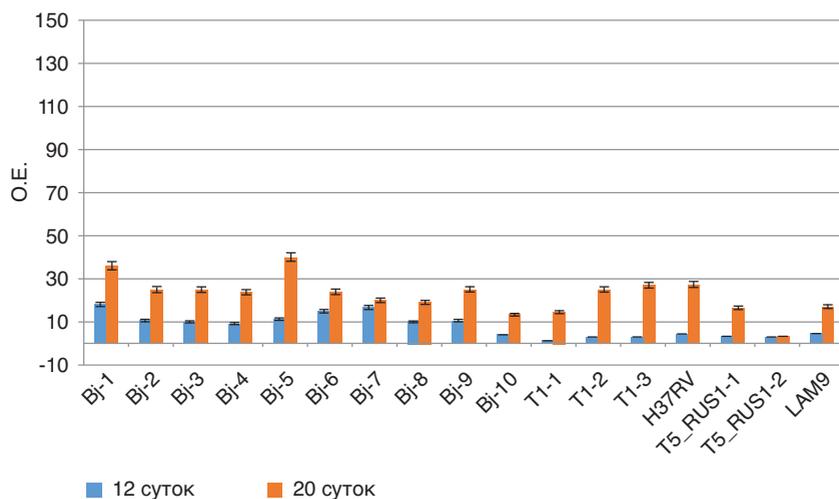
Изменения морфологии клеток в культуре в условиях стресса были ассоциированы с динамикой роста культуры. Если показатели роста культуры или повышались в динамике, или не менялись по отношению к росту культуры в оптимальных условиях, и массивность роста при этом была достаточно высокой, изменения клеток в культуре отсутствовали или были незначительными. У штаммов *M. tuberculosis* с отрицательной динамикой роста изменение морфологии клеток было выраженным.

Утрата микобактериями кислотоустойчивости, или парадокс Коха, как полагают, может быть связан с переходом *M. tuberculosis* в нереплицирующую форму. Вероятно, в тех случаях, когда были выявлены существенные изменения тинкториальных свойств клеток в культуре, культура была близка к стационарной фазе роста или, в случае сильных изменений, стационарная фаза роста уже наступила.

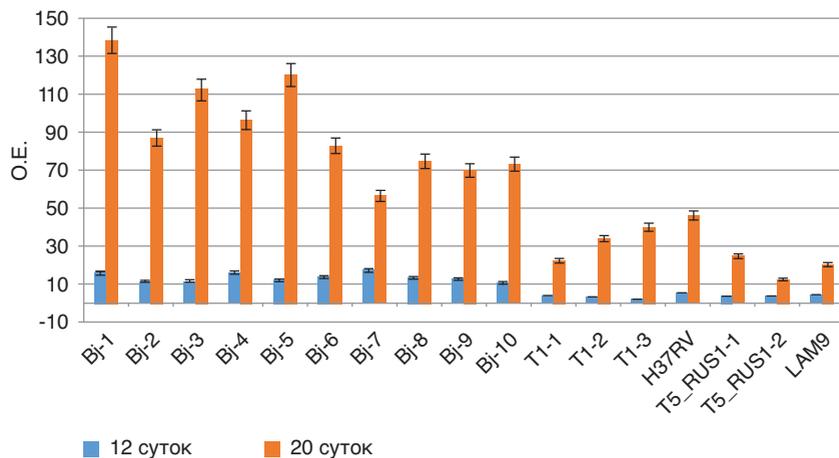
Секретом *M. tuberculosis* при росте в оптимальных и стрессовых условиях

При изучении секретомов клеток *M. tuberculosis*, культивируемых в оптимальных условиях и в условиях стресса, было выявлено 6 белков молекулярной массой 3,89, 13,40, 16,78, 22,32, 33,50 и 66,50 кДа. Особенностью секретома *M. tuberculosis*, культивируемых в присутствии активных форм азота и в условиях мультистресса, было существенное повышение содержания белка 3,89 кДа (рис. 7.2) по сравнению с культивированием в оптимальных условиях, когда уровень

секреции белка 3,89 кДа был сходным у всех штаммов на оба срока исследования (12-е и 20-е сутки) и не превышал 3 О.Е.



