

УДК 616.24-002.5: 579.873.21: 57.022

АДАПТАЦИЯ К МУЛЬТИСТРЕССУ *IN VITRO* ШТАММОВ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* ВОСТОЧНО-АЗИАТСКОЙ И ЕВРО-АМЕРИКАНСКОЙ ЛИНИЙ, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ

С.Н. Андреевская¹, Т.Г. Смирнова¹, Е.Е. Ларионова¹, Л.Н. Черноусова¹, А.Э. Эргешов^{1,2}¹ ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», г. Москва² ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России, г. Москва

С целью изучения адаптации *in vitro* штаммов *M. tuberculosis* различных филогенетических линий и лекарственной устойчивости в условиях мультистресса, созданного недостатком питательных веществ, активными формами азота и кислорода, было исследовано 17 штаммов *M. tuberculosis*: 10 штаммов Восточно-Азиатской линии Пекинской сублинии и 7 штаммов Евро-Американской линии. Изучали массивность роста культуры, состояние клеток *M. tuberculosis* в культуре, а также секретом культивируемых штаммов в условиях мультистресса, нитрозирующего стресса и в оптимальных условиях. Установлено, что штаммы *M. tuberculosis* часто встречаемых споллиговариантов с чувствительным генотипом или с широко распространенными мутациями в генах, ассоциированных с устойчивостью к основным противотуберкулезным препаратам, в отличие от штаммов с редкими мутациями и с расширенным спектром фенотипической лекарственной устойчивости, хорошо адаптируются к условиям стресса *in vitro*. 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.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, филогенетические линии, мутации, адаптация, мультистресс, нитрозирующий стресс, секретом

Для цитирования: Андреевская С.Н., Смирнова Т.Г., Ларионова Е.Е., Черноусова Л.Н., Эргешов А.Э. Адаптация к мультистрессу *in vitro* штаммов *Mycobacterium tuberculosis* Восточно-Азиатской и Евро-Американской линий, различающихся лекарственной устойчивостью // Туберкулёз и социально значимые заболевания. – 2024. – Т. 12, № 1. – С. 9–18.

<http://doi.org/>

ADAPTATION TO MULTISTRESS *IN VITRO* OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* STRAINS OF EAST-ASIAN AND EURO-AMERICAN LINEAGES, DIFFERING IN DRUG RESISTANCE

S.N. Andreevskaya¹, T.G. Smirnova¹, E.E. Larionova¹, L.N. Chernousova¹, A. Ergeshov^{1,2}¹ Federal State Budgetary Scientific Institution «Central Scientific Research Institute of Tuberculosis», Moscow² Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Russian University of Medicine» of the Ministry of Health of Russia, Moscow

In order to study the *in vitro* adaptation of *M. tuberculosis* strains of various phylogenetic lineages and drug resistance under multistress conditions created by a lack of nutrients, reactive forms of nitrogen and oxygen, 17 strains of *M. tuberculosis* were studied (10 strains of the East Asian lineage of the Beijing sublineage and 7 strains Euro-American lineage). We studied the culture yield, the state of *M. tuberculosis* cells in culture and the secretome when cultivating strains under conditions of multistress, nitrosative stress and in optimal conditions. It has been established that *M. tuberculosis* strains of frequently SITs with a sensitive genotype or with widespread mutations, in contrast to strains with rare mutations and with an expanded spectrum of phenotypic drug resistance, adapt well to stress conditions *in vitro*. *M. tuberculosis* strains of the Beijing sublineage adapt to stress at an earlier time than *M. tuberculosis* of the Euro-American lineage; this was especially evident in the multistress model.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, phylogenetic lineages, mutations, adaptation, multistress, nitrosative stress, secretome

For citations: Andreevskaya S.N., Smirnova T.G., Larionova E.E., Chernousova L.N., Ergeshov A.E. Adaptation to multistress *in vitro* of *Mycobacterium tuberculosis* strains of East-Asian and Euro-American lineages, differing in drug resistance. Tuberculosis and socially significant diseases, – 2024 – V. 12, № 1, 9–18. (In Russ.)

<http://doi.org/>

Введение

Методами сравнительной геномики было установлено, что адаптированные к человеку микобактерии туберкулезного комплекса имеют четкую филогенетическую структуру, представленную семью линиями. На территории нашей страны преобладают микобактерии, принадлежащие к Восточно-Азиатской и Евро-Американской филогенетическим линиям [3, 19]. Восточно-Азиатская линия *M. tuberculosis* (МБТ) в России представлена в основном штаммами Пекинской сублинии споллиговарианта SIT1, на долю которой приходится 13% штаммов МБТ во всем мире, а в России – 40–60% в зависимости от региона [1, 18, 20]. Второй по частоте встречаемости в РФ филогенетической линией МБТ является Евро-Американская линия, которая представлена несколькими сублиниями [2].

В настоящее время широко обсуждается возможное существование отличий между филогенетическими линиями МБТ по способности инфицировать, вызывать заболевание и передаваться в популяции. Так, в ряде работ было высказано предположение, что МБТ Пекинской сублинии обладают повышенной трансмиссивностью, по сравнению с МБТ других генотипов, и часто устойчивы к противотуберкулезным препаратам (ПТП) [4, 15, 18, 20, 23, 24, 27]. Достаточно убедительно на сегодняшний день для штаммов МБТ Пекинской сублинии доказана высокая приспособляемость к выживанию в макрофагах, однако механизмы этого пока не объяснены [3, 9, 15]. МБТ Евро-Американской линии также достаточно трансмиссивны, доказательством чего может служить тот факт, что в ряде регионов мира, например, в странах Латинской Америки, в Гвинеи и в Эфиопии, штаммы этой линии имеют высокий уровень кластеризации [12, 23]. Также показано, что МБТ Евро-Американской линии, относящиеся к Уральской группе штаммов (SIT35 и SIT262), выделенные на территории РФ и в Молдове, могут обладать множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) [17].

