



Новая модель дормантности *Mycobacterium tuberculosis in vitro*

Я. Р. БАТЫРШИНА, Я. Ш. ШВАРЦ

ФГБУ «Новосибирский НИИ туберкулеза» МЗ РФ, г. Новосибирск, РФ

РЕЗЮМЕ

В статье представлена новая *in vitro* модель дормантности *M. tuberculosis*, основанная на культивировании в условиях депривации четырех компонентов стандартной питательной среды Middlebrook 7H9. Детально описаны способ моделирования, характеристики полученного дормантного фенотипа *M. tuberculosis*, предложены области потенциального применения модели.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, дормантность микобактерий туберкулеза, модели дормантности *M. tuberculosis in vitro*, старвация, депривация компонентов питательных сред

Для цитирования: Батыршина Я. Р., Шварц Я. Ш. Новая модель дормантности *Mycobacterium tuberculosis in vitro* // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2020. – Т. 98, № 3. – С. 19-26. <http://doi.org/10.21292/2075-1230-2020-98-3-19-26>

A new *in vitro* dormancy model of *Mycobacterium tuberculosis*

YA. R. BATYRSHINA, YA. SH. SHVARTS

Novosibirsk Tuberculosis Research Institute, Novosibirsk, Russia

ABSTRACT

The article describes a new *in vitro* dormancy model of *M. tuberculosis* based on cultivation with deprivation of four components of the standard medium of Middlebrook 7H9. The modeling method and characteristics of the obtained dormant phenotype of *M. tuberculosis* are described in detail, and fields for potential application of the model are proposed.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, dormancy of tuberculous mycobacteria, dormancy *in vitro* models of *M. tuberculosis*, starvation, deprivation of nutrient components

For citations: Batyrshina Ya.R., Shvarts Ya.Sh. A new *in vitro* dormancy model of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis and Lung Diseases*, 2020, Vol. 98, no. 3, P. 19-26. (In Russ.) <http://doi.org/10.21292/2075-1230-2020-98-3-19-26>

Для корреспонденции:
Батыршина Яна Рэмовна
E-mail: batirshina@inbox.ru

Correspondence:
Yana R. Batyrshina
E-mail: batirshina@inbox.ru

По современным представлениям дормантность бактерий трактуется как преходящее состояние утраты репликативной активности, сопровождающееся разнообразными транскрипционными, метаболическими, функциональными сдвигами [9, 15]. Считается, что возможность микроорганизмов существовать в дормантной форме – это один из механизмов, используемых патогенами для адаптации к неблагоприятным для них условиям существования, прежде всего факторам иммунной защиты хозяина [5]. Находясь в состоянии дормантности *in vivo* неопределенно долго, возбудитель сохраняет потенциал возврата к восстановлению функциональной и репликативной активности, т. е. ресусцитации [22]. В контексте патогенеза туберкулеза (ТБ) способность *M. tuberculosis* находиться в дормантной форме связывают с персистенцией возбудителя в организме при латентной форме туберкулезной инфекции (ЛТИ), а способность к ресусцитации – с риском развития активного (клинически манифестного и трансмиссивного) туберкулезного процесса [4, 5, 22].

В настоящее время не существует доступного и надежного способа обнаружения *M. tuberculosis* (МБТ) или его непосредственных маркеров у людей с ЛТИ. Соответственно, резко ограничены данные о фенотипе МБТ при ЛТИ, и единственным доступным способом получения информации о

гено- и фенотипических свойствах МБТ на сегодняшний день является *in vivo* и *in vitro* моделирование ЛТИ и/или дормантности *M. tuberculosis*. За последние ~ 100 лет микробиологических исследований МБТ моделей дормантности *in vitro* предложено уже более десятка. В основе их лежат получение и характеристика микобактериальной популяции с признаками дормантности под действием внешних факторов, доказанно или гипотетически действующих на возбудителя в условиях *in vivo*. В большинстве этих моделей генерация дормантного фенотипа МБТ осуществлялась в ходе культивирования их в жидкой питательной среде, а в качестве индукторов дормантности в разных исследованиях использовали действие гипоксии [25], оксида азота (NO) [23], оксида углерода (CO) [18], ацидификации культуральной среды [19], недостатка нутриентов (старвации) [2, 13], полной или частичной депривации ионов калия [17], магния [7], железа [11], фосфатов [14] либо сочетание воздействия нескольких из вышеперечисленных факторов [3, 21]. В ряде исследований для формирования дормантности *M. tuberculosis* использовали высокие концентрации липидов как единственного источника энергии в культуральной среде [16], а также воздействие веществ, оказывающих токсический эффект (избыток ионов меди) [24] либо обладающих антимикробным, в том числе

специфическим антимикобактериальным действием (антибиотики, химические соединения разных классов) [10].