А



Б

Рисунок 7.2. Уровень секреции белка 3,89 кДа штаммами *M. tuberculosis* в условиях нитрозирующего стресса (А) и пероксинитритного стресса в комбинации с недостатком питательных веществ (Б). О.Е. – относительные единицы

Как видно из рисунка 7.2, в условиях пероксинитритного стресса в сочетании с недостатком питательных веществ к 20-м суткам эксперимента у штаммов *M. tuberculosis* Пекинской сублинии был отмечен очень высокий уровень секреции белка 3,89 кДа, даже у штамма с изониазид-резистентным генотипом с редкой мутацией в *katG*. У штаммов *M. tuberculosis* Евро-Американской линии в этих же условиях подъем уровня секреции белка 3,89 кДа к 20-м суткам был не столь значительным и больше соответствовал уровню секреции, показанному при нитрозирующем стрессе и нитрозирующем стрессе в сочетании с недостатком питательных веществ.

Важно отметить, что повышение секреции белка 3,89 кДа у *M. tuberculosis* Пекинской сублинии наступает на более ранние сроки, чем у *M. tuberculosis* Евро-Американской линии.

Обсуждение

При изучении адаптации *M. tuberculosis* разных генотипических линий и лекарственной устойчивости к условиям как моно-стресса, вызванного активными формами азота, так и к условиям мульти-стресса, созданного комбинацией активных форм азота, кислорода и обедненной питательной среды, было показано, что в условиях стресса у *M. tuberculosis* изменяются параметры роста культуры, морфология клеток, соотношение количества белков в секретоме.

Приведенные в литературе данные по изучению адаптации к условиям нитрозирующего стресса также показали, что штаммы *M. tuberculosis* различаются между собой по чувствительности к активным формам азота. Например, в исследовании Chan et al. было показано, что химически сгенерированные активные формы азота в концентрациях от 1,0 до 10 мМ являются бактерицидными по отношению к *M. tuberculosis* Erdman *in vitro* [12]. В других работах было отмечено, что активные формы азота оказывают на *M. tuberculosis* не бактерицидное, а бактериостатическое действие [18, 35]. Для некоторых штаммов *M. tuberculosis* было показано, что их устойчивость

к активным формам азота при культивировании *in vitro* значительно выше, чем у других штаммов [18, 23]. Также был описан эффект стимуляции роста культуры лабораторных и клинических штаммов *M. tuberculosis* в условиях нитрозирующего стресса, но генотипическую принадлежность исследованных штаммов авторы не устанавливали, поэтому сравнить полученные нами результаты с литературными данными не представляется возможным [10].

При изучении секретомов клеток *M. tuberculosis*, культивируемых в оптимальных условиях и в условиях стресса, было выявлено 6 основных белков молекулярной массы: 3,89, 13,40, 16,78, 22,32, 33,50 и 66,50 кДа. Особенностью секретомов *M. tuberculosis*, культивируемых в присутствии активных форм азота и в условиях мультистресса, было значительное повышение секреции белка 3,89 кДа, что ассоциировалось с восстановлением жизнеспособности *M. tuberculosis* в условиях стресса. Было показано, что повышение секреции белка 3,89 кДа у штаммов *M. tuberculosis* Пекинской сублинии наступает в более ранние сроки, чем у *M. tuberculosis* Евро-Американской линии. При наличии в среде пероксинитрита, обладающего очень сильной повреждающей способностью в отношении клеток *M. tuberculosis*, секреция белка 3,89 кДа у *M. tuberculosis* Пекинской сублинии достигает крайне высоких значений, превышающих базовый уровень секреции в 50–100 раз, в то время как у *M. tuberculosis* Евро-Американской линии уровень секреции этого белка остается таким же, как и при нитрозирующем стрессе.

В открытой базе данных последовательностей белков UNIPROT (<https://www.uniprot.org>) были выявлены секретируемые белки микобактерий, имеющие сходную молекулярную массу с белками, выявленными нами методом масс-спектрометрии. Однако однозначно идентифицировать выявленные нами белки секретома было невозможно, так как в рамках этого исследования аминокислотный анализ белков не проводился. Следует отметить, что белки молекулярной массой 3,89 кДа в базе данных UNIPROT представлены не были. Ближайший по массе из представленных в базе данных

белков – белок 3489,89 Да (Rv1089A) – задействован в пути превращения целлюлозы в глюкозу и, следовательно, не может быть задействован *M. tuberculosis* в условиях стресса, вызванного активными формами азота. Следовательно, можно заключить, что белок 3,89 кДа был выявлен нами впервые.

