

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Фурсов М. В., Дятлов И. А., Потапов В. Д.

## МОДЕЛИ ПОКОЯЩЕГОСЯ СОСТОЯНИЯ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* IN VITRO И ЛАТЕНТНОЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ IN VIVO

ФБУН «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора,  
142279, Оболенск, Московская обл., Россия

*Моделирование латентной туберкулезной инфекции (ЛТБИ) осуществляется в целях выяснения аспектов туберкулезного патогенеза, а также тестирования новых лекарственных противотуберкулезных препаратов. В настоящем обзоре дана характеристика in vitro-моделей (n=16) покоящегося состояния Mycobacterium tuberculosis и in vivo-моделей (n=14) получения латентной туберкулезной инфекции на разных видах животных, опубликованных в отечественной и зарубежной научной литературе к настоящему времени. Представлено краткое описание модели и полученные авторами основные результаты. Анализ литературных данных отображает спектр методических приемов, позволяющих исследователям изучать механизм перехода клеток M. tuberculosis в покоящееся состояние и выхода из него, а также процессы перехода активной туберкулезной инфекции в латентную форму и ее реактивации.*

**Ключевые слова:** туберкулез; латентная туберкулезная инфекция; ЛТБИ; *Mycobacterium tuberculosis*; модели in vitro; модели in vivo; обзор.

**Для цитирования:** Фурсов М. В., Дятлов И. А., Потапов В. Д. Модели покоящегося состояния *Mycobacterium tuberculosis* in vitro и латентной туберкулезной инфекции in vivo. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (5): 299-307. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-5-299-307>

Fursov M.V., Dyatlov I.A., Potapov V.D.

### IN VITRO MODELS OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* DORMANCY, AND IN VIVO MODELS OF LATENT TUBERCULOSIS INFECTION

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, 142279, Obolensk, Moscow Region, Russia

*Modeling of tuberculosis infection is carried out in order to clarify various aspects of the tuberculosis pathogenesis, as well as the testing of new anti-tuberculosis drugs. The characteristic of in vitro models (n = 16) for Mycobacterium tuberculosis dormant state and in vivo models (n = 14) for the latent tuberculosis infection involving several animal species published to date are presented in this review. A brief description of the models and the results obtained by the authors are presented. The analysis of the published data reflects the list of methodological procedures that allow researchers to study the mechanism of the transition of M. tuberculosis cells to a dormant state and reverse to metabolically active state, as well as the process of conversion of active tuberculosis infection to a latent tuberculosis and reactivation.*

**Key words:** tuberculosis; latent tuberculosis infection; LTBI; *Mycobacterium tuberculosis*; models in vitro; models in vivo; review.

**For citation:** Fursov M.V., Dyatlov I.A., Potapov V.D. In vitro models of *Mycobacterium tuberculosis* dormancy, and in vivo models of latent tuberculosis infection. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (5): 299-307 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-5-299-307>

**For correspondence:** Fursov M.V., researcher of the Department for Training and Improvement of Specialists; e-mail: [mikhail.fursov88@gmail.com](mailto:mikhail.fursov88@gmail.com)

#### Information about authors:

Fursov M. V. <https://orcid.org/0000-0001-9137-9551>

Dyatlov I.A. <https://orcid.org/0000-0003-1078-4585>

Potapov V. D. <https://orcid.org/0000-0002-5336-8234>

**Conflict of interests.** The authors declare absence of conflict of interests.

**Acknowledgment.** The study had no sponsor support.

Received 14.03.2019

Accepted 20.03.2019

**Введение.** Туберкулезная инфекция входит в первую десятку смертельных инфекций в мире. В 2016 г. заболело 10,4 млн людей, в том числе 6,2 млн мужчин, 3,2 млн женщин и 1 млн детей. При этом умерло 1,7 млн человек, в том числе 0,4 млн ВИЧ-инфицированных. Около 95 % смертей от туберкулеза зафиксировано в слабо- и среднеразвитых странах. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), около ¼ человеческой популяции являются носителями латентной туберкулезной инфекции (ЛТБИ) без проявления

симптомов заболевания. Опасность ЛТБИ заключается в том, что высока вероятность активации инфекционного процесса – в течение жизни человека она составляет 5-15 %, а у некоторых групп населения с подавленной иммунной системой (ВИЧ-инфицированных, больных диабетом, курильщиц табака) – гораздо выше [1].

Наличие ЛТБИ у человека в отсутствие клинических признаков активного заболевания может быть определено с помощью реакции иммунологической сенсibilизации микобактериальными белками (кожная туберкулиновая проба), однако этот метод дает ложноположительные результаты у людей, вакцинированных «Бациллоу Кальметта-Герена» (BCG). В последнее десятилетие разработан новый, более

**Для корреспонденции:** Фурсов Михаил Васильевич, науч. сотр. отдела подготовки и усовершенствования специалистов; e-mail: [mikhail.fursov88@gmail.com](mailto:mikhail.fursov88@gmail.com)

специфичный метод определения ЛТБИ, основанный на высвобождении гамма-интерферона Т-лимфоцитами при контакте со специфическими антигенами *M. tuberculosis* (Interferon- $\gamma$  release assay, IGRA) [2, 3].

При попадании в легкие человека клетки *M. tuberculosis* фагоцитируются альвеолярными макрофагами, что приводит к мощным клеточно-опосредованным иммунным реакциям и образованию гранул, которые состоят, в основном, из Т-клеток и макрофагов, инфицированных туберкулезным микробом [4, 5]. Гранулемы подвергаются казеозному некрозу, что приводит к гибели большинства туберкулезных бактерий; при этом происходит разрушение участков тканей макроорганизма, окружающих гранулемы. Внутри образующихся каверн может присутствовать небольшое количество выживших туберкулезных бактерий, которые находятся в нереплицирующей форме с пониженной метаболической активностью [6, 7].