Предпосылкой создания старвационных/депривационных моделей дормантности *M. tuberculosis* является предположение о том, что, находясь во внутриклеточной среде макрофагов, МБТ испытывают недостаток питательных веществ, который способствует переходу их в дормантное состояние. Хорошо известны модели R. Loebel et al. и J. C. Betts et al. [2, 13]. Обе неоднократно использовались в других исследованиях, в том числе для изучения антимикобактериальной активности известных и вновь разрабатываемых противотуберкулезных препаратов [12]. Первая из них, предложенная еще в 30-х годах прошлого века, основана на длительном (55 дней) периоде инкубации *M. tuberculosis* в физиологическом растворе, вторая – на длительной (6 нед.) инкубации в фосфатно-солевом буфере. Основным их недостатком, помимо длительности инкубации, является то, что, хотя респираторная активность МБТ снижалась, их репликативная способность значимо не изменялась, что не позволяет считать данное состояние микобактерий истинно дормантным. Мы попытались создать *in vitro* модель, которая, во-первых, позволяла бы получить микобактериальную популяцию с выраженными признаками дормантного состояния, во-вторых, была бы легко воспроизводима. Способом решения этой задачи выбрали культивирование МБТ в стандартной жидкой питательной среде (Middlebrook 7H9), редуцировав ее состав.

Цель исследования: разработка *in vitro* модели дормантности МБТ путем бульонного культивирования их в среде Middlebrook 7H9 в условиях депривации четырех эссенциальных компонентов (альбумина, декстрозы, каталазы, хлорида натрия) и характеристика индуцированного данными условиями фенотипа *M. tuberculosis*.

Материалы и методы

Микобактериальные штаммы. Штамм *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC® 27294™) был использован в эксперименте. Суспензии стоковых культур, хранившихся при -70°C , были разморожены и субкультивированы на среде Левенштейна – Йенсена в течение 24-28 сут. Бактериальную массу выросших колоний аккуратно снимали с поверхности среды и механически гомогенизировали растиранием в 0,9%-ном растворе NaCl, отстаивали в течение 10-15 мин для осаждения микобактериальных клампов; надосадочную часть доводили до концентрации $9 \times 10^8 - 10^9$ микробных клеток/мл (3,0-3,3 ед. OD₆₀₀). Полученную суспензию использовали для генерации дормантного фенотипа *M. tuberculosis* (экспериментальные культуры) и в контрольных культурах.

Генерация дормантного фенотипа *M. tuberculosis*

Питательные среды и реагенты. Бульон Middlebrook 7H9 (Difco™) готовили из сухой основы в соответствии с инструкцией производителя с добавлением 0,2 об. % глицерина и 0,05 об. % Tween 80 (Sigma-Aldrich). Из состава среды для генерации дормантного фенотипа (депривированная среда) была исключена добавка Middlebrook ADC Enrichment (BBL™). В качестве контрольной среды использовали полнокомпонентный бульон Middlebrook 7H9. Среда была разлита по 4,0 мл в 7-мл стеклянные пробирки с завинчивающимися крышками. Агар Middlebrook 7H10 (Difco™) готовили из сухой основы в соответствии с инструкцией производителя с внесением добавки Middlebrook OADC Enrichment (BBL™) и разливали в чашки Петри по 20-25 мл.

Условия инкубации культур. В депривированную и контрольную среду инокулировали по 1 мл суспензии *M. tuberculosis* H37Rv, при этом итоговая концентрация микобактериальных клеток в средах составляла $\approx 2,0 \times 10^8$ микробных клеток/мл (0,75-0,79 ед. OD₆₀₀). Инкубацию проводили в термостате при 37°C в течение 30 дней.

Способы детекции и критерии дормантного фенотипа *M. tuberculosis*. Для оценки состояния *M. tuberculosis* в депривированной (экспериментальной) и контрольной культурах начиная со 2-х сут инкубации с периодичностью в 1-3 сут: 1) измеряли оптическую плотность исследуемых культур в единицах McFarland (OD₆₀₀) с помощью нефелометра BD PhoenixSpec (Becton Dickinson), результатом измерения считали среднее арифметическое трех последовательных измерений, проводимых в течение 10 с после встряхивания пробирки с культурой; 2) выполняли высевы на стандартную жидкую питательную среду Middlebrook 7H9 (BD BBL™ MGIT™) по 500 мкл и на плотную питательную среду – агар Middlebrook 7H10 по 20 мкл. Индикацию высевов на агаре осуществляли по наличию видимого роста с подсчетом количества колониеобразующих единиц (КОЕ) и учетом сроков их появления. Морфологию колоний оценивали макроскопически и микроскопически под 200-кратным увеличением. Индикацию высевов на жидкие питательные среды осуществляли в автоматизированной системе культивирования Bactec 960 MGIT (Becton Dickinson) с учетом сроков его появления и величины индекса роста (ИР). Поскольку ИР в системе Bactec 960 MGIT прямо пропорционален интенсивности потребления кислорода микроорганизмами [20], по его величине можно судить об интенсивности энергетического метаболизма МБТ. Оценивали также морфологию микобактериальных клеток экспериментальных и контрольных культур микроскопией препаратов, окрашенных по Цилю – Нильсену на 30-й день культивирования. Выполняли измерение размеров (длины) микобак-

териальных клеток, визуальную оценку их формы, тинкториальных свойств, наличия внутриклеточных включений.

Критериями дормантного состояния *M. tuberculosis* считали: 1) торможение прироста бактериальной массы в жидкой культуре, определяемое по динамике величины OD_{600} ; 2) неспособность к репликации (колониеобразованию) на плотных средах; 3) способность к восстановлению роста на жидких и плотных средах (ресусцитации) после удаления фактора дормантности – при пересеве дормантной культуры в стандартную полнокомпонентную жидкую питательную среду и/или при добавлении к дормантной культуре компонентов, ранее удаленных из среды, с последующей инкубацией; 4) изменения морфологии микобактериальных клеток как дополнительный критерий.