Для понимания роли этого белка в адаптации штаммов *M. tuberculosis* к условиям стресса нужно учитывать, что для выживания в иммунологически активированных макрофагах *M. tuberculosis* в процессе эволюции выработали различные стратегии, в частности, направленные на подавление выработки активных форм азота клетками хозяина, их детоксикацию или восстановление повреждений, возникающих вследствие воздействия активных форм азота [34, 43]. Так как повышение секреции белка 3,89 кДа было установлено нами в модели *in vitro*, то участие этого белка в механизме протекции, направленном на синтез активных форм азота клетками хозяина, можно исключить, но участие в двух других механизмах защиты клеток микобактерий представляется весьма вероятным. В целом изучение роли этого белка для адаптации *M. tuberculosis* на культуре макрофагов и в мышинной модели, а также установление его аминокислотной структуры, моделирование последовательности кодирующего его гена и локализация гена в геноме *M. tuberculosis* может быть перспективным направлением для дальнейших исследований. С учетом того что белок 3,98 кДа важен для адаптации *M. tuberculosis* к стрессу, вызванному активными формами азота, возможно, он может послужить мишенью для создания новых **противотуберкулезных препаратов**, направленных на снижение адаптации *M. tuberculosis* к выживанию в макроорганизме.

Заключение

В результате проведенного исследования было установлено, что характеристики роста штаммов *M. tuberculosis* в оптимальных условиях не всегда сохраняются в условиях стресса: штаммы

с массивным ростом в оптимальных условиях культивирования в условиях стресса могли демонстрировать существенное снижение роста и наоборот. Из этого следует, что традиционный подход к определению уровня жизнеспособности штаммов *M. tuberculosis* по массивности роста на среде в оптимальных условиях не может считаться адекватной моделью для описания биологических свойств возбудителя.

При изучении адаптации *M. tuberculosis* разных генотипических линий и ЛУ к условиям как моностресса, так и к условиям мультистресса было показано, что в условиях стресса у *M. tuberculosis* изменяются параметры роста культуры, морфология клеток, соотношение количества секретируемых белков.

Приспособленность к условиям стресса у штаммов *M. tuberculosis* ассоциирована со сполиговариантом и генотипической ЛУ. В целом можно отметить, что штаммы *M. tuberculosis* часто встречаемых сполиговариантов с чувствительным генотипом или с мутациями в генах устойчивости к основным ПТП, не ухудшающими фитнес, хорошо адаптируются к условиям стресса *in vitro*.

Штаммы *M. tuberculosis* с редкими мутациями в генах, ассоциированных с устойчивостью к основным ПТП, а также с расширенным спектром фенотипической ЛУ хуже адаптируются к условиям стресса, особенно мультистресса, что выражается в более позднем начале роста культуры и раннем наступлении стационарной фазы роста, что сопровождается частичной утратой кислотоустойчивости клеток в культуре.

Штаммы *M. tuberculosis* Пекинской сублинии адаптируются к стрессу в более ранние сроки, чем *M. tuberculosis* Евро-Американской линии, особенно ярко это проявлялось в модели мультистресса.

Модель мультистресса для изучения особенностей адаптации *M. tuberculosis* к условиям стресса была разработана и применена впервые и может быть полезна для проведения как фундаментальных, так и прикладных исследований во фтизиатрии.

Литература

1. Андреевская С.Н., Черноусова Л.Н., Смирнова Т.Г. и др. Влияние генотипа *M. tuberculosis* на выживаемость мышей при экспериментальном туберкулезе. *Пробл туб и болезн легк.*, 2007;(7):45–50.
2. Андреевская С.Н., Черноусова Л.Н., Смирнова Т.Г. и др. Трансмиссия штаммов микобактерий туберкулеза, обусловленная миграционными процессами в Российской Федерации (на примере миграции населения из кавказского региона в Москву и Московскую область), *Пробл туб и болезн легк.*, 2006;(1):29–35.
3. Сурикова О.В., Войтих Д.В., Курунов Ю.Н. Опыт использования VNTR-типирования: *Mycobacterium tuberculosis* для решения клинических задач: контроля за качеством лечения и работой лабораторной службы. *Молекул генетика, микробиология и вирусология*, 2005;(2):21–24.
4. Черноусова Л.Н., Голышевская В.И., Ерохин В.В. и др. Преобладание штаммов *Mycobacterium tuberculosis* семейства Beijing и факторы риска их трансмиссии в Самарской области. *Пробл туб и болезн легк.*, 2006;(2):31–37.
5. Ballif M., Harino P., Ley S. et al. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Madang, Papua New Guinea. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2012;16(8):1100–1107, doi: 10.5588/ijtld.11.0779
6. Behr M.A. Comparative genomics of mycobacteria: some answers, yet more new questions. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2014;5(2): a021204, doi: 10.1101/cshperspect.a021204.
7. Bifani P.J., Mathema B., Kurepina N.E., Kreiswirth B.N. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains. *Trends Microbiol*, 2002;10(1):45–52, doi: 10.1016/s0966–842x(01)02277–6
8. Brites D., Gagneux S. Co-evolution of *Mycobacterium tuberculosis* and *Homo sapiens*. *Immunol Rev*, 2015;264(1):6–24, doi: 10.1111/imr.12264