Помимо принадлежности к филогенетической линии, на биологические свойства МБТ может влиять устойчивость к ПТП, обусловленная мутациями в геноме [7, 14, 16]. Изменение белкового продукта гена, вследствие геномных альтераций, может оказывать неоднозначное влияние на способность возбудителя выживать в макроорганизме [11, 29].

Важным звеном, определяющим биологические свойства штаммов МБТ, является способность противостоять стрессовым условиям, с которыми возбудитель сталкивается при попадании в организм хозяина, такие как активные формы азота и кислорода, а также недостаток питательных веществ [8, 21, 25].

Существуют исследования, которые показывают, что степень воздействия какого-либо из факторов стресса на клинические штаммы МБТ варьирует [5, 22]. Информации о том, как происходит процесс адаптации к выживанию в стрессовых условиях у МБТ разных филогенетических линий и лекар-

ственной устойчивости, недостаточно, а информация о воздействии на МБТ комбинации стрессовых факторов, с которыми сталкивается возбудитель в грануле, отсутствует.

Цель исследования

Изучение адаптации штаммов МБТ различных филогенетических линий с разной лекарственной устойчивостью в условиях мультистресса *in vitro*, созданного недостатком питательных веществ, активными формами азота и кислорода.

Материалы и методы**Штаммы микобактерий**

Исследовано 17 штаммов МБТ: 10 штаммов Восточно-Азиатской линии Пекинской сублинии и 7 штаммов Евро-Американской линии (табл. 1).

Модель мультистресса

Для моделирования мультистресса штаммы МБТ культивировали на 25%-ной среде Дюбо с 6 мМ KNO_3 и 0,02% H_2O_2 . Контролем в представленной модели служили штаммы МБТ, культивируемые в оптимальных условиях и в условиях нитрирующего стресса (6мМ KNO_3). Исходная концентрация бактериальной суспензии составила 5×10^3 КОЕ/мл. Влияние стрессовых факторов на рост культуры определяли через 1, 12 и 20 суток воздействия.

Изучали 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. 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 ПЦР.

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

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

$$\text{Relative massiveness of growth} = \frac{\text{The number of CFU MBTs under stress}}{\text{The number of CFU MBTs under optimal conditions}}$$

Были введены следующие критерии оценки массивности роста в условиях стресса:

1) рост сохранен – рост культуры такой же, как в контроле (оптимальные условия культивирования), или отличается от контрольных значений не более чем на 20% (0,8–1,2 относительных единиц (О.Е.);

Таблица 1. Характеристика штаммов *M. tuberculosis*, включенных в исследование

Table 1. Characteristics of *M. tuberculosis* strains included in the study

| № штамма Strain number | Линия Line | Сублиния Subline | SIT | Фенотипическая лекарственная устойчивость Phenotypic drug resistance | Мутации в генах • Мутации в генах | | | |
|------------------------------|---------------|----------------------|------|--|-----------------------------------|-------------|--------------|-------------|
| | | | | | <i>katG</i> | <i>inhA</i> | <i>rpoB</i> | <i>gyrA</i> |
| Bj-1 | B-A | Пекинская Beijing | 1 | Чувствительный Sensitive | WT | WT | WT | WT |
| Bj-2 | B-A | Пекинская Beijing | 1 | Чувствительный Sensitive | WT | WT | WT | WT |
| Bj-3 | B-A | Пекинская Beijing | 1 | Чувствительный Sensitive | WT | WT | WT | WT |
| Bj-4 | B-A | Пекинская Beijing | 1 | Чувствительный Sensitive | WT | WT | WT | WT |
| Bj-5 | B-A | Пекинская Beijing | 1 | H | 315_Ser->Thr | WT | WT | WT |
| Bj-6 | B-A | Пекинская Beijing | 1 | H | 315_Ser->Asn | WT | WT | WT |
| Bj-7 | B-A | Пекинская Beijing | 1 | HRE | 315_Ser->Thr | WT | 531_Ser->Leu | WT |
| Bj-8 | B-A | Пекинская Beijing | 1 | HREZ | 315_Ser->Thr | WT | 531_Ser->Leu | WT |
| Bj-9 | B-A | Пекинская Beijing | 1 | HREEth | 315_Ser->Thr | WT | 531_Ser->Leu | WT |
| Bj-10 | B-A | Пекинская Beijing | 1 | HREEthLfx | 315_Ser->Thr | WT | 526_His->Arg | 90_Ala->Val |
| T1-1 | E-A | T1 | 1888 | Чувствительный Sensitive | WT | WT | WT | WT |
| T1-2 | E-A | T1 | 172 | Чувствительный Sensitive | WT | WT | WT | WT |
| T1-3 | E-A | T1 | 196 | Чувствительный Sensitive | WT | WT | WT | WT |
| H37Rv | E-A | T1 | 451 | Чувствительный Sensitive | WT | WT | WT | WT |
| LAM_RUS-1 | E-A | LAM_RUS | 254 | Чувствительный Sensitive | WT | WT | WT | WT |
| LAM_RUS-2 | E-A | LAM_RUS | 254 | HREEthLfx | 315_Ser->Thr | 15_C->T | 526_His->Tyr | 94_Asp->Tyr |
| LAM9 | E-A | LAM9 | 161 | HREEthAmk | 315_Ser->Thr | 15_C->T | 516_Asp->Val | WT |

Примечание: SIT – международный код сполиготипа, B-A – Восточно-Азиатская, E-A – Евро-Американская, WT – дикий тип гена, H – изониазид, R – рифампицин, E – этамбутол, Eth – этионамид, Amk – амикацин, Lfx – левофлоксацин.

Note: SIT – Spoligotype International Type, B-A is East Asian, E-A – Euro-American, WT – a wild type of gene, N – isoniazid, R – rifampicin, E – ethambutol, Eth – ethionamide, Amk – amikacin, Lfx – levofloxacin.