Статистические критерии. Для оценки количественных признаков (величина OD_{600} , число КОЕ, время до появления роста, размеры клеток МБТ и т. п.) использовали показатели описательной статистики – среднее арифметическое с 95%-ным доверительным интервалом (ДИ), стандартное отклонение (SD), размах (range). Для сравнения данных параметров экспериментальных и контрольных культур при выполнении условия нормального распределения согласно одновыборочному критерию Колмогорова – Смирнова использовали t-тест для парных выборок, F-тест для SD, в остальных сравнениях применяли критерий Уилкоксона. Для оценки связи между сроками депривации и ресусцитации МБТ рассчитывали коэффициент корреляции R (Пирсона). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Рост *M. tuberculosis* в депривированной среде. Результаты измерений OD_{600} , представленные на рис. 1, демонстрируют существенные различия динамики значений данного параметра для экспериментальной и контрольной культур ($p < 0,0001$, критерий Уилкоксона). Динамика показателей оптической плотности контрольных культур соответствует классической кривой микобактериального роста в жидкой питательной среде [1] с выходом в стационарную фазу роста к ≈ 15 -му дню культивирования. Оптическая плотность депривированных культур в течение 30 дней наблюдения почти не менялась (SD 0,03, range – 0,12 ед. OD). Таким об-

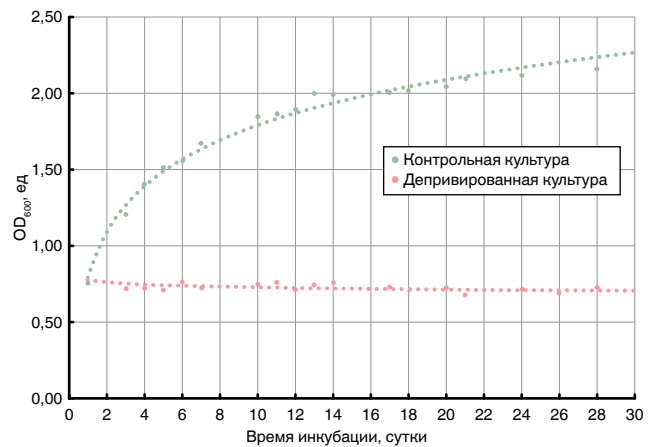


Рис. 1. Динамика значений оптической плотности депривированной и контрольной культур *M. tuberculosis*. Маркерами указаны результаты измерений OD (среднее арифметическое трех последовательных измерений), пунктирами – соответствующие аппроксимирующие (логарифмические) линии тренда

Fig. 1. Changes in optical density values of deprived and control cultures of *M. tuberculosis*. Markers indicate the results of OD measurements (arithmetic mean of three consecutive measurements), dashed lines indicate the corresponding approximating (logarithmic) trend lines

разом прироста бактериальной массы *M. tuberculosis* в условиях депривированной питательной среды не наблюдалось, что свидетельствует об отсутствии репликации микобактериальных клеток.

Способность депривированных МБТ к репликации на плотных средах. По результатам высевов на плотные среды (табл. 1) экспериментальные культуры демонстрировали выраженное снижение способности к размножению в течение 2 и 3 сут депривации – в сравнении с контрольными культурами количество КОЕ было меньше в 15 и 250 раз соответственно. Отмечалось также удлинение сроков появления видимого роста депривированных культур на агаре – в 3,2 и 4,2 раза после 2 и 3 сут депривации соответственно. Морфология колоний, образованных депривированными МБТ на агаре, была типичной для *M. tuberculosis* и не отличалась от морфологии контрольных культур ни макро-, ни микроскопически. С 4-х сут депривации экспериментальные культуры утратили способность формировать колонии на агаре в течение последовавшего 30-дневного срока наблюдения. Предположили,

Таблица 1. Характеристики роста депривированной и контрольной культур *M. tuberculosis* на агаре Middlebrook 7H10

Table 1. Growth characteristics of the deprived and control cultures of *M. tuberculosis* on Middlebrook 7H10 agar

Срок инкубации, сутки	Депривированная культура		Контрольная культура	
	количество КОЕ	срок появления видимого роста, сутки	количество КОЕ	срок появления видимого роста, сутки
2	32	16	> 500	5
3	2	21	> 500	5
4-30	роста нет		> 500	5-6

что потеря репликационной способности МБТ в данном эксперименте обусловлена dormantным состоянием микобактериальных клеток.

Способность к ресусцитации. Для оценки сохранения жизнеспособности депривированных МБТ, т. е. способности к ресусцитации, выполнены высевы экспериментальных культур в стандартную среду Middlebrook 7H9 (BD BBL™ MGIT™), содержащую 10 об. % ADC, которые инкубируются в системе Bactec 960 MGIT. Экспериментальные культуры сохраняли способность к восстановлению роста на жидких средах в течение первых 11 дней депривации (табл. 2). Время до появления роста составляло в экспериментальных культурах 16-29 сут против 1,5-2,5 сут в контрольных культурах ($p = 0,004$, критерий Уилкоксона). При этом сроки появления роста высевок экспериментальных культур удлинялись пропорционально срокам депривации: 16-17 сут в первые 4 дня депривации, 19,5-21 и 23-24 сут в течение 5-8 и 9-10 дней депривации и 29 сут после 11 дней депривации (коэффициент корреляции 0,89, $p = 0,0015$). Время до появления роста высевок контрольных культур оставалось стабильным в течение 30 дней наблюдения (SD 0,43, range – 1,0 сут) и не зависело от сроков предшествовавшей инкубации (коэффициент корреляции -0,36, $p = 0,341$).