9. *Brudey K., Driscoll J.R., Rigouts L. et al.* Mycobacterium tuberculosis complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol*, 2006;6:23, doi: 10.1186/1471-2180-6-23
10. *Brugmann W.B., Firmani M.A.* Low concentrations of nitric oxide exert a hormetic effect on Mycobacterium tuberculosis in vitro. *J Clin Microbiol*, 2005;43(9):4844-4846, doi: 10.1128/JCM.43.9.4844-4846.2005
11. *Chaidir L., Sengstake S., de Beer J. et al.* Mycobacterium tuberculosis genotypic drug resistance patterns and clustering in Jayapura, Papua, Indonesia. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2015;19(4):428-433, doi: 10.5588/ijtld.14.0350
12. *Chan J., Xing Y., Magliozzo R.S., Bloom B.R.* Killing of virulent Mycobacterium tuberculosis by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J Exp Med*. 1992;175(4):1111-1122, doi: 10.1084/jem.175.4.1111
13. *Couvin D., David A., Zozio T., Rastogi N.* Macro-geographical specificities of the prevailing tuberculosis epidemic as seen through SITVIT2, an updated version of the Mycobacterium tuberculosis genotyping database. *Infect Genet Evol*, 2019;72:31-43, doi: 10.1016/j.meegid.2018.12.030
14. *Dye C., Williams B.G., Espinal M.A., Raviglione M.C.* Erasing the world's slow stain: strategies to beat multidrug-resistant tuberculosis. *Science*, 2002;295(5562):2042-2046, doi: 10.1126/science.1063814
15. *Ehrt S., Schnappinger D.* Mycobacterial survival strategies in the phagosome: defence against host stresses. *Cell Microbiol*. 2009;11(8):1170-1178, doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01335.x
16. *Ejo M., Torrea G., Uwizeye C. et al.* Genetic diversity of the Mycobacterium tuberculosis complex strains from newly diagnosed tuberculosis patients in Northwest Ethiopia reveals a predominance of East-African-Indian and Euro-American lineages. *Int J Infect Dis*, 2021;103:72-80, doi: 10.1016/j.ijid.2020.11.129

17. *Firdessa R., Berg S., Hailu E. et al.* Mycobacterial lineages causing pulmonary and extrapulmonary tuberculosis, Ethiopia. *Emerg Infect Dis*, 2013;19(3):460–463, doi: 10.3201/eid1903.120256
18. *Firmani M.A., Riley L.W.* Reactive nitrogen intermediates have a bacteriostatic effect on *Mycobacterium tuberculosis* in vitro. *J Clin Microbiol*, 2002;40(9):3162–3166, doi: 10.1128/JCM.40.9.3162–3166.2002
19. *Gagneux S., DeRiemer K., Van T. et al.* Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006;103(8):2869–2873, doi: 10.1073/pnas.0511240103
20. *Gagneux S., Long C.D., Small P.M.* The competitive cost of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, 2006;312(5782):1944–1946, doi: 10.1126/science.1124410
21. *Haile B., Tafess K., Zewude A.* Spoligotyping and drug sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from pulmonary tuberculosis patients in the Arsi Zone of southeastern Ethiopia. *New Microbes New Infect*, 2019;33:100620, doi: 10.1016/j.nmni.2019.100620
22. *Hershberg R., Lipatov M., Small P.M. et al.* High functional diversity in *Mycobacterium tuberculosis* driven by genetic drift and human demography. *PLoS Biol*, 2008;6(12): e311, doi: 10.1371/journal.pbio.0060311
23. *Idh J., Mekonnen M., Abate E. et al.* Resistance to first-line anti-TB drugs is associated with reduced nitric oxide susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One*, 2012;7(6): e39891, doi: 10.1371/journal.pone.0039891
24. *Kalscheuer R., Palacios A., Anso I.* The *Mycobacterium tuberculosis* capsule: a cell structure with key implications in pathogenesis. *Biochem J*, 2019;476(14):1995–2016, doi: 10.1042/BCJ20190324
25. *Kulaga S., Behr M., Musana K.* Molecular epidemiology of tuberculosis in Montreal, *CMAJ*, 2002;167(4):353–354