2) рост утрачен – нет роста культуры или число КОЕ в образце составляет 20% и менее, по сравнению с контролем (0–0,2 О.Е.);

3) низкая массивность роста – промежуточное значение между сохраненным и утраченным (0,2–0,8 О.Е., не включая границы диапазона);

4) высокая массивность роста – рост культуры в $2 \pm 20\%$ раза превышает контрольное значение (1,6–2,4 О.Е.);

5) массивность роста выше среднего – промежуточное значение между сохраненным и высоким ростом (1,2–1,6 О.Е., не включая границы диапазона);

6) очень высокая массивность роста – значения выше 2,4 О.Е.

Состояние клеток МБТ оценивали методом микроскопии мазка культуры с окраской по Цилю – Нильсену на 20-е сутки эксперимента. При микроскопии мазков культуры с окраской по Цилю – Нильсену были предложены критерии степени из-

менения морфологии микобактериальных клеток, описанные в таблице 2.

Для оценки секрета штаммов МБТ, культивируемых в оптимальных и стрессовых условиях, использовали метод времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS), считывание секрета осуществляли на 12-е и 20-е сутки эксперимента.

Результаты

Рост культуры МБТ в оптимальных и стрессовых условиях

Число выросших на среде колоний МБТ через 1 сутки культивирования в оптимальных условиях не отличалось от посевной дозы, а массивность роста культуры исследуемых штаммов на 12-е и 20-е сутки существенно не отличалась (рис. 1, а).

Таблица 2. Степени изменений морфологии микобактериальных клеток

Table 2. Degrees of changes in the morphology of mycobacterial cells

| Степень изменений Degree of change | Состояние культуры The state of culture | Соотношение в мазке клеток с разными тинкториальными свойствами в поле зрения The ratio in the smear of cells with different tinctorial properties in the field of view | | |
|---------------------------------------|---|--|--|--|
| | | Нормальные клетки Normal cells | «Зерна» ¹ • «Grains» ¹ | «Тени» ² • «Shadows» ² |
| – | Типичная неизменная культура Typical unchanged culture | 100% | нет • no | нет • no |
| 1 | Минимальные изменения Minimal changes | почти 100% • almost 100% | единичные в поле зрения single ones in the field of view | нет • no |
| 2 | Умеренные изменения Moderate changes | нормальные клетки и «зерна» в равном соотношении normal cells and «grains» in equal ratio | нет • no | |
| 3 | Значительные изменения Significant changes | около 25% near 25% | «зерна» и «тени» в разном соотношении «grains» and «shadows» in different proportions | |
| 4 | Абсолютные изменения Absolute changes | нет • no | «зерна» и «тени» в разном соотношении «grains» and «shadows» in different proportions | |

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

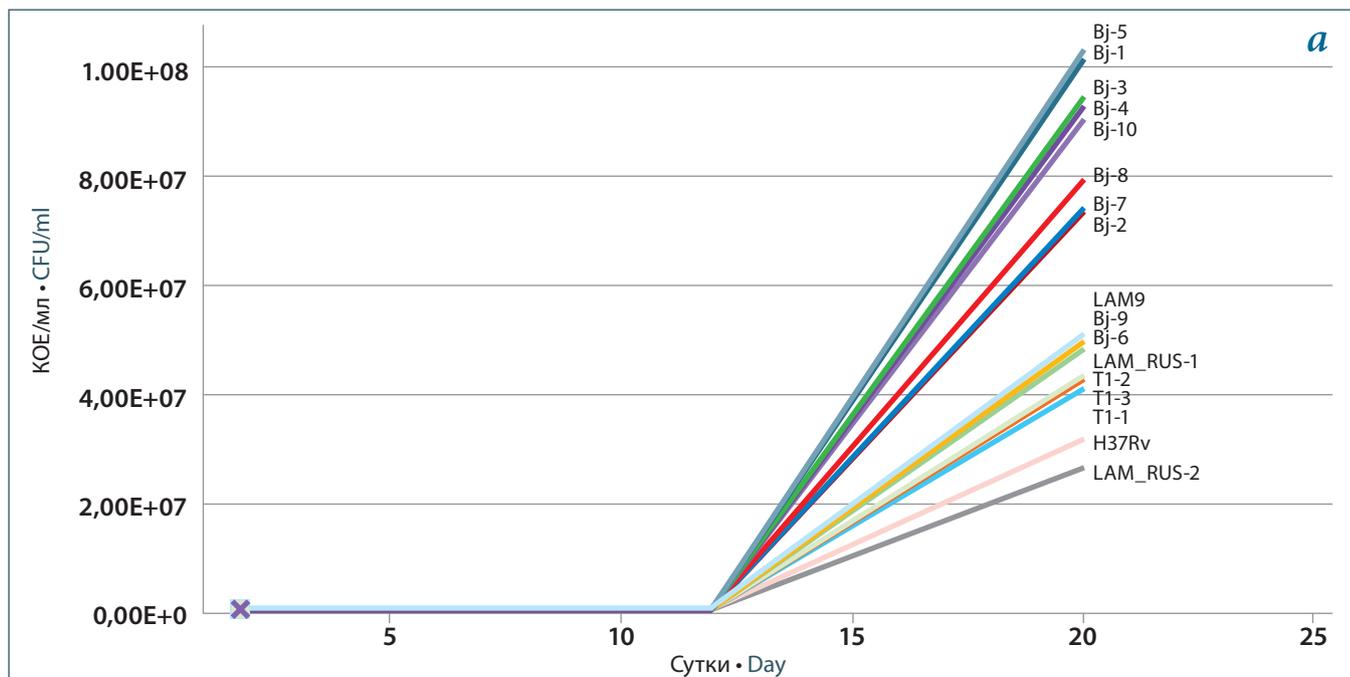
¹ «Grains» – with a partial loss of acid resistance, cells are visualized as a chain of «grains» (areas of preserved acid resistance) separated by weakly colored stripes;

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

² «Shadows» – with a complete loss of acid resistance, mycobacterium cells are visible in the smear in the form of «shadows» in the form of sticks, faintly colored purple-crimson.