Динамика потребления кислорода, регистрируемая по показателю индекса роста Bactec, также существенно различалась в контрольных и экспериментальных культурах. На рис. 2 представлены полученные нами ранее результаты мониторинга показателя ИР в пересевах культур МБТ, предварительно инкубированных в стандартной среде Middlebrook 7H9 в течение 2, 20, 75, 90 и 460 сут, в сравнении с величинами ИР высевок культур *M. tuberculosis* после 9, 10 и 11 сут инкубации в условиях депривации ADC. Значения ИР учитывались в течение 35 сут инкубации в системе Bactec 960 MGIT.

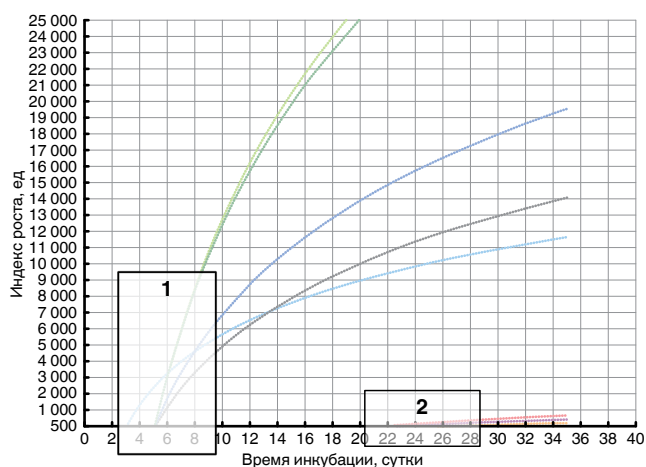


Рис. 2. Динамика потребления кислорода МБТ в жидкой питательной среде (по ИР Bactec): 1 – контрольные культуры, предварительно инкубированные в стандартной питательной среде в течение 2, 20, 75, 90, 460 дней, 2 – экспериментальные культуры после 9, 10, 11 дней депривации; логарифмическая аппроксимация

Fig. 2. Changes of oxygen consumption by *M. tuberculosis* in a liquid nutrient medium (according to Bactec IR): 1 – control cultures previously incubated in a standard nutrient medium for 2, 20, 75, 90, 460 days, 2 – experimental cultures after 9, 10, 11 days of deprivation; logarithmic approximation

Как видно из представленных данных, МБТ в логарифмической, ранней и поздней стационарной фазах культивирования в стандартной среде демонстрировали схожие кривые потребления кислорода при их субкультивировании в свежей питательной среде – начиная с 3-5 сут регистрировалось быстрое нарастание ИР до уровней десятков тысяч единиц. В отличие от них, МБТ после культивирования в депривированной среде восстанавливали способность к росту/потреблению O_2 только после 16 сут субкультивирования и характеризовались

Таблица 2. Показатели восстановления роста депривированной и контрольной культур при пересеве в стандартную среду Middlebrook 7H9

Table 2. Indicators of growth restoration of deprived and control cultures when repeatedly inoculated in the standard medium of Middlebrook 7H9

Срок инкубации, сут	Депривированная культура		Контрольная культура	
	наличие роста	время до детекции, сутки	наличие роста	время до детекции, сутки
2	есть	17	есть	2,5
3	есть	16	есть	2
4	есть	17	есть	1,5
5	есть	21	есть	2
6	есть	21	есть	2,5
8	есть	19,5	есть	2
9	есть	24	есть	2,5
10	есть	23	есть	1,5
11	есть	29	есть	1,5
12	нет	-	есть	2
13-30	нет	-	есть	1,5-2,5

существенно более низкими значениями и темпами нарастания ИР. Очевидно, низкий уровень потребления кислорода и выраженное замедление темпов восстановления депривированных культур при пересеве их в стандартную полносоставную среду свидетельствуют о низкой интенсивности протекания окислительно-восстановительных реакций. Сниженная интенсивность энергетического метаболизма (дыхания) *M. tuberculosis* – один из характерных признаков дормантного состояния микобактерий, являющихся облигатными аэробами [15].

Далее для подтверждения того, что устранение фактора, вероятно вызвавшего состояние дормантности МБТ, стимулирует возврат микобактериальных клеток к состоянию активного деления, АДС добавлена в экспериментальные культуры до стандартного 10%-ного содержания после 4, 8 и 20 сут предварительной депривации. После устранения депривации культуры инкубированы в течение 4, 8 и 20 сут соответственно. Затем аликвоты восстановленных (дедепривированных) культур высеяны на агаровые и жидкие среды Middlebrook 7Н10 и 7Н9 Bactec, результаты высевок представлены в табл. 3. Таким образом, добавление в депривированную среду недостающих компонентов после 4 сут депривации и последующие 4 сут дедепривации и 8/8 сут депривации/дедепривации приводили к восстановлению способности *M. tuberculosis* к размножению на жидких средах через 11-8 и 9-5 сут соответственно, а на плотных средах – в сроки 17-12 и 12-5 сут соответственно. Чем дольше было время инкубации МБТ в восстановленной среде после устранения депривации, тем меньшим было время до появления роста восстановленных культур в посевах на плотные и жидкие среды (коэффициенты корреляции -0,99, $p < 0,0001$ и -0,92, $p = 0,001$ для плотных и жидких сред соответственно). Добавление АДС к экспериментальным культурам после 20 сут депривации не привело к восстановлению репликативной способности ни на плотных, ни на жидких средах.