Клинические исследования латентной туберкулезной инфекции у человека и испытания новых диагностических, профилактических и лекарственных противотуберкулезных средств на человеке – высоко затратные и сложно выполнимые мероприятия. Экспериментальные исследования биологическими методами на животных моделях позволяют получить данные, восполняющие невозможность проведения клинических испытаний. Несмотря на то, что животные модели не позволяют полностью воспроизводить особенности развития туберкулезной инфекции у человека, они позволяют получить много полезных сведений о патогенезе инфекции и механизмах действия испытываемых противотуберкулезных препаратов. Использование биологических моделей *in vivo* и *in vitro* позволяет исследователям получить ответы на конкретные вопросы, связанные с переходом туберкулезного микроба в покоящееся состояние и активации туберкулезного процесса у пациентов.

Способность переходить в покоящееся состояние является важной особенностью клеток возбудителя туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis*. В научной литературе используется несколько разных взаимозаменяемых терминов для обозначения данного явления: «состояние покоя», «дормантность», «латентность» и «персистенция». Основными признаками перехода туберкулезного микроба в состояние покоя является сниженная метаболическая активность, устойчивость к антимикробным препаратам и отсутствие роста при культивировании на стандартных плотных питательных средах [8].

Существует большая путаница в отношении терминов покоящегося состояния микобактерий (дормантности), персистенции и латентной инфекции. Например, бактерии в модели Wayne and Hayes называли «покоящимися бактериями», но при этом при высеве на твердые питательные среды авторами были отмечены высокие значения колониеобразующих единиц (КОЕ) [9-11]. Для устранения дальнейшей терминологической путаницы было предложено использовать термины в следующих значениях: «покоящиеся бактерии» - бактерии, некультивируемые на твердых питательных средах, устойчивые к антимикробным препаратам, морфологически измененные и имеющие замедленный метаболизм [12]; «персистенция» - явление, отражающее способность бактерий выживать в организме хозяина в ходе продолжительной антибиотикотерапии - в отличие от покоящихся клеток, «клетки-персистеры» способны расти на твердых питательных средах; «латентная инфекция» - сбалансированное состояние взаимодействия бактерии и хозяина *in vivo*, не вызывающее видимых симптомов инфекции [13].

Данный обзор посвящен систематическому анализу опубликованных в отечественной и зарубежной научной литературе экспериментальных исследований по моделированию покоящегося состояния клеток *M. tuberculosis in vitro* и латентной туберкулезной инфекции *in vivo*. Хотя ни одна из описанных моделей не воспроизводит полностью ЛТБИ человека, эти мо-

дели внесли большой вклад в исследование отдельных этапов и механизмов феномена латентности и покоящегося состояния *M. tuberculosis*.

## Модели для изучения покоящегося состояния возбудителя туберкулеза *in vitro*

Моделирование формирования покоящегося состояния клеток *M. tuberculosis in vitro* важно для понимания процессов перехода микобактерий в дормантное состояние, поддержания этого статуса и выхода из него (реактивации туберкулезного микроба). К настоящему времени в доступной отечественной и зарубежной литературе нами обнаружены сведения о 16 разработанных моделях получения покоящихся форм *M. tuberculosis in vitro* в период с 1933 по 2017 г. (см. рисунок). В обзоре рассмотрены параметры, на которых основана конкретная модель (использованные штаммы *M. tuberculosis*, питательные среды, условия культивирования микобактерий), и полученные результаты. Большинство моделей получения покоящихся клеток *M. tuberculosis* основаны на длительном культивировании микобактерий в стрессовых условиях: кислородное голодание [14-16], недостаток питательных веществ [17-19], окислительный стресс [20], постепенное снижение pH [19, 21] и др. Использование перечисленных стрессов для микобактерий моделирует условия, в которых они существуют в гранулемах человека, больного туберкулезом [22].

### 1. Многолетний эксперимент Corper&Cohn, 1933 г. [29]

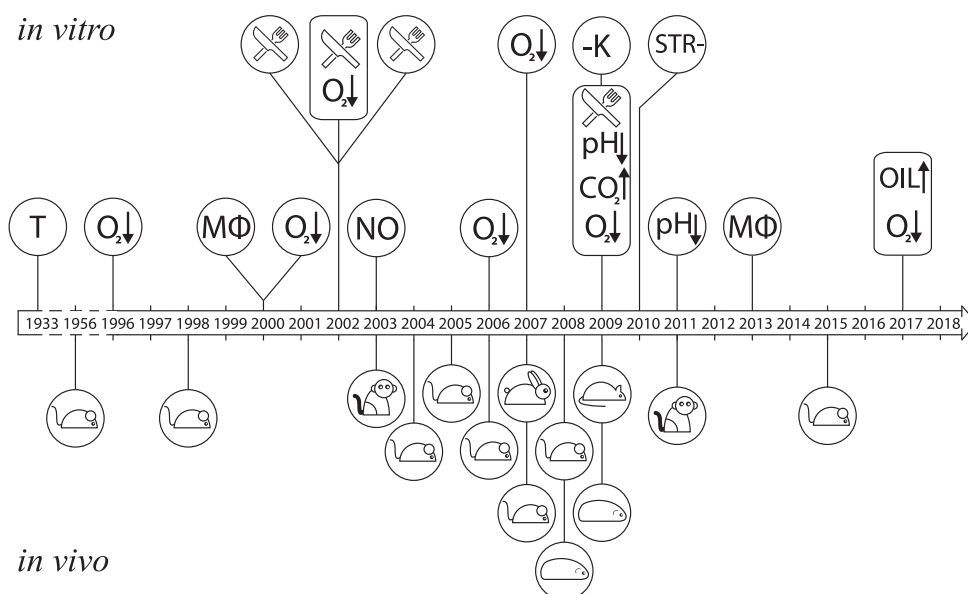
В Национальном Еврейском госпитале (Денвер, США) проведен многолетний эксперимент, начавшийся в 1920 г., по выращиванию культур 8 штаммов *M. tuberculosis* в жидкой питательной среде. Культивирование микобактерий проводили при температуре 37 °С. После 12 лет инкубирования культур *M. tuberculosis* на дне колб получены жизнеспособные клетки микобактерий, среди которых присутствовали морфологически измененные оvoidные формы. Вирулентность туберкулезных бактерий после длительного культивирования была подтверждена с помощью внутривенного введения морским свинкам и кроликам в 1942 г. после 70 пассажей и в 1943 г. после 77 пассажей.