26. Langlois-Klassen D., Senthilselvan A., Chui L. et al. Transmission of Mycobacterium tuberculosis Beijing Strains, Alberta, Canada, 1991–2007. *Emerg Infect Dis*, 2013;19(5):701–711, doi: 10.3201/eid1905.121578
27. López B., Aguilar D., Orozco H. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different Mycobacterium tuberculosis genotypes. *Clin Exp Immunol*, 2003;133(1):30–37, doi: 10.1046/j.1365–2249.2003.02171.x
28. Manca C., Reed M.B., Freeman S. et al. Differential monocyte activation underlies strain-specific Mycobacterium tuberculosis pathogenesis. *Infect Immun*, 2004;72(9):5511–5514, doi: 10.1128/IAI.72.9.5511–5514.2004
29. Mariam D.H., Mengistu Y., Hoffner S.E., Andersson D.I. Effect of rpoB mutations conferring rifampin resistance on fitness of Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004;48(4):1289–1294, doi: 10.1128/AAC.48.4.1289–1294.2004
30. Mokrousov I. Emerging resistant clone of Mycobacterium tuberculosis in west Asia. *Lancet Infect Dis*, 2016;16(12):1326–1327, doi: 10.1016/S1473–3099(16)30460–1
31. Mokrousov I. Insights into the origin, emergence, and current spread of a successful Russian clone of Mycobacterium tuberculosis. *Clin Microbiol Rev*, 2013;26(2):342–360, doi: 10.1128/CMR.00087–12
32. Mokrousov I. Mycobacterium tuberculosis phylogeography in the context of human migration and pathogen’s pathobiology: Insights from Beijing and Ural families. *Tuberculosis (Edinb)*. 2015;95Suppl 1: S167–176, doi: 10.1016/j.tube.2015.02.031
33. Pasechnik O., Vyazovaya A., Vitriv S. et al. Major genotype families and epidemic clones of Mycobacterium tuberculosis in Omsk region, Western Siberia, Russia, marked by a high burden of tuberculosis-HIV coinfection. *Tuberculosis (Edinb)*, 2018;108:163–168, doi: 10.1016/j.tube.2017.12.003

34. Peddireddy V., Doddam S.N., Ahmed N. Mycobacterial Dormancy Systems and Host Responses in Tuberculosis. *Front Immunol*, 2017;8:84, doi: 10.3389/fimmu.2017.00084
35. Rhoades E.R., Orme I.M. Susceptibility of a panel of virulent strains of Mycobacterium tuberculosis to reactive nitrogen intermediates. *Infect Immun*, 1997;65(4):1189–1195, doi: 10.1128/iai.65.4.1189–1195.1997
36. Roycroft E., O’Toole R.F., Fitzgibbon M.M. et al. Molecular epidemiology of multi- and extensively-drug-resistant Mycobacterium tuberculosis in Ireland, 2001–2014. *J Infect*, 2018;76(1):55–67, doi: 10.1016/j.jinf.2017.10.002
37. Rufai S.B., Sankar M.M., Singh J., Singh S. Predominance of Beijing lineage among pre-extensively drug-resistant and extensively drug-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis: A tertiary care center experience. *Int J Mycobacteriol*, 2016;5 Suppl 1: S197-S198, doi: 10.1016/j.ijmyco.2016.07.005
38. Serafini A., Tan L., Horswell S. et al. Mycobacterium tuberculosis requires glyoxylate shunt and reverse methylcitrate cycle for lactate and pyruvate metabolism. *Mol Microbiol*, 2019;112(4):1284–1307, doi: 10.1111/mmi.14362
39. Tounoussova O.S., Caugant D.A., Sandven P. et al. Impact of drug resistance on fitness of Mycobacterium tuberculosis strains of the W-Beijing genotype. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2004;42(3):281–290, doi: 10.1016/j.femsim.2004.05.012
40. Umpeleva T., Belousova K., Golubeva L. et al. Molecular characteristics of Mycobacterium tuberculosis in the “closed” Russian town with limited population migration. *Infect Genet Evol*, 2020;79:104174, doi: 10.1016/j.meegid.2020.104174
41. Vinogradova T., Dogonadze M., Zabolotnykh N. et al. Extremely lethal and hypervirulent Mycobacterium tuberculosis strain cluster emerging in Far East, Russia. *Emerg Microbes Infect*, 2021;10(1):1691–1701, doi: 10.1080/22221751.2021.1967704