При культивировании штаммов МБТ в условиях стресса, в отличие от оптимальных условий, были получены более выраженные отличия между штаммами по массивности роста. Активные формы азота при моновоздействии через сутки

подавляли рост культуры, а потом рост культуры в присутствии этих стрессоров восстанавливался до контрольных значений, а у некоторых штаммов стимулировался (рис. 1, б). В условиях мультистресса подавление роста культуры было



Tuberculosis and socially significant diseases • 2024. – Vol. 12. – # 1 (45)

Рисунок 1а. Рост штаммов M. tuberculosis в оптимальных условиях.

Figure 1a. Growth of M. tuberculosis strains under optimal conditions.

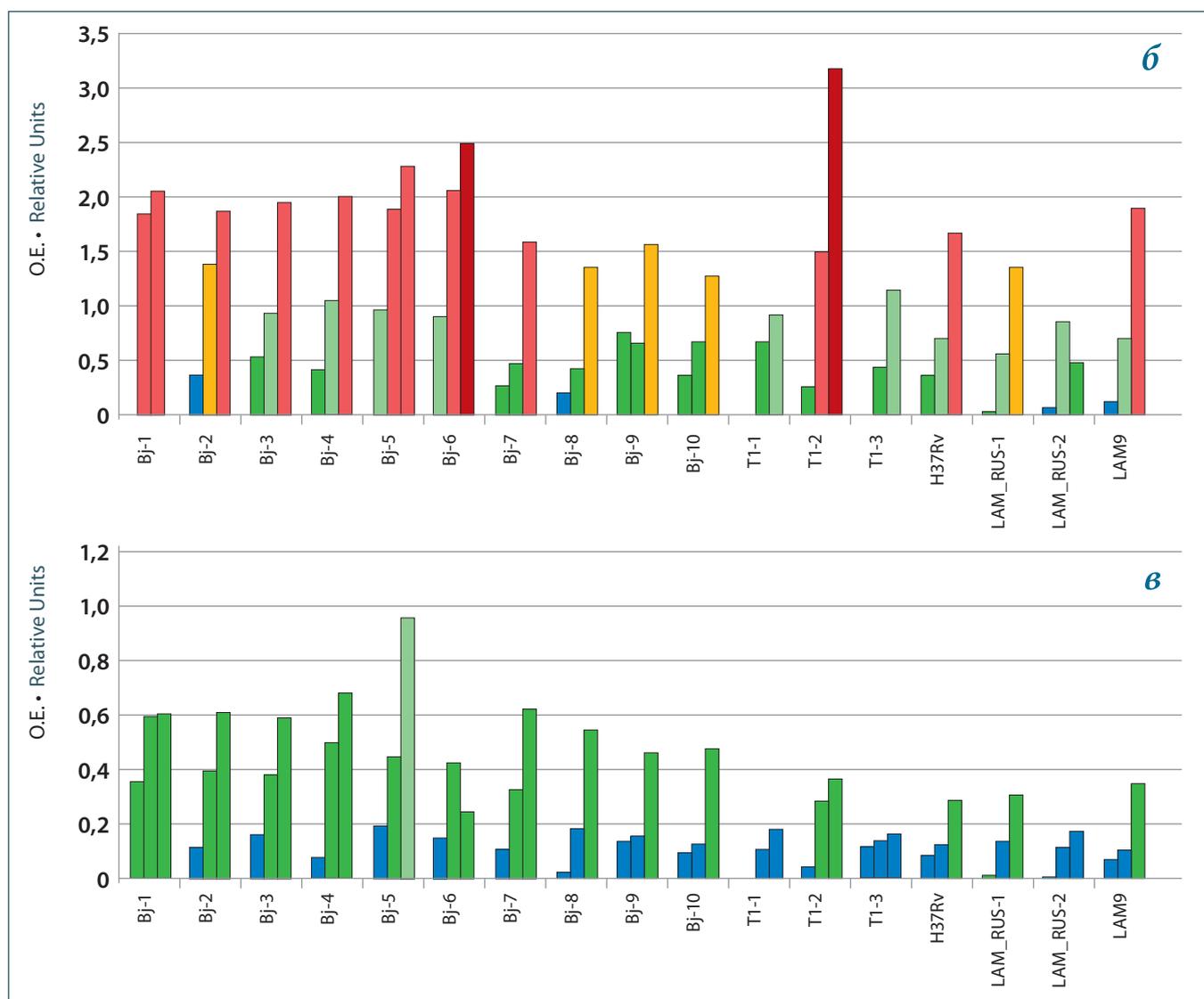


Рисунок 1 б,в. Рост штаммов *M. tuberculosis*: б – в присутствии активных форм азота, в – в условиях мультистресса. Столбцы (слева направо): 1-е сутки, 12-е сутки, 20-е сутки. О.Е. – относительные единицы.

Цветовые обозначения: синий – рост утрачен, темно-зеленый – низкая массивность роста, зеленый – рост сохранен, желтый – массивность роста выше среднего, красный – высокая массивность роста, темно-красный – очень высокая массивность роста
 Figure 1 б,в. Growth of *M. tuberculosis* strains: б – in the presence of active forms of nitrogen, в – under conditions of multistress. Columns (from left to right): 1st day, 12th day, 20th day. O.E. – relative units.
 Color designations: blue – growth is lost, dark green – low massiveness of growth, green – growth is preserved, yellow – massiveness of growth above average, red – high massiveness of growth, dark red - very high massiveness of growth

еще более существенным, чем при воздействии моностресса (рис. 1, в).

Девять из десяти штаммов Пекинской сублинии имели сходные ростовые характеристики при культивировании 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, динамика роста этих культур была положительной. Исключением из группы штаммов Пекинской сублинии был штамм с «неклассическим» изониазид-резистентным генотипом, который имел редкую мутацию на уровне *katG* (*katG315_Ser->Asn*). Этот штамм в

условиях мультистресса демонстрировал отрицательную динамику роста, но в то же время в условиях нитрозирующего стресса показатели роста этого штамма были сходными с другими штаммами Пекинской сублинии.