### 2. Модель L.G.Wayne & L.G. Hayes, 1996 г.

На базе Медицинского Центра и Университета штата Калифорнии (США) разработана одна из самых популярных и цитируемых в научной литературе *in vitro* модель L.G.Wayne & L.G.Hayes [14], которая основана на постепенном истощении кислорода в закрытых пробирках с культурой *M. tuberculosis* H37Rv при перемешивании. Авторами изучена динамика чувствительности микобактерий к противотуберкулезным препаратам изониазиду, рифампицину, ципрофлоксацину и метронидазолу в ходе длительного культивирования в анаэробных условиях. Идентифицированы стадии покоящегося состояния клеток: нереплицирующиеся персисторы 1 (nonreplicating persistent stage 1, NRP1) и нереплицирующиеся персисторы 2 (nonreplicating persistent stage 2, NRP2). Переход в покоящуюся форму бактерий *M. tuberculosis* постулирован как эволюционный механизм существования в неблагоприятных условиях окружающей среды для неспорулирующих бактерий.

### 3. Пассирование микобактерий на первичной культуре мышинных макрофагов

При сотрудничестве научных лабораторий ФБУН «Государственный научный центр микробиологии и биотехнологии» (Оболонск), Института биохимии им. А.Н. Баха и Университета Вэйлса (Великобритания) S. Biketov и соавт. [30] в 2000 г. опубликована *in vitro* модель, основанная на



Временная шкала разработки *in vitro* моделей получения покоящихся форм клеток *M. tuberculosis* и *in vivo* моделей получения латентной туберкулезной инфекции у животных: T – продолжительное культивирование; (O<sub>2</sub>↓) – недостаток кислорода; (MФ) – культивирование внутри макрофагов; (⊗) – голодание; (CO<sub>2</sub>↑) – повышенная концентрация углекислого газа; (NO) – NO стресс; (\*K) – бескалорийная среда; (pH↓) – пониженное значение pH среды; (STR-) – отсутствие стрептомицина; (OIL↑) – повышенное содержание липидов; (☹) – модель на мышах; (🐒) – модель на низших приматах; (🐰) – модель на кроликах; (🐹) – модель на морских свинках; (🐭) – модель на крысах.

выращивании клеток двух штаммов *M. tuberculosis* Academia и H37Rv в течение 15 дней в питательной среде Sauton при температуре 37 °C аэробно, с последующим введением мышам линии BALB/c внутрибрюшинно. Через 4–14 дней выделяли макрофаги из асцитной жидкости мышей. Проводили лизис макрофагов и анализировали КОЕ микобактерий. Полученной суспензией клеток осуществляли второй пассаж микобактерий через организм мышей (внутрибрюшинно в дозе 10<sup>4</sup> КОЕ). Выделение и анализ первичных макрофагов повторяли как описано выше. В результате двукратного пассажа клеток микобактерий через организм мышей и первичные культуры мышинных макрофагов получены коккоидные формы клеток *M. tuberculosis* в состоянии покоя, размером менее 0,45 мкм. Реактивацию покоящихся форм наблюдали в присутствии белков факторов реактивации (resuscitation-promoting factors, Rpf).

#### 4. Выращивание микобактерий без аэрации в течение 100 дней

В Университете Лондона Y. Hu и соавт. [15] заложили эксперимент, направленный на изучение выживания клеток штамма *M. tuberculosis* H37Rv в питательной среде Middlebrook 7H9 без аэрации в течение 100 дней. В дальнейшем к культуре добавляли рифампицин (100 мкг/мл) и инкубировали в течение 5 дней при температуре 37 °C. Показано, что длительное культивирование штамма *M. tuberculosis* H37Rv в стационарной фазе без аэрации привело к формированию рифампицин-устойчивых микобактериальных клеток, которые расценивали как дормантные формы. Показано что полученные клетки сохраняли транскрипционную активность.

#### 5. Модель голодания

В лабораториях британской фармацевтической компании GlaxoSmithKline в 2002 г. J.C.Betts и соавт. [17] предложено *in vitro* моделирование покоящегося состояния

возбудителя туберкулеза с помощью выращивания культуры *M. tuberculosis* H37Rv до логарифмической фазы в питательной среде Middlebrook 7H9 при температуре 37 °C в течение 7 дней. Выросшие клетки микобактерий дважды отмывали фосфатным буфером и ресуспендировали в этом буфере, затем продолжали культивирование при той же температуре. Определение показателя КОЕ проводили через 0, 1, 2, 3 и 6 недель. С помощью анализа протеома и транскриптома продемонстрировано глобальное снижение уровня экспрессии генов в клетках бактерий в условиях голодания. При этом бациллы сохраняли устойчивость к метронидазолу, в отличие от бацилл, полученных в модели Wayne L.G. & Hayes L.G. 1996 г., описанной выше. Морфология колоний микобактерий была изменена, клеточная стенка бацилл была утолщена, что подтверждало их дормантное состояние.