42. Wirth T., Hildebrand F., Allix-Béguec C. et al. Origin, spread and demography of the Mycobacterium tuberculosis complex. *PLoS Pathog*, 2008;4(9): e1000160, doi: 10.1371/journal.ppat.1000160
43. Yang C.S., Yuk J.M., Jo E.K. The role of nitric oxide in mycobacterial infections. *Immune Netw*, 2009;9(2):46–52, doi: 10.4110/in.2009.9.2.46
44. Zaczek A., Brzostek A., Augustynowicz-Kopec E. et al. Genetic evaluation of relationship between mutations in rpoB and resistance of Mycobacterium tuberculosis to rifampin. *BMC Microbiol*, 2009;9:10. doi: 10.1186/1471–2180–9–10
45. Zanini F., Carugati M., Schiroli C. et al. Mycobacterium tuberculosis Beijing family: analysis of the epidemiological and clinical factors associated with an emerging lineage in the urban area of Milan. *Infect Genet Evol*, 2014;25:14–19, doi: 10.1016/j.meegid.2014.03.021

8. Новые отечественные противотуберкулезные препараты-кандидаты: **Т**риазен-индолы и бензатиазины

Никоненко Б.В., Майоров К.Б., Шлеева М.О., Бочарова И.В., Стержанова Н.В., Макаров В.А., Вележева В.С.

Введение

Разработка, испытание и внедрение новых ПТП является крайне актуальной задачей, особенно в свете постоянного роста лекарственно-устойчивых МБТ. Процесс создания ПТП от химического синтеза до внедрения в клинику занимает довольно много времени, порядка 15 лет [15]. Кроме того, вопрос о влиянии генетики хозяина на эффективность противотуберкулезной ХТ исследован недостаточно, хотя является крайне важным. Популяция человека генетически неоднородна, и, кроме генетической детерминированности в восприимчивости к туберкулезной инфекции, ответ конкретной особи на лечение также может зависеть от генетических факторов.

В отделе иммунологии ФГБНУ «ЦНИИТ» проводятся доклинические испытания двух классов соединений с противотуберкулезной активностью. Это триазен-индолы и бензатиазины.

Триазен-индолы

В лаборатории гетероциклических соединений Института элементоорганических соединений РАН синтезировано более 300 индолпиразиновых соединений с предполагаемой противотуберкулезной

активностью [16]. Самыми активными среди них оказались так называемые триазены – соединения, где индольная группа соединена с тем или иным заместителем через цепочку из трех атомов азота (рис. 8.1).

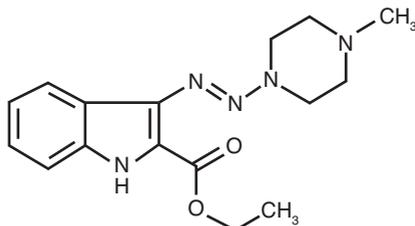


Рисунок 8.1. Химическая формула триазен-индола TU112

Такие соединения показали уровень **МИК**, равную или меньшую 0,1 мкг/мл в отношении не только музейного штамма *Mycobacterium tuberculosis* H3Rv, но и изолята, устойчивого к изониазиду [8, 9]. Кроме того, некоторые из триазенов обладают высокой активностью в отношении *Mycobacterium avium* [10]. Кроме того, некоторые триазен-индолы показали активность против dormantных форм МБТ, превосходящую таковую изониазида и рифампицина в несколько тысяч раз. Для повышения внутримакрофагальной активности соединения TU112 и TU276 были химически модифицированы присоединением жирной цепочки 1-Octanol ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{OH}$), что привело к значительному повышению активности соединений против *M. tuberculosis* H3Rv, инкорпорированных в макрофаги мыши [5]. К сожалению, эти соединения нерастворимы в воде и при доставке **per os** имеют низкую биодоступность в мышинной модели экспериментального ТБ.