Штаммы сублинии T1 Евро-Американской линии были чувствительны ко всем ПТП, но относились к разным споллиговариантам и в зависимости от споллиговарианта имели широкий диапазон реакций на стресс. Для штамма широко распространенного споллиговарианта SIT172, подобно штаммам Пекинской сублинии, была характерна стимуляция роста в условиях нитрозирующего стресса, однако в условиях мультистресса динамика роста этого штамма была отрицательной. Штаммы

редких споллиговариантов SIT1888 и SIT196 имели очень низкие ростовые характеристики как в условиях моно-, так и мультистресса. Массивность роста культуры лабораторного штамма H37Rv, также входящего в сублинию T1, при культивировании в присутствии активных форм азота и в условиях мультистресса имела положительную динамику роста.

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 *groV* и *gyrA*. У штамма, чувствительного ко всем ПТП, к 20-м суткам эксперимента в условиях моностресса отмечалась стимуляция роста культуры по сравнению с ростом в оптимальных условиях, в то же время в условиях мультистресса массивность роста культуры этого штамма была очень низкой. У штамма LAM_RUS с преШЛУ-генотипом в условиях нитрозирующего стресса и мультистресса ускорялось наступление стационарной фазы роста культуры.

Штамм сублинии LAM9 с МЛУ-генотипом демонстрировал те же характеристики роста в условиях нитрозирующего стресса и мультистресса, что и штамм филогенетически близкой сублинии LAM_RUS с чувствительным генотипом.

Микроскопия клеток МБТ 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 сохраняли кислотоустойчивость и имели типичную форму тонких, слегка изогнутых палочек. После культивирования в течение 20 суток в условиях стресса при микроскопии мазков культур были выявлены клетки микобактерий как с сохраненной кислотоустойчивостью, так и с измененными тинкториальными свойствами в связи с частичной или полной утратой кислотоустойчивости (табл. 3). 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 МБТ с отрицательной динамикой роста изменение морфологии клеток было выраженным.

Секретом МБТ при росте в оптимальных и стрессовых условиях

При изучении секретомов клеток МБТ, культивируемых в оптимальных условиях и в условиях стресса, было выявлено 6 белков молекулярной массой 3,89 кДа, 13,40 кДа, 16,78 кДа, 22,32 кДа, 33,50 кДа и 66,50 кДа. Особенностью секретомов МБТ, культивируемых в присутствии активных форм азота и в условиях мультистресса, было существенное повышение содержа-

Таблица 3. Морфология клеток *M. tuberculosis* в культуре после 20-дневной инкубации в условиях стресса

Table 3. Morphology of *M. tuberculosis* cells in culture after 20-day incubation under stress conditions

| Код штамма Strain code | Степень изменения морфологии клеток The degree of change in cell morphology | |
|---------------------------|--|-----------------------------|
| | нитрозирующий стресс nitrosating stress | мультистресс multistress |
| Bj-1 | нет • no | 1 |
| Bj-2 | нет • no | нет • no |
| Bj-3 | нет • no | нет • no |
| Bj-4 | 1 | 1 |
| Bj-5 | 1 | 2 |
| Bj-6 | 1 | 3 |
| Bj-7 | 3 | 2 |
| Bj-8 | 3 | 2 |
| Bj-9 | 2 | 2 |
| Bj-10 | 2 | 2 |
| T1-1 | 2 | 3 |
| T1-2 | 1 | 2 |
| T1-3 | 1 | 2 |
| H37Rv | нет • no | 1 |
| LAM_RUS-1 | 2 | 3 |
| LAM_RUS-2 | 4 | 4 |
| LAM9 | 1 | 2 |

ния белка 3,89 кДа (рис. 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 и 20 сутки) и не превышал 3 О.Е.

Как видно из рисунка 2, в условиях мультистресса к 20-м суткам эксперимента у всех штаммов МБТ Пекинской сублинии был отмечен очень высокий уровень секреции белка 3,89 кДа. У штаммов МБТ 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.

Повышение секреции белка 3,89 кДа у МБТ Пекинской сублинии отмечалось на более ранних сроках, чем у МБТ Евро-Американской линии.

Обсуждение

При изучении биологических особенностей МБТ в условиях *in vitro* важно учитывать, что в макроорганизме возбудитель подвергается воздействию целого комплекса стрессоров, поэтому свойства конкретного штамма, проявляемые при культивировании в оптимальных условиях, могут отличаться от того, что будет происходить с возбудителем при попадании в макроорганизм. Поэтому представлялось полезным создать модель множественного стресса, которая поможет наиболее полно охарактеризовать адаптацию возбудителя к условиям, максимально приближенным к естественным.