Морфология МБТ в депривированных культурах. Рис. 3 демонстрирует изменения клеточной морфологии МБТ, культивированных в депривированной среде. МБТ экспериментальных культур характеризовались меньшими размерами длины клетки. По результатам 30 случайных измерений средняя длина микобактериальных клеток из депривированной среды составила 1,70 (95%-ный ДИ 1,47-1,94), SD 0,63 мкм против 5,53 (95%-ный ДИ 4,54-6,51), SD 2,63 мкм МБТ контрольных культур ($p < 0,0001$, t-тест для парных выборок). Минимальные и максимальные размеры измеренных МБТ находились в пределах 2,16-13,5, range

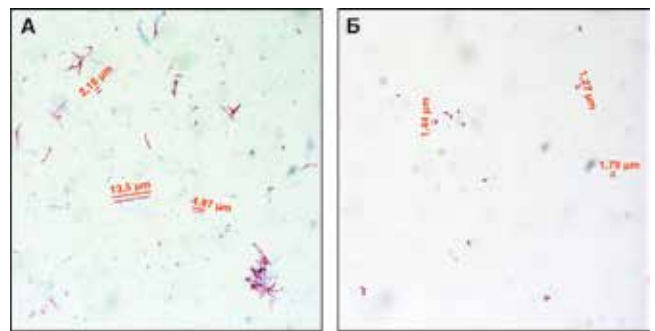


Рис. 3. Микрофотографии *M. tuberculosis* контрольной (А) и депривированной (Б) культур, окраска по Цилю – Нильсену (×1000)

Fig. 3. Microphotographs of *M. tuberculosis* in the control (А) and deprived (Б) cultures, Ziehl-Neelsen staining (×1000)

11,34 мкм и 1,06-3,58, range 2,52 мкм для экспериментальных и контрольных культур соответственно. Таким образом, популяция МБТ в условиях инкубации в депривированной среде характеризовалась, во-первых, меньшими размерами клеток, во-вторых, менее выраженным полиморфизмом их размеров ($p < 0,001$, F-тест для SD). Вероятно, описанные изменения вызваны прекращением не только деления, но и роста микобактериальных клеток в условиях депривации вышеуказанных компонентов

Таблица 3. Показатели восстановления экспериментальных культур на плотных и жидких средах после устранения депривации

Table 3. Indicators of the restoration of experimental cultures on solid and liquid media after elimination of deprivation

время после устранения депривации, сут	После 4 сут депривации				После 8 сут депривации				
	рост на ПС** (agar Middlebrook 7Н10)		рост в ЖС*** (Bactec)		рост на ПС** (agar Middlebrook 7Н10)		рост в ЖС*** (Bactec)		
	число КОЕ*	время появления, сут	наличие роста	время до детекции, сут	число КОЕ*	время появления, сут	наличие роста	время до детекции, сут	
4	≈ 250	17	есть	11	9	≈ 100	12	есть	9
6	≈ 500	14	есть	11	12	≈ 400	9	есть	7,5
7	≈ 250	13	есть	8	15	≈ 500	7	есть	6
8	> 500	12	есть	8	17	> 500	5	есть	5

Примечание: * – в пересчете на 1 мл посева; ** – ПС – плотные среды; *** – ЖС – жидкие среды

питательной среды. МБТ депривированных культур сохраняли палочковидную форму и кислотоустойчивость в окраске по Цилю – Нильсену, но не имели внутриклеточных включений, характерных для МБ клеток логарифмической и стационарной фаз роста.

В результате культивирования *M. tuberculosis* в среде Middlebrook 7H9 в условиях депривации входящих в ее стандартный состав альбумина бычьей сыворотки, декстрозы, хлорида натрия, каталазы получена популяция *M. tuberculosis*, характеризующаяся рядом фенотипических признаков дормантного состояния. Полученный фенотип МБТ характеризовался отсутствием деления микобактериальных клеток, снижением респираторной активности, утратой способности к размножению на плотных питательных средах. Устранение факторов, вызвавших дормантность, приводило к быстрому восстановлению способности *M. tuberculosis* к репликации на плотных и жидких средах. Дормантное состояние МБТ сохранялось в течение 4-12 сут культивирования в депривированной среде, после чего наблюдалась полная утрата способности МБТ к ресусцитации. Предполагаем, что индуктором дормантности МБТ в нашей модели является дефицит органических нутриентов как источников азота и углерода. Кроме того, недостаток углеводов в питательной среде, вероятно, привел к энергетическому дисбалансу, а депривация хлорида натрия – к снижению осмолярности среды, недостатку ионов натрия и хлора и дисбалансу осмотического давления в микобактериальных клетках. Отсутствие в питательной среде каталазы, фермента, который превращает перекись водорода в кислород и воду и предохраняет бактерии от окислительного стресса, очевидно, усиливает воздействие реактивных метаболитов кислорода и токсичных пероксидов внешней среды на возбудителя и стимулирует их трансформацию в дормантную форму. Не исключено, что отсутствие каталазы снижает концентрацию кислорода, способствуют созданию локальных гипоксических условий для микобактерий, что также способствует индукции дормантности.