#### 6. Продолжительное культивирование в стационарной фазе

Модель, разработанная сотрудниками Института биохимии им. А.Н. Баха и Университета Вэйлса М.О. Shleeva и соавт. [31], демонстрирует формирование «некультивируемых» клеток *M. tuberculosis* в продолжительной стационарной фазе. Клетки штамма *M. tuberculosis* Academia выращивали в питательной среде Sauton в закрытых пластиковых пробирках стационарно при температуре 37 °C в течение 8 мес. Для получения популяций деклампирированных клеток культуру пропускали через фильтры с различным диаметром (50; 20; 4; 2; 1,5; 0,8 и 0,45 мкм). Полученные овоидные клетки размером 1,2 мкм и кокки размером 0,5–0,7 мкм в фильтрате (1,5 мкм) имели неповрежденные мембраны (не окрашивались йодидом пропидия) и не проявляли никакой дыхательной активности (не окрашивались 5-циано-2,3-ди толил тетразолый хлоридом). После 4 месяцев культивирования осуществляли реактивацию микобактерий в присутствии Rpf белков.

## 7. Культивирование в хемостате

В Центре прикладной микробиологии и исследований, Солсбери (Великобритания) В.W. James и соавт. [18] выращивали культуру *M. tuberculosis* H37Rv в закрытой системе хемостата с постоянным мониторингом температуры, pH, уровня кислорода. Клетки микобактерий выращивали в условиях углеродного голодания с аэрацией и без аэрации. Показано, что при кислородном голодании клетки микобактерий переходят в покоящееся состояние, характеризующееся измененным профилем экспрессии генов.

## 8. Культивирование в условиях NO-стресса

При сотрудничестве лабораторий Стэнфордской медицинской школы, университетов Колорадо, Вашингтона и Калифорнии (США) M.I. Voskuil и соавт. [20] продемонстрировали подавление процесса дыхания в клетках *M. tuberculosis* штамма H37Rv малыми дозами закиси азота в среде культивирования (50 мкМ диэтилентриамин/оксид азота). Показано, что малые концентрации NO увеличивают уровень экспрессии DosR регулятора, контролирующего регулон, состоящий из 48 генов, который, как было показано ранее, экспрессируется в клетках *M. tuberculosis* в экспериментах *in vivo* и подготавливает бактерии к переходу в покоящееся состояние *in vitro*, подавляет аэробное дыхание и снижает скорость деления клеток.

## 9. Культивирование в условиях голодания при низких значениях pH

В Университете Барселоны (Испания) S. Gordillo и соавт. [32] разработали *in vitro* модель с помощью выращивания клеток штамма *M. tuberculosis* H37Rv на питательной среде Middlebrook 7H9 до стационарной фазы с последующим переносом клеток в модифицированную среду Middlebrook 7H9 (pH = 5,5) и выращивания анаэробно при температуре 37 °C в течение 21 суток. Полученные микобактерии не были способны расти на стандартных питательных средах, но росли на богатой питательной среде, что указывает на их измененную природу. Продемонстрирована экспрессия в клетках генов *acr*, *icl*, *fbpB*, *rpoA* и *recA*, являющихся потенциальными маркерами покоящихся микобактерий.

## 10. Модель кислородного голодания

В совместной работе института исследований туберкулеза и Университета штата Иллинойс в Чикаго (США) S.H. Cho и соавт. [16] разработали модель для скрининга антибактериальных препаратов против покоящихся форм туберкулеза Low-Oxygen-Recovery Assay (LORA). Клетки штамма *M. tuberculosis* H37Rv (pFCAluxAB), предварительно сконструированного, несущего репортерную плазмиду с экспрессирующимся геном *luxAB* *Vibrio harveyi*, выращивали в течение 22 дней в питательной среде Dubos в ферментере анаэробно, аналогично модели Wayne L.G. & Hayes L.G. получения покоящихся форм микобактерий. В ходе культивирования проводили измерение сигнала люминесценции клеток в условиях кислородного голодания. Показано, что интенсивность сигнала люминесценции была пропорциональна количеству КОЕ туберкулезного микроба. На данной модели протестированы 31 антибактериальный препарат.

## 11. Модель множественного стресса

C. Deb и соавт. [19] культивировали клетки штамма *M. tuberculosis* H37Rv на базе лабораторий Университета Центральной Флориды (США) в условиях влияния четырех стрессовых факторов: кислородное голодание (5 %), повышенное содержание CO<sub>2</sub> (10 %), голодание (10-кратно разведенная среда Dubos)

и кислотность среды (pH=5,0). В результате микобактерии прекратили реплицироваться, потеряли кислотоустойчивость, накопили триацилглицерин и восковые эфиры, приобрели антибиотикоустойчивость к рифампицину и изониазиду, увеличили синтез липидов, образовывали овоидные формы, то есть приобрели все признаки покоящихся микобактериальных клеток.

## 12. Культивирование в условиях недостатка калия

Сотрудники Института биохимии им. А.Н. Баха РАН E.G. Salina и соавт. [33-35] выращивали клетки штамма *M. tuberculosis* H37Rv на модифицированной питательной среде Sauton, не содержащей калия, в течение 15 дней, после чего добавляли в среду 5 мг/л рифампицина для удаления активно делящихся клеток. Полученные покоящиеся клетки *M. tuberculosis* были неспособны к росту на твердых питательных средах. Реактивацию осуществляли с помощью отмывки клеток от бескальевой среды и культивирования в питательной среде Sauton.

## 13. Модель стрептомицин-ауксотрофного штамма

В лабораториях Глобального института здравоохранения (Швейцария) и Национальных институтов здоровья (США) C. Sala и соавт. [36] использовали стрептомицин-ауксотрофный штамм *M. tuberculosis* 18b для получения покоящихся форм микобактерий и тестирования на них лекарственных средств. Клетки штамма *M. tuberculosis* 18b культивировали с аэрацией при температуре 37 °C на питательной среде 7H9 Middlebrook в присутствии стрептомицина 50 мкг/мл до средней логарифмической фазы, после чего клетки отмывали фосфатным буфером и помещали в питательную среду без стрептомицина, инкубировали при температуре 37 °C с аэрацией в течение 10 дней. После культивирования клеток *M. tuberculosis* 18b в питательной среде без стрептомицина полученные клетки не росли на плотных питательных средах и были устойчивы к антимикубактериальным препаратам. Реактивацию покоящихся форм микобактерий проводили с помощью добавления в питательную среду стрептомицина.