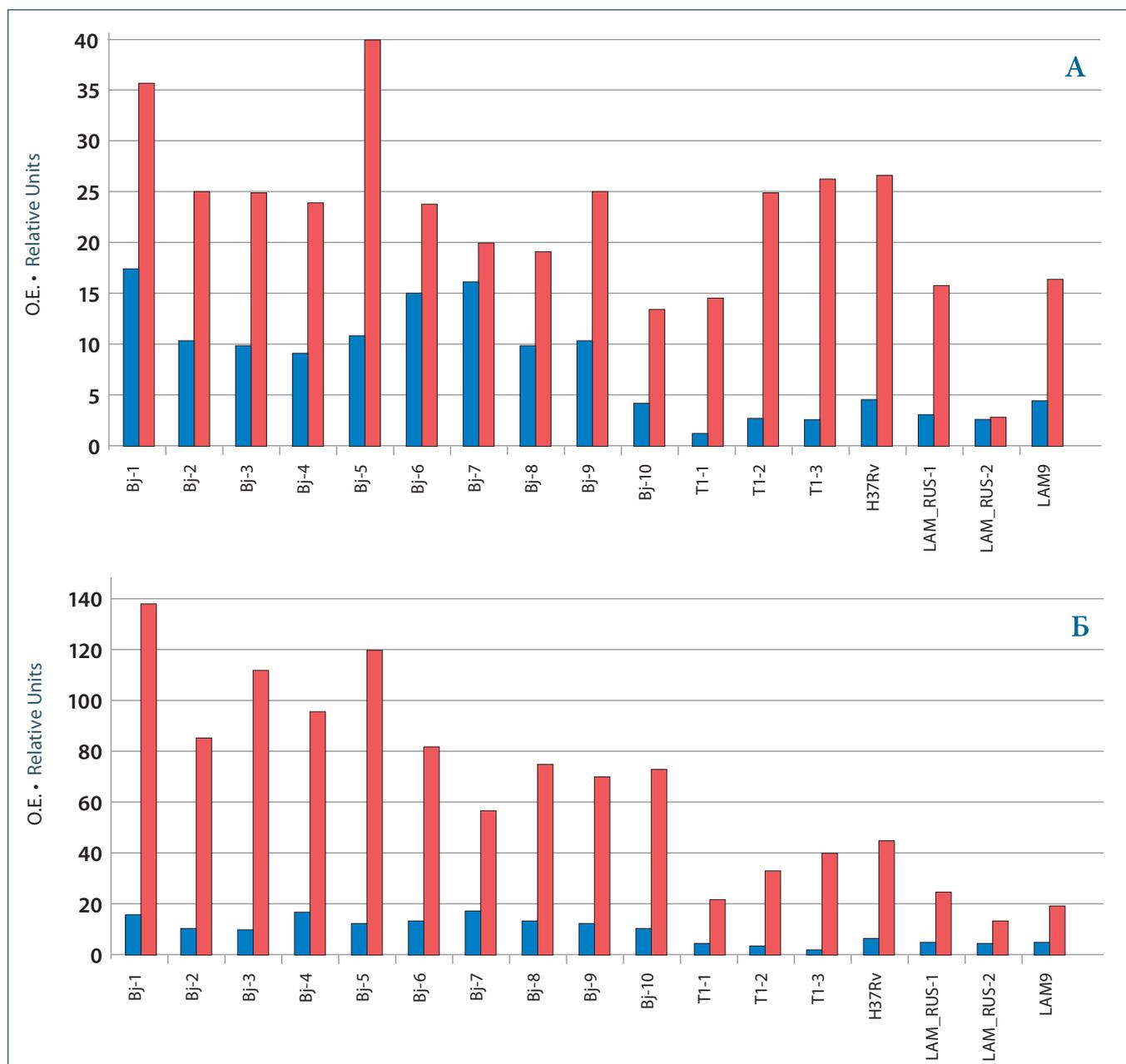


Рисунок 2. Уровень секреции белка 3,89 кДа штаммами *M. tuberculosis* в условиях нитрозирующего стресса (А) и мультистресса (Б). Столбцы (слева направо): синие – 12 суток, красные – 20 суток. О.Е. – относительные единицы

Figure 2. Protein secretion level of 3.89 kDa by *M. tuberculosis* strains under conditions of nitrosating stress (A) and multistress (B). Columns (from left to right): blue – 12 days, red – 20 days. O.E. – relative units

При изучении влияния комбинации стрессовых факторов на штаммы МБТ наиболее распространенных в России сполговариантов было показано, что в зависимости от генотипа МБТ по-разному адаптируются к условиям стресса. Для всех штаммов, вне зависимости от принадлежности штаммов МБТ к определенной филогенетической линии и от характера генотипической лекарственной устойчивости, было показано, что в условиях мультистресса происходит существенное подавление роста культуры, по сравнению с оптимальными условиями и с монострессом. При этом массивность роста куль-

туры в условиях стресса у штаммов МБТ Пекинской сублинии была выше, чем у штаммов МБТ Евро-Американской линии; особенно ярко это проявлялось в условиях мультистресса. Расширение спектра лекарственной устойчивости или наличие редких мутаций, ухудшало показатели роста культуры у представителей обеих линий.

Морфология клеток МБТ в культуре в условиях стресса, оцененная на 20-е сутки эксперимента, у ряда изученных штаммов была изменена. Тот факт, что при культивировании в оптимальных условиях кислотоустойчивость всегда сохранялась,

может свидетельствовать о том, что изменения морфологии клеток являются специфической реакцией штаммов МБТ на культивирование в стрессовых условиях. Утрата микобактериями кислотоустойчивости, или парадокс Коха, как полагают, может быть связан с переходом МБТ в нереплицирующую форму [26]. 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.

На данный момент нет публикаций, описывающих влияние мультистресса на рост *in vitro* МБТ разных генотипов, но есть публикации, в которых описано воздействие на рост культур активных форм 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* [6]. В других работах было отмечено, что активные формы азота оказывают на МБТ не бактерицидное, а бактериостатическое действие [10, 22]. Для некоторых штаммов МБТ было показано, что их устойчивость к активным формам азота при культивировании *in vitro* значительно выше, чем у других штаммов [10, 13]. Также был описан эффект стимуляции роста культуры лабораторных и клинических штаммов МБТ в условиях нитрозирующего стресса [5].

В представленном нами исследовании моновоздействие активных форм азота на рост культур МБТ было использовано в качестве контроля для сравнения с мультистрессом. Результаты, полученные нами в модели нитрозирующего стресса, в целом совпали с описанными в литературе: были показаны бактериостатическое действие активных форм азота на рост культур на ранние сроки, разная степень воздействия на штаммы разных генотипов, стимуляция роста некоторых культур. Однако авторы имеющихся публикаций не определяли генотипическую принадлежность исследованных ими штаммов, поэтому сравнивать по этому параметру полученные нами результаты с литературными данными не представляется возможным.