Мы сравнили характеристики полученного в нашей модели дормантного фенотипа *M. tuberculosis* с другими старвационными моделями. В модели R. Loebel et al. [13] *M. tuberculosis* демонстрировали снижение потребления кислорода после 4 дней инкубации в забуференном физиологическом растворе с 0,72 до 0,3 мм³/мг в час в течение 5-16 и 0,1 мм³/мг в час в течение 17-47 дней соответственно. При этом репликативная функция МБТ почти не изменялась, авторы зафиксировали отсутствие роста высевок экспериментальных культур только на 2, 9-11-й дни старвации и только в одном из трех повторов опыта. В модели Betts J. C. et al. наблюдалось снижение респираторной активности *M. tuberculosis* после 9 дней инкубации в фосфатно-солевом буфере; способность экспериментальных культур к размножению на плотных средах оставалась на

одном уровне в течение всего срока старвации [2]. M. Gengenbacher et al., воспроизведя модель Betts, также не наблюдали снижения репликации МБТ, но обнаружили пятикратное снижение концентрации внутриклеточной АТФ на 5-й день старвации одновременно со снижением респираторной активности. Стабильно низкий уровень АТФ сохранялся на протяжении всех 42 дней эксперимента [6]. В модели T. Hampshire et al. [8] использовали сокращение количества нутриентов, наступающее в стационарной фазе культивирования МБТ. Авторы продемонстрировали снижение концентрации глицерина до нуля и глюкозы в 25,5 раза от исходной к 15-му и 100-му дню инкубации соответственно. Одновременно наблюдали постепенное в 10 000 раз снижение репликативной способности в интервале к 80-му дню стационарной фазы. После 100 дней инкубации количество жизнеспособных микобактериальных клеток в культуре увеличилось в 4 раза, по мнению авторов, вследствие адаптации МБТ к дефициту нутриентов [8].

Общими находками для вышеописанных и предлагаемой нами моделей является задержка роста МБТ в условиях старвации и снижение интенсивности окислительно-восстановительных процессов. Тем не менее только в нашей модели показаны утрата способности *M. tuberculosis* к репликации на плотных и жидких средах и их ресусцитация после устранения действия индуктора дормантности. Другим преимуществом предлагаемой модели является простота исполнения, в отличие от других депривационных моделей дормантности МБТ *in vitro*, требующих существенной модификации питательных сред и намного более длительной инкубации [11, 14, 17]. В нашем случае использование стандартизированной по составу среды Middlebrook 7H9, коммерчески широкодоступной, позволит получить воспроизводимые результаты моделирования.

Основной сферой практического приложения представленной модели предполагается исследование эффекта антимиобактериальных средств на дормантные формы *M. tuberculosis*. Фенотипическая лекарственная толерантность, одна из ключевых характеристик бактериальной дормантности, препятствует эрадикации возбудителя из организма под действием стандартной этиотропной терапии ТБ/ЛТИ, создавая предпосылки для дальнейшей персистенции патогена, риска рецидивов/реактивации. Поэтому поиск способов стерилизующего воздействия на дормантные формы МБТ является актуальной задачей эффективного ТБ контроля. Кроме того, предлагаемая модель дормантности *M. tuberculosis* может быть использована для дальнейшего изучения молекулярно-генетических, биохимических, физиологических и т. п. механизмов данного феномена, а также для исследований иммунологических и патогенетических реакций организма в экспериментальных моделях ЛТИ *in vivo* и *ex vivo*.

Заклучение

Разработана новая *in vitro* модель дормантности МБТ, основанная на бульонном культивировании их в среде Middlebrook 7H9 в условиях депривации альбумина, декстрозы, хлорида натрия, каталазы. Показано, что дормантный фенотип *M. tuberculosis* формируется между 4-м и 12-м днем культивирования и характеризуется потерей способности клеток к репликации *in vitro* на плотных питательных средах, снижением респираторной активности и выражен-

ными морфологическими изменениями. В течение данного срока дормантные МБТ сохраняли жизнеспособность (способность к ресусцитации); устранение фактора, вызвавшего дормантность МБТ, приводило к быстрому восстановлению их способности к росту на плотных и жидких средах. Предложенная модель проста в исполнении, легко воспроизводима и может быть использована для изучения антимикробактериальных эффектов различных соединений на дормантные формы МБТ и исследований механизмов бактериальной дормантности.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов.