## 14. Выращивание в условиях постепенного закисления среды

При сотрудничестве лабораторий Института биохимии им. А.Н. Баха, Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина (Пушино) и Института микробиологии им. С.Н. Виноградского (Москва) M.O. Shleeva и соавт. [21] разработана модель, основанная на выращивании клеток *M. tuberculosis* H37Rv в питательной среде Sauton в течение 12-15 дней. Полученные клетки пересевали в модифицированную питательную среду Sauton (pH=6,0-6,2) и инкубировали аэробно при температуре 37 °C. После 37-45 дней инкубации клетки переносили в анаэробные стационарные условия при комнатной температуре на 135-143 дней. Препараты покоящихся клеток получали фильтрованием через фильтр с порами 0,22 мкм. Изучена форма полученных покоящихся клеток (овоидные бактерии), которые были устойчивы к повреждающим факторам (прогревание и антибиотики) и утратили способность формировать колонии на твердых питательных средах, но реактивировались при инкубировании в супернатанте активно растущей культуры *M. tuberculosis* или при добавлении рекомбинантного белка Rpf.

## 15. Модель гранулемы человека *in vitro*

В Университете Центральной Флориды (США) N. Karoog и соавт. [37] использовали для культивирования клеток штамма *M. tuberculosis* H37Rv мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC), которые смешивали в лунках 96-луночного планшета при комнатной температуре

с препаратом внеклеточного матрикса (ЕСМ) и клетками микобактерий, инкубировали 45 мин при температуре 37 °С. Затем в суспензию добавляли питательную среду RPMI с 20 % человеческой сывороткой и инкубировали 8 суток при температуре 37 °С. Было показано, что инфицированные микобактериями клетки РВМС образовывали микрогранулы. При этом клетки *M. tuberculosis* переходили в состояние покоя, что подтверждено потерей ими кислотоустойчивости при окрашивании, накоплением липидных тел, развитием устойчивости к рифампицину и изменением экспрессии генов. Обработка гранул моноклональными антителами анти-TNF $\alpha$  вызвала реактивацию покоящихся клеток *M. tuberculosis*.

## 16. Модификация модели Wayne L.G. & Hayes L.G. в среде, богатой липидами

В работах сотрудников Национального политехнического института, Национального института вирусологии и Национального института перинатологии Исидро Эспиноса де лос Рейес, Мехико (Мексика) M.D. Sotomayor и соавт., D.A. Aguilar-Ayala и соавт. [38,39] описано культивирование клеток штамма *M. tuberculosis* H37Rv в питательной среде Dubos без глицерина, содержащей 0,5 % альбумина, липидную смесь (олеиновая, пальмитиновая и стеариновая кислоты в концентрации 0,001 % каждая) и 0,01 % холестерина при температуре 37 °С в пробирках, позволяющих контролировать доступ кислорода. По достижении экспериментальных стадий гипоксии NRP1 и NRP2, описанных в модели Wayne L.G. & Hayes L.G., что детектировали в присутствии метиленового синего 1.5 мг/мл, в культуру вносили смесь антибиотиков рифампицин/моксифлоксацин/амикацин/метронидазол или рифампицин/моксифлоксацин/амикацин/претоманид для определения чувствительности полученных клеток к антимикобактериальным препаратам. Реактивацию микобактерий проводили, переводя культуру в аэробные условия. В данной модели микобактерии подвергались одновременно двум стрессам - кислородному голоданию и воздействию токсических продуктов метаболизма холестерина (пропионил-СоА), что моделировало условия существования микобактерий в макрофагах, содержащих большое количество липоидных тел с холестерином. Модель использована для изучения уровня экспрессии генов *dosR*, *tgsl*, *lipY*, *fadD21*, *mmpL7*, *esxA* и др., которые связаны с проявлением дормантности и вирулентности клеток *M. tuberculosis*.

## In vivo модели для изучения латентной туберкулезной инфекции

Моделирование ЛТБИ человека *in vivo* на животных, в отличие от моделей покоящегося состояния *M. tuberculosis in vitro*, позволяет рассматривать вопросы разных стадий патогенеза на фоне развития иммунной защиты хозяина, что имеет решающее значение для формирования латентной формы инфекции. К настоящему времени созданы *in vivo*-модели ЛТБИ на представителях 5 таксономических групп теплокровных животных: мышах, крысах, кроликах, морских свинках и приматах (см. рисунок).

Наиболее адекватными животными моделями ЛТБИ человека являются модели латентного туберкулеза на приматах (макаках) *Macaca fascicularis* и *Macaca mulatta*, так как эти животные имеют большое анатомическое и физиологическое сходство с человеком [23]. Недостатком моделей ЛТБИ на приматах является высокая стоимость животных и их содержания.

Мышиные (*Muridae Mus*) модели являются наиболее используемыми и подробно охарактеризованными, успешно используются для изучения патогенеза туберкулеза. Использование мышиных моделей обусловлено их удобством,

возможностью проведения масштабных экспериментов, доступностью различных линий мышей недорогого содержания. Однако, туберкулезная инфекция у мышей отличается от человеческой болезни отсутствием казеозного некроза гранул [24, 25].

Более адекватной моделью для изучения ЛТБИ, по сравнению с мышинной моделью, является модель на кроликах. Развитие туберкулеза у людей и у кроликов имеет много общего, в том числе - формирование центра казеозного некроза в легких в ответ на микобактериальную инфекцию. Кролики природно-устойчивы к инфицированию *M. tuberculosis*, что обеспечивает в эксперименте формирование латентной инфекции у этих животных.