При изучении секретомов клеток МБТ, культивируемых в оптимальных условиях и в условиях стресса, было выявлено 6 основных белков молекулярной массы 3,89 кДа, 13,40 кДа, 16,78 кДа, 22,32 кДа, 33,50 кДа и 66,50 кДа. Особенностью секретомов МБТ, культивируемых в присутствии активных форм азота и в условиях мультистресса, было значительное повышение секреции белка 3,89 кДа, что ассоциировалось с восстановлением жизнеспособности МБТ в условиях стресса. Было показано, что повышение секреции белка 3,89 кДа у штаммов МБТ Пекинской сублинии наступает на более ранних сроках, чем у МБТ Евро-Американской линии, причем в условиях мультистресса секреция белка 3,89 кДа у МБТ Пекинской

сублинии достигала крайне высоких значений, превышающих базовый уровень секреции в 50–100 раз, в то время как у МБТ Евро-Американской линии уровень секреции этого белка остается таким же, как и при нитрозирующем стрессе.

Для понимания роли этого белка в адаптации штаммов МБТ к условиям стресса, нужно учитывать, что для выживания в иммунологически активированных макрофагах МБТ 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 [21, 28]. 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 МБТ на культуре макрофагов и в мышинной модели, а также установление его аминокислотной структуры, моделирование последовательности кодирующего его гена и локализация гена в геноме МБТ может быть перспективным направлением для дальнейших исследований. Учитывая, что белок 3,98 кДа важен для адаптации МБТ к стрессу, вызванному активными формами азота, возможно, он может послужить мишенью для создания новых ПТП, направленных на снижение адаптации МБТ к выживанию в макроорганизме.

Заключение

При изучении адаптации к мультистрессу *in vitro* штаммов МБТ Восточно-Азиатской и Евро-Американской линий, различающихся лекарственной устойчивостью, было установлено, что в условиях стресса у МБТ изменяются параметры роста культуры, морфология клеток, соотношение количества секретируемых белков. Было показано, что приспособленность к условиям стресса у штаммов МБТ ассоциирована со споллиговариантом и генотипической лекарственной устойчивостью. В целом можно отметить, что штаммы МБТ часто встречаемых споллиговариантов с чувствительным генотипом или с широко распространенными мутациями в генах, ассоциированных с устойчивостью к основным ПТП, хорошо адаптируются к условиям стресса *in vitro*. Штаммы МБТ с редкими мутациями в генах, ассоциированных с устойчивостью к основным ПТП, а также с расширенным спектром фенотипической лекарственной устойчивости хуже адаптируются к условиям стресса, особенно мультистресса, что выражается в более позднем начале роста культуры и раннем наступлении стационарной фазы роста. Штаммы МБТ Пекинской сублинии адаптируются к стрессу в более ранние сроки, чем МБТ Евро-Американской линии, особенно ярко это проявлялось в модели мультистресса.

Кроме того, в результате проведенного исследования было установлено, что характеристики роста штаммов МБТ 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 жизнеспособно-

сти штаммов МБТ по массивности роста на среде в оптимальных условиях не может считаться адекватной моделью для описания биологических свойств возбудителя.

Модель мультистресса для изучения особенностей адаптации МБТ 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., Ларионова Е.Е., Кузьмин А.В. Трансмиссия штаммов микобактерий туберкулеза, обусловленная миграционными процессами в Российской Федерации (на примере миграции населения из кавказского региона в Москву и Московскую область) // Пробл. туберкулеза и болезней легких. – 2006. – № 1. – С. 29-35.
2. 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. – С. 21-24.
3. Черноусова Л.Н., Голышевская В.И., Ерохин В.В., Кузнецов С.И., Захарова С.М., Мелентьев А.С., Федорин И.М., Николаевский В.В., Радди М., Балабанова Я.М., Дробневский Ф. Преобладание штаммов *Mycobacterium tuberculosis* семейства Beijing и факторы риска их трансмиссии в Самарской области // Пробл. туберкулеза и болезней легких. – 2006. – № 2. – С. 31-37.
4. Bifani P.J., Mathema B., Kurepina N.E., Kreiswirth B.N. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains // Trends Microbiol. – 2002. – Vol. 10, № 1. – P. 45-52. DOI: 10.1016/s0966-842x(01)02277-6.
5. Brugmann W.B., Firmani M.A. Low concentrations of nitric oxide exert a hormetic effect on *Mycobacterium tuberculosis* in vitro // J. Clin. Microbiol. – 2005. – Vol. 43, № 9. – P. 4844-4846. DOI: 10.1128/JCM.43.9.4844-4846.2005.
6. 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. – Vol. 175, № 4. – P. 1111-1122. DOI: 10.1084/jem.175.4.1111.
7. 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. – Vol. 295, № 5562. – P. 2042-2046. DOI: 10.1126/science.1063814.
8. Ehrh S., Schnappinger D. Mycobacterial survival strategies in the phagosome: defence against host stresses // Cell Microbiol. – 2009. – Vol. 11, № 8. – P. 1170-1178. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2009.01335.x.
9. Ejo M., Torrea G., Uwizeye C., Kassa M., Girma Y., Bekele T., Ademe Y., Diro E., Gehre F., Rigouts L., de Jong B.C. 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. – Vol. 103. – P. 72-80. DOI: 10.1016/j.ijid.2020.11.129.
10. Firmani M.A., Riley L.W. Reactive nitrogen intermediates have a bacteriostatic effect on *Mycobacterium tuberculosis* in vitro // J. Clin. Microbiol. – 2002. – Vol. 40, № 9. – P. 3162-3166. DOI: 10.1128/JCM.40.9.3162-3166.2002.
11. Gagneux S., Long C.D., Small P.M., Van T., Schoolnik G.K., Bohannon B.J. The competitive cost of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // Science. – 2006. – Vol. 312, № 5782. – P. 1944-1946. DOI: 10.1126/science.1124410.
12. Haile B., Tafess K., Zewude A., Yewew B., Siu G., Ameni G. Spoligotyping and drug sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from pulmonary tuberculosis patients in the Arsi Zone of southeastern Ethiopia // New Microbes New Infect. – 2019. – Vol. 33. – P. 100620. DOI: 10.1016/j.nmni.2019.100620.
13. Idh J., Mekonnen M., Abate E., Wedajo W., Werngren J., Ängeby K., Lerm M., Elias D., Sundqvist T., Aseffa A., Stendahl O., Schön T. Resistance to first-line anti-TB drugs is associated with reduced nitric oxide susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis* // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, № 6. – e39891. DOI: 10.1371/journal.pone.0039891
14. Kulaga S., Behr M., Musana K., Brinkman J., Menzies D., Brassard P., Kunimoto D., Tannenbaum T.N., Thibert L., Joseph L., Boivin J.F., Schwartzman K. Molecular epidemiology of tuberculosis in Montreal // CMAJ. – 2002. – Vol. 167, № 4. – P. 353-354.
15. Langlois-Klassen D., Senthilselvan A., Chui L., Kunimoto D., Saunders L.D., Menzies D., Long R. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Strains, Alberta, Canada, 1991-2007 // Emerg. Infect. Dis. – 2013. – Vol. 19, № 5. – P. 701-711. DOI: 10.3201/eid1905.121578.
16. 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. – Vol. 48, № 4. – P. 1289-1294. DOI: 10.1128/AAC.48.4.1289-1294.2004.
17. Mokrousov I. Emerging resistant clone of *Mycobacterium tuberculosis* in west Asia // Lancet Infect. Dis. – 2016. – Vol. 16, № 12. – P. 1326-1327. DOI: 10.1016/S1473-3099(16)30460-1.
18. Mokrousov I. Insights into the origin, emergence, and current spread of a successful Russian clone of *Mycobacterium tuberculosis* // Clin. Microbiol. Rev. – 2013. – Vol. 26, № 2. – P. 342-360. DOI: 10.1128/CMR.00087-12.
19. Mokrousov I. *Mycobacterium tuberculosis* phylogeography in the context of human migration and pathogen's pathobiology: Insights from Beijing and Ural families // Tuberculosis (Edinb). – 2015. – Vol. 95, Suppl 1. – P. 167-176. DOI: 10.1016/j.tube.2015.02.031.