Conflict of Interests. The authors state that they have no conflict of interests.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шлегель Г. Общая микробиология. - М.: Мир, 1987. - 567 с.
2. Betts J. C., Lukey P. T., Robb L. C., McAdam R. A., Duncan K. Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling // *Molecular Microbiology*. - 2002. - Vol. 43. - P. 717-731.
3. Deb C., Lee C. M., Dubey V. S., Daniel J., Abomoelak B., Sirakova T. D., Pawar S., Rogers L., Kolattukudy P. E. A novel in vitro multiple-stress dormancy model for *Mycobacterium tuberculosis* generates a lipid-loaded, drug-tolerant, dormant pathogen // *PLoS ONE*. - 2009. - Vol. 4, № 6. - P. e6077.
4. Ehlers S. Lazy, dynamic or minimally recrudescence? On the elusive nature and location of the mycobacterium responsible for latent tuberculosis // *Infection*. - 2009. - Vol. 37, № 2. - P. 87-95.
5. Gengenbacher M., Kaufmann S. H. E. *Mycobacterium tuberculosis*: Success through dormancy // *FEMS Microbiology Reviews*. - 2012. - Vol. 36, № 3. - P. 514-532.
6. Gengenbacher M., Rao S. P. S., Pethe K., Dick T. Nutrient-starved, non-replicating *Mycobacterium tuberculosis* requires respiration, ATP synthase and isocitrate lyase for maintenance of ATP homeostasis and viability // *Microbiology*. - 2010. - Vol. 156. - P. 81-87.
7. Goodsmith N., Guo X. V., Vandal O. H., Vaubourgeix J., Wang R., Botella H., Song S., Bhatt K., Liba A., Salgame P., Schnappinger D., Ehrh S. Disruption of an *M. tuberculosis* membrane protein causes a magnesium-dependent cell division defect and failure to persist in mice // *PLOS Pathogens*. - 2015. - Vol. 11, № 2. - P. 1-23.
8. Hampshire T., Soneji S., Bacon J., James B. W., Hinds J., Laing K., Stabler R. A., Marsh P. D., Butcher P. D. Stationary phase gene expression of *Mycobacterium tuberculosis* following a progressive nutrient depletion: A model for persistent organisms? // *Tuberculosis*. - 2004. - Vol. 84. - P. 228-238.
9. Kaprelyants A. S., Gottschal J. C., Kell D. B. Dormancy in non-sporulating bacteria // *FEMS Microbiology Reviews*. - 1993. - Vol. 10, № 3-4. - P. 271-285.
10. Keren I., Minami S., Rubin E., Lewis K. Characterization and transcriptome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* persists // *mBio*, 2011. - Vol. 2, № 3. - P. e00100- e00111.
11. Kurthkoti K., Amin H., Marakalala M. J., Ghanny S., Subbian S., Sakatos A., Livny J., Fortune S. M., Berney M., Rodriguez G. M. The capacity of *Mycobacterium tuberculosis* to survive iron starvation might enable it to persist in iron-deprived microenvironments of human granulomas // *mBio*. - Vol. 8, № 4. - P. 1-17.
12. Lakshminarayana S. B., Huat T. B., Ho P. C., Manjunatha U. H., Dartois V., Dick T., Srinivasa R. P. S. Comprehensive physicochemical, pharmacokinetic and activity profiling of anti-TB agents // *J. Antimicrob. Chemotherapy*. - 2015. - Vol. 70. - P. 857-867.
13. Loebel R. O., Shorr E., Richardson H. B. The Influence of adverse conditions upon the respiratory metabolism and growth of human tubercle bacilli // *J. Bacteriology*. - 1933. - Vol. 26, № 2. - P. 167-200.
14. Rifat D., Bishai W. R., Karakousis P. C. Phosphate Depletion: A Novel Trigger for *Mycobacterium tuberculosis* Persistence // *J. Infect. Dis.* - 2009. - Vol. 200. - P. 1126-1135.

REFERENCES

1. Slegel G. *Obschaya mikrobiologiya*. [General microbiology]. Moscow, Mir Publ., 1987, 567 p.
2. Betts J.C., Lukey P.T., Robb L.C., McAdam R.A., Duncan K. Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. *Molecular Microbiology*, 2002, vol. 43, pp. 717-731.
3. Deb C., Lee C.M., Dubey V.S., Daniel J., Abomoelak B., Sirakova T.D., Pawar S., Rogers L., Kolattukudy P.E. A novel in vitro multiple-stress dormancy model for *Mycobacterium tuberculosis* generates a lipid-loaded, drug-tolerant, dormant pathogen. *PLoS ONE*, 2009, vol. 4, no. 6, pp. e6077.
4. Ehlers S. Lazy, dynamic or minimally recrudescence? On the elusive nature and location of the mycobacterium responsible for latent tuberculosis. *Infection*. 2009, vol. 37, no. 2, pp. 87-95.
5. Gengenbacher M., Kaufmann S.H.E. *Mycobacterium tuberculosis*: Success through dormancy. *FEMS Microbiology Reviews*, 2012, vol. 36, no. 3, pp. 514-532.
6. Gengenbacher M., Rao S.P.S., Pethe K., Dick T. Nutrient-starved, non-replicating *Mycobacterium tuberculosis* requires respiration, ATP synthase and isocitrate lyase for maintenance of ATP homeostasis and viability. *Microbiology*, 2010, vol. 156, pp. 81-87.
7. Goodsmith N., Guo X.V., Vandal O.H., Vaubourgeix J., Wang R., Botella H., Song S., Bhatt K., Liba A., Salgame P., Schnappinger D., Ehrh S. Disruption of an *M. tuberculosis* membrane protein causes a magnesium-dependent cell division defect and failure to persist in mice. *PLOS Pathogens*, 2015, vol. 11, no. 2, pp. 1-23.
8. Hampshire T., Soneji S., Bacon J., James B.W., Hinds J., Laing K., Stabler R.A., Marsh P.D., Butcher P.D. Stationary phase gene expression of *Mycobacterium tuberculosis* following a progressive nutrient depletion: A model for persistent organisms? *Tuberculosis*, 2004, vol. 84, pp. 228-238.
9. Kaprelyants A.S., Gottschal J.C., Kell D.B. Dormancy in non-sporulating bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 1993, vol. 10, no. 3-4, pp. 271-285.
10. Keren I., Minami S., Rubin E., Lewis K. Characterization and transcriptome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* persists. *mBio*, 2011, vol. 2, no. 3, pp. e00100- e00111.
11. Kurthkoti K., Amin H., Marakalala M.J., Ghanny S., Subbian S., Sakatos A., Livny J., Fortune S.M., Berney M., Rodriguez G.M. The capacity of *Mycobacterium tuberculosis* to survive iron starvation might enable it to persist in iron-deprived microenvironments of human granulomas. *mBio*, vol. 8, no. 4, pp. 1-17.
12. Lakshminarayana S.B., Huat T.B., Ho P.C., Manjunatha U.H., Dartois V., Dick T., Srinivasa R.P.S. Comprehensive physicochemical, pharmacokinetic and activity profiling of anti-TB agents. *J. Antimicrob. Chemotherapy*, 2015, vol. 70, pp. 857-867.
13. Loebel R.O., Shorr E., Richardson H.B. The Influence of adverse conditions upon the respiratory metabolism and growth of human tubercle bacilli. *J. Bacteriology*, 1933, vol. 26, no. 2, pp. 167-200.
14. Rifat D., Bishai W.R., Karakousis P.C. Phosphate Depletion: A Novel Trigger for *Mycobacterium tuberculosis* Persistence. *J. Infect. Dis.*, 2009, vol. 200, pp. 1126-1135.