Для приготовления водорастворимой формы триазенов и преодоления плохой биодоступности мы использовали подход, описанный ранее [12]. Для приготовления растворимой формы нерастворимых в воде ПТП может быть использован водорастворимый аналог витамина Е α -tocopherilpropilenglycol 1000 succinate (TPGS) [12]. Что касается доставки соединения, было использовано внутривенное

и ингаляционное введение. Результат оценивали по активности сыворотки крови мышей и супернатанта легких против культуры *M. tuberculosis in vitro*, так называемому анализу serum titration assay [13].

Результаты такого тестирования показали способность сыворотки крови и легочного супернатанта подавлять рост суспензии *M. tuberculosis* в жидкой питательной среде [5]. По последним данным, при внутривенном введении соединения TU112, растворенного в TPGS, имело место подавление роста *M. tuberculosis* в органах зараженных мышей. Таким образом, триазен-индолы являются перспективными соединениями для использования при парантеральном введении. Работа с другими триазенами продолжается для получения соединений, доступных при доставке *in vivo*.

Бензотиазиноны

Соединение PBTZ169 – противотуберкулезный препарат-кандидат, синтезирован в лаборатории биомедицинской химии ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН (рис. 8.2.) [6].

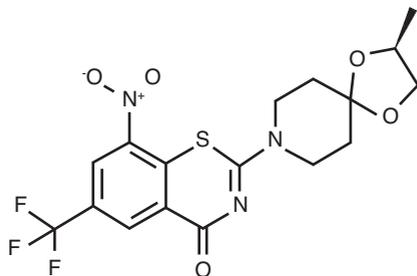


Рисунок 8.2. Химическая формула соединения PBTZ169

Пиперазинобензотиазинон (piperazinobenzothiazinone) PBTZ169 произведен химическими модификациями из бензотиазина – нового класса антимикобактериальных препаратов. Имеет высокую

активность *in vitro* и *in vivo* у мышей против *M. tuberculosis* с **минимальной ингибирующей концентрацией (МИК) = 0,0001 $\mu\text{г}/\text{мл}$** . Мишень для этого препарата – DprE1, важный фермент биосинтеза клеточной стенки МБТ. Обладает активностью как против музейных штаммов МБТ, так и против штаммов с МЛУ и ШЛУ [14].

В настоящее время препарат проходит вторую фазу клинических испытаний в России и Швейцарии. Четыре недели лечения мышей, зараженных *M. tuberculosis*, снижают бактериальную нагрузку в легких и селезенке в степени близкой к таковой для изониазида и рифампицина соответственно в используемых концентрациях. Дополнительные результаты показывают, что эффективность бензатазинов зависит скорее от времени, чем от дозы. Острые (5 г/кг) и хронические (25 и 250 мг/кг) токсикологические исследования на неинфицированных мышах показывают, что даже при самой высокой испытанной дозе через месяц не наблюдалось никаких неблагоприятных анатомических, поведенческих или физиологических эффектов.

В работе, проводимой в отделе иммунологии ФГБНУ «ЦНИИТ», была исследована эффективность соединения RBTZ169 при использовании набора инбредных линий мышей и гибридов F1, представляющих спектр генетически детерминированной чувствительности/устойчивости к туберкулезной инфекции. Среди них – сверхвосприимчивые мыши I/St и оппозитные к ним устойчивые C57BL/6 [4, 7], конгенные по аллелям гена *H2A* мыши [3], мыши, в легких которых при развитии туберкулезной инфекции формируются гипоксические/некротические участки, затрудняющие действие ПТП [2], сверхустойчивые гибриды (AKRxl/St)F1. В итоге было показано, что соединение RBTZ169 высокоэффективно в мышах с любым уровнем первичной устойчивости к инфекции *M. tuberculosis*, но с некоторыми особенностями. Как и в других моделях [1, 10, 11], наибольшая эффективность имела место в наиболее восприимчивых мышах. Это продемонстрировано как на мышах оппозитных линий I/St (*H2A*^a) и C57BL/6 (*H2A*^b), так и на мышах конгенных линий B6.I-100 (*H2A*^a) и B6.I-139 (*H2A*^b).