20. Pasechnik O., Vyazovaya A., Vitriv S., Tatarintseva M., Blokh A., Stasenko V., Mokrousov I. 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. – Vol. 108. – P. 163-168. DOI: 10.1016/j.tube.2017.12.003.
21. Peddireddy V., Doddam S.N., Ahmed N. Mycobacterial dormancy systems and host responses in tuberculosis // *Front. Immunol.* – 2017. – Vol. 8. – P. 84. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00084.
22. Rhoades E.R., Orme I.M. Susceptibility of a panel of virulent strains of *Mycobacterium tuberculosis* to reactive nitrogen intermediates // *Infect Immun.* – 1997. – Vol. 65, № 4. – P. 1189-1195. DOI: 10.1128/iai.65.4.1189-1195.1997.
23. Roycroft E., O'Toole R.F., Fitzgibbon M.M., Montgomery L., O'Meara M., Downes P., Jackson S., O'Donnell J., Laurenson I.F., McLaughlin A.M., Keane J., Rogers T.R. Molecular epidemiology of multi- and extensively-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Ireland, 2001-2014 // *J. Infect.* – 2018. – Vol. 76, № 1. – P. 55-67. DOI: 10.1016/j.jinf.2017.10.002.
24. 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. – Vol. 5, Suppl. 1. – P. 197-198. DOI: 10.1016/j.ijmyco.2016.07.005.
25. Serafini A., Tan L., Horswell S., Howell S., Greenwood D.J., Hunt D.M., Phan M.D., Schembri M., Monteleone M., Montague C.R., Britton W., Garza-Garcia A., Snijders A.P., Vander Ven B., Gutierrez M.G., West N.P., de Carvalho L.P.S. *Mycobacterium tuberculosis* requires glyoxylate shunt and reverse methylcitrate cycle for lactate and pyruvate metabolism // *Mol. Microbiol.* – 2019. – Vol. 112, № 4. – P. 1284-1307. DOI: 10.1111/mmi.14362.
26. Vilchèze C., Kremer L. Acid-fast positive and acid-fast negative *Mycobacterium tuberculosis*: the Koch paradox // *Microbiol. Spectr.* – 2017. – Vol. 5, № 2.
27. Wirth T., Hildebrand F., Allix-Béguec C., Wölbeling F., Kubica T., Kremer K., van Soolingen D., Rüsche-Gerdes S., Loch C., Brisse S., Meyer A., Supply P., Niemann S. Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* complex // *PLoS Pathog.* – 2008. – Vol. 4, № 9. – P. e1000160.
28. Yang C.S., Yuk J.M., Jo E.K. The role of nitric oxide in mycobacterial infections // *Immune Netw.* – 2009. – Vol. 9, № 2. – P. 46-52.
29. Zaczek A., Brzostek A., Augustynowicz-Kopec E., Zwolska Z., Dziadek J. Genetic evaluation of relationship between mutations in *rpoB* and resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to rifampin // *BMC Microbiol.* – 2009. – Vol. 9. – P. 10.

Об авторах

Андреевская Софья Николаевна – ведущий научный сотрудник отдела микробиологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», кандидат медицинских наук

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

Тел. +7 (499) 785-90-91

E-mail: andsofia@mail.ru

Смирнова Татьяна Геннадьевна – старший научный сотрудник отдела микробиологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», кандидат медицинских наук

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

Тел. + 7 (499) 785-90-91

E-mail: s_tatka@mail.ru

Ларионова Елена Евгеньевна – старший научный сотрудник отдела микробиологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», кандидат биологических наук

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

Тел. +7 (499) 785-90-91

E-mail: larionova_lena@mail.ru

Черноусова Лариса Николаевна – главный научный сотрудник отдела микробиологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», доктор биологических наук, профессор

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

Тел. +7 (499) 785-90-91

E-mail: lchernousova@mail.ru

Эргешов Атаджан Эргешович – директор ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», профессор кафедры фтизиатрии и пульмонологии ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России, член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор

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

Тел. +7 (499) 785-90-91

E-mail: cniit@ctri.ru