Недавно предложено использование нового вида животных для моделирования ЛТБИ - хлопковые крысы *Sigmodon hispidus*. По сравнению с крупными животными хлопковые крысы дешевле, их легко содержать в больших группах, подробно изучены особенности их иммунной системы, что позволяет анализировать иммунный ответ организма в ходе ЛТБИ. По сравнению с другими моделями на грызунах у хлопковых крыс после легочного заражения туберкулезом развиваются гранулы с дальнейшим развитием казеозного некроза и происходит распространение патогена в лимфоидные органы, как у человека.

На модели морских свинок *Cavia porcellus* сложно получить ЛТБИ, потому что эти животные высокочувствительны к низкодозовому заражению *M. tuberculosis*. Для моделирования ЛТБИ на морских свинках предложено использовать заражение мутантными штаммами *M. tuberculosis* со сниженной вирулентностью [26, 24]. По сравнению с мышинными моделями, в организме морских свинок при заражении туберкулезом формируются гранулы, более схожие с таковыми у человека по клеточному составу гранулы и наличию казеозного некроза.

В настоящем обзоре рассмотрены модели ЛТБИ *in vivo*, разработанные к настоящему времени: принцип, на котором основана конкретная модель, и подтверждение развития у животных ЛТБИ.

## 1. Мышиная модель Корнеллского университета

В работах сотрудников Корнеллского университета, Нью-Йорк (США) R.M. McCune, R. Tompsett и соавт. [40-42] впервые были описаны эксперименты по моделированию ЛТБИ у мышей. Авторами были использованы белые мыши линии Swiss Webster, которых заражали внутривенно клетками *M. tuberculosis* H37Rv в дозе 0,5-2 $\times$ 10<sup>6</sup> КОЕ, а полученную туберкулезную инфекцию лечили в течение 12 нед антимикобактериальными препаратами изониазидом и пиразинамидом. После 12-недельной химиотерапии из органов мышей микобактерии высеять не удалось. По завершении антибиотикотерапии в течение 2-3 мес мышам вводили кортизон, после чего из легких и селезенки 50 % мышей авторам удалось высеять клетки *M. tuberculosis*. На этом основании был сделан вывод о том, что после антибиотикотерапии у мышей сформировалась ЛТБИ, а в результате введения кортизона произошла реактивация туберкулезной инфекции.

## 2. Модель медленно прогрессирующей первичной туберкулезной инфекции у мышей

Сотрудниками университета Осло (Норвегия) (Phyu et al. и Mustafa et al.) [25,43] опубликованы результаты разработки модели медленно прогрессирующей первичной ТБИ на гибридных мышах линии B6D2F1. Возбудитель туберкулеза *M. tuberculosis* H37Rv в дозе 1,5 $\times$ 10<sup>6</sup> КОЕ вводили мышам внутривенно, наблюдали за животными в течение 70 недель. При этом не осуществляли никакой лекарственной терапии. В результате у мышей формировалась ЛТБИ, что подтверждали

с помощью активации туберкулезного процесса с помощью подавления иммунной системы мышей кортикостероном. Кроме того, ЛТБИ у мышей подтверждали микробиологическими, гистопатологическими и иммуногистохимическими исследованиями. Спонтанной реактивации туберкулезной инфекции у мышей не наблюдалось в течение 70 недель.

### 3. Модель ЛТБИ у Яванских макак *Macaca fascicularis*

В университете Питсбурга, штат Пенсильвания (США) S.V.Сариано и соавт., P.L.Lin и соавт. [44,45] разработана модель ЛТБИ на приматах - Яванских макаках *Macaca fascicularis*. Животных (17 особей) заражали низкими дозами (~25 КОЕ) вирулентного штамма *M. tuberculosis* Erdman через бронхоскопическую инстилляцию в легкие. Туберкулезная инфекция, вызванная у *Macaca fascicularis* низкими дозами бактерий этого штамма, по мнению авторов, полностью моделировала туберкулезную инфекцию у человека. У 40 % зараженных обезьян инфекция не прогрессировала в течение 15-20 мес, при этом симптомы туберкулезной инфекции полностью отсутствовали. Наличие ЛТБИ у этих особей было диагностировано с помощью кожного туберкулинового теста и методом оценки пролиферации лимфоцитов, а также наличием небольшого количества фиброзных гранулем в легких.

### 4. Модель туберкулезной инфекции у мышей с имплантантом, содержащим культуру микобактерий

В лаборатории Университета Джонса Хопкинса, Балтимор, США, авторами P.C. Karakousis и соавт. [7] создана модель туберкулезной инфекции у иммунокомпетентных мышей безволосой линии (нуды) SKH1. Моделирование осуществляли путем подкожного введения имплантата, содержащего клетки штамма *M. tuberculosis* H37Rv-*lux*, экспрессирующие ген люциферазы. Вокруг имплантата развивались гранулематозные поражения тканей, содержащие клетки *M. tuberculosis*, быстро входящие в измененное физиологическое состояние, характеризуемое количеством КОЕ стационарного состояния, снижением метаболической активности микобактерий и устойчивостью к изониазиду. Получены данные полногеномного транскриптомного анализа клеток *M. tuberculosis*, находящихся в гранулемах мыши.