15. Rittershaus E. S. C., Baek S. H., Sassetti C. M. The normalcy of dormancy: common themes in microbial quiescence // *Cell Host and Microbe*. - 2013. - Vol. 13, Issue 6. - P. 643-651.
16. Rodríguez J. G., Hernández A. C., Helguera-Repetto C., Aguilar Ayala D., Guadarrama-Medina R., Anzola J. M., Bustos J. R., Zambrano M. M., González-y-Merchand J., García M. J., Portilloa P. D. Global adaptation to a lipid environment triggers the dormancy-related phenotype of *Mycobacterium tuberculosis* // *mBio*. - 2014. - Vol. 5, № 3. - P. e01125- e01114.
17. Salina E. G., Waddell S. J., Hoffmann N., Rosenkrands I., Butcher P. D., Kaprelyants A. S. Potassium availability triggers *Mycobacterium tuberculosis* transition to, and resuscitation from, non-culturable (dormant) states // *Open Biology*. - 2014. - Vol. 4, № 10. - P. 140106-140106.
18. Shiloh M. U., Manzanillo P., Cox J. S. *Mycobacterium tuberculosis* senses host-derived carbon monoxide during macrophage infection // *Cell Host and Microbe*. - 2008. - Vol. 3, № 5. - P. 323-330.
19. Shleeva M. O., Kudykina Y. K., Vostroknutova G. N., Suzina N. E., Mulyukin A. L., Kaprelyants A. S. Dormant ovoid cells of *Mycobacterium tuberculosis* are formed in response to gradual external acidification // *Tuberculosis*. - 2011. - Vol. 91. - P. 146-154.
20. Siddiqi S. H., Rusch-Gerdes S. Руководство по работе с Системой BACTEC MGIT 960. FIND, 2006.
21. Taneja N. K., Dhingra S., Mittal A., Naresh M., Tyagi J. S. *Mycobacterium tuberculosis* transcriptional adaptation, growth arrest and dormancy phenotype development is triggered by vitamin C // *PLoS One*. - 2010. - Vol. 5, № 5. - P. 18-24.
22. Veatch A. V., Kaushal D. Opening Pandora's Box: Mechanisms of *Mycobacterium tuberculosis* Resuscitation // *Trends in Microbiology*. - 2018. - Vol. 26, № 2. - P. 145-157.
23. Voskuil M. I., Schnappinger D., Visconti K. C., Harrell M. I., Dolganov G. M., Sherman D. R., Schoolnik G. K. Inhibition of respiration by nitric oxide induces a *Mycobacterium tuberculosis* dormancy program // *J. Experim. Med.* - 2003. - Vol. 198. - P. 705-713.
24. Ward S. K., Hoye E. A., Talaat A. M. The Global responses of *Mycobacterium tuberculosis* to physiological levels of copper // *J. Bacteriology*. - 2008. - Vol. 190. - P. 2939-2946.
25. Wayne L. G., Hayes L. G. An in vitro model for sequential study of shutdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence // *Infection and Immunity*. - 1996. - Vol. 64. - P. 2062-2069.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:

ФГБУ «Новосибирский НИИ туберкулеза» МЗ РФ,
630040, г. Новосибирск, ул. Охотская, д. 81а.

Батыршина Яна Рэмовна

врач-бактериолог.

Тел./факс: +7 (383) 203-83-62, +7 (383) 203-78-25.

E-mail: batirshina@inbox.ru

Шварц Яков Шмульевич

заместитель директора по науке.

Тел./факс: +7 (383) 203-83-58, +7 (383) 203-78-25.

E-mail: yshschwartz@mail.ru

INFORMATION ABOUT AUTHORS:

Novosibirsk Tuberculosis Research Institute,
81a, Okhotskaya St., Novosibirsk, 630040

Yana R. Batyrshina

Bacteriologist.

Phone/Fax: +7 (383) 203-83-62, +7 (383) 203-78-25.

Email: batirshina@inbox.ru

Yakov Sh. Shwarts

Deputy Director for Research.

Phone/Fax: +7 (383) 203-83-58, +7 (383) 203-78-25.

Email: yshschwartz@mail.ru

Поступила 14.05.2019

Submitted as of 14.05.2019