Литература

1. Driver E.R., Ryan G.J., Hoff D.R. et al. Evaluation of a mouse model of necrotic granuloma formation using C3HeB/FeJ mice for testing of drugs against Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:3181–3195, doi: 10.1128/AAC.00217–12
2. Kondratieva E., Logunova N., Majorov K. et al. Host genetics ingranuloma formation: human-like lung pathology in mice with reciprocal genetic susceptibility to M. tuberculosis and M. avium. *PLoS One.* 2010; 5(5): e10515, doi: 10.1371/journal.pone.0010515
3. Logunova N., Korotetskaya M., Polshakov V., Apt A. The QTL within the H2 complex involved in the control of tuberculosis infection in mice is the classical class II H2-Ab1 gene. *PLoS Genet*, 2015;11: e1005672, doi: 10.1371/journal.pgen.1005672
4. Lyadova I.V., Eruslanov E.B., Khaidukov S.V. et al. Comparative analysis of T lymphocytes recovered from the lungs of mice genetically susceptible, resistant, and hyperresistant to Mycobacterium tuberculosis-triggered disease. *J Immunol*, 2000;165(10):5921–31.
5. Majorov K.B., Nikonenko B.V., Ivanov P.Yu. et al. Structural Modifications of 3-Triazeneindoles and Their Increased Activity Against Mycobacterium tuberculosis. *Antibiotics (Basel)*, 2020;9:356, doi: 10.3390/antibiotics9060356
6. Makarov V., Manina G., Mikusova K. et al. Benzothiazinones kill Mycobacterium tuberculosis by blocking arabinan synthesis. *Science*, 2009;324(5928):801–804, doi: 10.1126/science.1171583
7. Nikonenko B.V., Averbakh M.M. Jr., Lavebratt C. et al. Comparative analysis of mycobacterial infection in susceptible I/St and resistant A/Sn inbred mice. *Tubercle and Lung Disease*, 2000;80 (1):15–25.
8. Nikonenko B.V., Bocharova I.V., Korotetskaya M.V. et al. Efficacy of isoniazid therapy in mice with different genetic susceptibility to infection. *Mycobact Dis*, 2017;7(4);1–4, doi: 104172/2161–1068.1000251

9. Nikonenko B.V., Kornienko A., Majorov K. et al. In vitro Activity of 3-Triazeneindoles against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016;60(10):6422–6424, doi: 10.1128/AAC.00998–16
10. Nikonenko B.V., Apt A.S., Velezheva V.S. Activity of new indol derivates against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* in HIV combined mecobacteriosis. *J Bacteriol Parasitol*, 2017;8(6):52.
11. Nikonenko B.V., Einck L., Nacy C.A. Anti-tuberculosis drug therapy in mice of different inbred strains. *Infect Genet Evol*, 2010;10(7):1151–1154, doi: 10.1016/j.meegid.2010.07.014
12. Nikonenko B., Reddy V.M., Bogatcheva E. et al. Therapeutic efficacy of SQ641-NE against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014;58(1):587–589.
13. Onajole O.K., Pieroni M., Tipparaju S.K. et al. Preliminary structure-activity relationships and biological evaluation of novel antitubercular indolecarboxamide derivatives against drug-susceptible and drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J Med Chem*, 2013;56(10):4093–103, doi: 10.1021/jm4003878
14. Rybniker J., Chen J.M., Sala C. et al. Anticytolytic screen identifies inhibitors of mycobacterial virulence protein secretion. *Cell Host Microbe*, 2014;16(4):538–548, doi: 10.1016/j.chom.2014.09.008
15. Sacksteder K.A., Protopopova M., Barry C.E. 3rd et al. Discovery and development of SQ109: a new antitubercular drug with a novel mechanism of action. *Future Microbiol*, 2012;7(7):823–837, doi: 10.2217/fmb.12.56
16. Velezheva V., Brennan P., Ivanov P. et al. Synthesis and antituberculosis activity of indole-pyridine derived hydrazides, hydrazide-hydrazones, and thiosemicarbazones. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016;26:978–985, doi: org/10.1016/j.bmcl.2015.12.049

Научное издание

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВО ФТИЗИАТРИИ II

Научные редакторы:

И.Э. Степанян, Н.Г. Хмелькова

Редактор *Е.В. Шишло*

Художник *Н.Л. Лисицына*

Компьютерная верстка *М.В. Поташкин*

Подписано в печать 00.00.2024. Формат 60 × 90^{1/16}.

Гарнитура CharterITC. Печать офсетная.

Печ. л. . Усл. печ. л. . Тираж экз. Заказ № .

Учредитель: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»

Издатель: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»

Адрес редакции: 107564, Москва, Яузская аллея, д. 2

Тел.: +7 (499) 169-99-51, +7 (499) 780-46-75

ctri-bul@mail.ru

Отпечатано в ООО «Центр полиграфических услуг «Радуга»»

Тел.: +7 (495) 252-75-10

<http://www.raduga-print.ru>