### 5. Низко-дозовая модель

При сотрудничестве Центрального НИИ туберкулеза и фармацевтической компании Sequella, Inc., США [46] опубликованы результаты моделирования латентной туберкулезной инфекции при помощи внутривенного введения клеток *M. tuberculosis* H37Rv, выращенных до средней логарифмической фазы и дезагрегированных (в дозе ~70 КОЕ), мышам трех линий: высокочувствительной к туберкулезу линии I/StSnEgYCit (I/St), генетически устойчивой к туберкулезу линии C57BL6/JCit (B6) и (I/St×B6)F1 гибридов, которые были более резистентны к туберкулезу, чем родительские линии. Внутривенное введение низких доз туберкулезного микроба приводило к хронической нелетальной персистенции микобактерий у генетически резистентных мышей, но вызывало смертельный патологический процесс у генетически чувствительных животных. Различия между инфекционным процессом в организмах мышей разных линий подтверждены на гистологическом и иммунологическом уровнях.

### 6. Модель латентного туберкулеза у мышей линии BALB/c

Ученые из Института Форсайт, Бостон, и Университета Колорадо, США [26] заражали мышей линии BALB/c вну-

тривенно в дозе ( $2 \times 10^6$  КОЕ) стрептомицин-ауксотрофным штаммом *M. tuberculosis* 18b с последующим ежедневным подкожным введением мышам стрептомицина в течение четырех недель. У животных определяли микобактериальную нагрузку в легких и селезенке на 7, 14, 21, 28 и 180 день после заражения. Спустя 6 мес после завершения введения стрептомицина из органов животных были высеяны жизнеспособные клетки *M. tuberculosis* 18b на искусственную среду со стрептомицином. Гистологические исследования печени, легких и селезенки показали наличие хорошо сформированных гранулем. Иммуногистохимические исследования выявили наличие иммунного ответа во время латентной инфекции у животных.

### 7. Модель хронического туберкулеза на мышцах линии C57BL

В Государственном научном центре прикладной микробиологии и биотехнологии при сотрудничестве с Институтом биохимии им А.Н. Баха [47 – 49] моделировали формирование хронического туберкулеза в результате внутрибрюшинного заражения мышей линии C57BL клетками *M. tuberculosis* штамма H37Rv в дозе  $\sim 10^4$  КОЕ/мышь. Реактивацию ЛТБИ проводили с помощью аминоканидина. Установлена точка стабилизации концентрации микроорганизмов в органах (через 3 мес  $10^3$ - $10^4$  КОЕ на орган). Уровень числа КОЕ в легких и селезенке устойчиво сохранялся в течение последующего года наблюдений.

### 8. Аэрозольная модель формирования латентного туберкулеза у кроликов

Лаборатория Университета Джонса Хопкинса, Корнеллского университета, Университета Джорджа Вашингтона, Центра здоровья Техаса, и Колледж медицины Эйнштейна, США [50] создали ЛТБИ модель на белых новозеландских кроликах, заражая их аэрозольно клетками *M. tuberculosis* H37Rv в низкой дозе  $10^3$  КОЕ. Реактивацию ТБИ осуществляли внутримышечным введением дексаметазона в период с 10 по 15 неделю после заражения кроликов. Через 5 нед после заражения у части кроликов зафиксировано формирование небольшого количества легочных гранулем, при этом в последующие 36 нед бактериальная нагрузка и размер гранулем не изменялись. Содержащиеся внутри гранулем микобактерии находились в покоящемся состоянии, что подтверждено: нераспространением их за пределы гранулем, некультивируемостью на питательном агаре и отсутствием заражающей способности гомогената легких кроликов в тесте на морских свинках и отсутствием случаев спонтанной реактивации инфекции у кроликов.

### 9. Модель латентного туберкулеза у беспородных морских свинок Хартли

В совместной публикации сотрудников Института Форсайт и Университета Колорадо, США [51] описана модель ЛТБИ на морских свинках. Животных заражали внутривенно клетками стрептомицин-ауксотрофного штамма *M. tuberculosis* 18b в дозе  $10^7$  КОЕ, с последующим ежедневным подкожным введением стрептомицина в течение трех недель. В течение 6 мес после заражения и лечения стрептомицином у животных не наблюдали клинических симптомов туберкулезной инфекции (летаргия, потертый мех и потеря веса). У свинок определяли микобактериальную нагрузку в легких и селезенке на 1, 15, 30, 90 и 180 день после заражения. Спустя 6 мес после завершения введения стрептомицина из органов животных были высеяны жизнеспособные клетки *M. tuberculosis* 18b на искусственную среду со стрептомицином. Гистологические исследования печени, легких и селезенки показали наличие хорошо сформированных гранулем. Иммуногистохимические исследования выявили наличие иммунного ответа во время латентной инфекции у морских свинок.

## 10. Корнелл-подобная модель

Коллективом сотрудников Центрального НИИ туберкулеза [52] предложено использовать мышей линии I/StSnEgYCit (I/St), высокочувствительной к туберкулезу, которые были инфицированы аэрозольно клетками *M. tuberculosis* H37Rv, выращенными до средней логарифмической фазы и дезагрегированными, в дозе ~100 КОЕ/мышь. Через 1 мес после заражения мышей подвергали трехмесячной антибиотикотерапии рифампицином и изониазидом. После трехмесячного лечения у мышей в легких были обнаружены обширные зоны поражения тканей. Через 13 мес после начала эксперимента у части мышей легочная ткань не отличалась от нормы, а у другой части – в легких наблюдалась остаточная патология, при этом микобактерии не высевались на питательные среды, но их присутствие обнаруживалось с помощью методов ПЦР и микроскопии.

## 11. Модель ЛТБИ на хлопковых крысах *Sigmodon hispidus*

При сотрудничестве Военно-медицинского университета и фармацевтических компаний Sequella и Virion Systems (США) Elwood и соавт. [53] опубликована работа, в которой инбредных хлопковых крыс *S. hispidus* заражали интраназально клетками *M. tuberculosis* H37Rv в дозе  $3,9 \times 10^3$  КОЕ. У части выживших животных не было признаков туберкулезной инфекции (потеря веса, образование гранулем, наличие культивируемых бацилл в легких и селезенке). На 9-м месяце после заражения проводили иммуносупрессию животных циклофосфамидом в дозе 50 мг/кг в течение 4 недель. У всех животных после курса иммунодепрессанта зафиксирована активная форма туберкулезной инфекции.

## 12. Модель латентного туберкулеза у беспородных морских свинок линии Хартли

В НИИ туберкулеза (Токио, Япония) [24] разработана модель ЛТБИ на морских свинках, которые были инфицированы подкожно 100 КОЕ штамма *M. tuberculosis* H37Rv-GFP с экспрессией зеленого флуоресцентного белка (GFP). В течение последующих 10 мес проводили туберкулиновый кожный тест для проверки статуса инфекции. Через 10 мес у животных, инфицированных *M. tuberculosis* H37Rv-GFP, не было выявлено макроскопических повреждений легких, но обнаруживались микрогранулемы в легких, печени и селезенке. На 180 и 300 день после инфицирования животных уровень бактериальной нагрузки в легких составлял 121 и 360 КОЕ, соответственно, а в селезенке – 10 и 25 КОЕ, соответственно, что, по мнению авторов, указывало на наличие хронической туберкулезной инфекции.

## 13. Модель ЛТБИ у низших приматов макак-резус *Macaca mulatta*

В работе сотрудников Национального исследовательского центра приматов Тулана (США) [54] описана *in vivo* модель ЛТБИ на низших приматах. Макак-резус *Macaca mulatta* (12 особей), заражали дозами (~500 КОЕ) слабовирулентного штамма *M. tuberculosis* CDC1551 аэрозольным путем. ЛТБИ определяли по отсутствию симптомов туберкулеза у макак (повышение температуры тела, потеря веса, отклонения в биохимии и общем анализе крови) и наличию положительной реакции в туберкулиновом кожном тесте и в тесте IGRA. Шесть животных с ЛТБИ спустя 9 нед после заражения туберкулезом инфицировали внутривенно Симианским вирусом иммунодефицита. Все 12 макак-резусов к 7 нед после заражения микобактериями имели положительную реакцию в туберкулиновом кожном тесте и в тесте IGRA. В группе, зараженной Симианским вирусом иммунодефицита, после 9 нед ко-инфекции, у

животных наблюдали признаки реактивации туберкулеза (увеличение температуры, снижение веса тела, потерю аппетита, увеличение уровня сывороточного С-реактивного белка, гранулематозную иммунопатологию, выявляемую при рентгенографии грудной клетки, а также гистопатологию при вскрытии и высеив микобактерий из бронхоальвеолярного лаважа).

## 14. Реактивация «некультивируемых» клеток *M. tuberculosis*, полученных *in vitro*, в организме мыши

В совместной работе лабораторий Института биохимии им. А.Н. Баха РАН и Центрального НИИ туберкулеза [55] изучали покоящиеся «некультивируемые» клетки *M. tuberculosis* H37Rv, полученные по методике, описанной выше [21], которые вводили в дозе ~ $10^5$  КОЕ в трахею мышей линий I/St и B6, описанных Radaeva et al. [46]. Динамику развития туберкулезной инфекции отслеживали в течение последующих 1,5 лет. На 6-м месяце после заражения у нескольких мышей линии I/St, генетически чувствительной к туберкулезу, были зафиксированы симптомы туберкулезной инфекции (потертый мех и потеря веса). На 8 месяце после заражения количество микобактерий в легких животных увеличилось: у животных линии I/St - до  $10^7$ , и у животных линии B6 – до  $10^6$  КОЕ. Кроме того, было зафиксировано распространение инфекции в селезенку (I/St  $10^6$  КОЕ и B6  $10^4$  КОЕ). Микобактериальная нагрузка в органах животных оставалась практически неизменной в течение последующих 7 мес наблюдений.

**Заключение.** В ходе латентной туберкулезной инфекции (ЛТБИ) человека возбудитель туберкулеза присутствует в тканях организма и вызывает целый спектр патологических изменений, хотя не вызывает клинических проявлений заболевания. Создание моделей ЛТБИ человека *in vitro* и *in vivo* нацелено на: изучение особенностей механизмов перехода возбудителя туберкулеза в состояние покоя, поддержания этого статуса и реактивации во время скрытой инфекции; описание взаимодействия микро- и макроорганизма на клеточном и тканевом уровнях; оценку реакции макроорганизма на бессимптомную туберкулезную инфекцию; испытание новых антитуберкулезных препаратов и тест-систем.

С помощью *in vitro*-моделей, опубликованных в отечественной и зарубежной литературе, было выяснено, что длительное культивирование клеток *M. tuberculosis* в стрессовых условиях, симулирующих внутриклеточную среду в макрофагах, приводит к формированию покоящихся форм микобактерий, которые не способны расти на плотных питательных средах, устойчивы к антибактериальным препаратам, имеют специфическую морфологию, сниженный метаболизм и специфичный для этого состояния транскриптом и протеом. Основной проблемой для всех моделей «покоя» *in vitro* является наличие клеток с различным физиологическим статусом в популяции [27]. Благодаря изучению *in vivo*-моделей, созданных на теплокровных животных, раскрыты особенности взаимодействия микобактерий и макроорганизма на клеточном, тканевом и организменном уровнях.

Все эти модели имеют присущие им достоинства и недостатки: ни одна из моделей не отражает полностью картину ЛТБИ у человека, однако использование каждой модели приближает нас к пониманию отдельных этапов и механизмов, имеющих место во время бессимптомной туберкулезной инфекции, позволяет более подробно разработать принципы создания новых тест-систем и испытать новые профилактические и лечебные препараты [28]. Подтверждением адекватности использования двух типов моделей является то, что данные транскриптомного и протеомного анализов *M. tuberculosis* в *in vitro*- и *in vivo*-моделях в значительной степени сходны.

Несмотря на то что к настоящему времени разработано достаточно большое количество моделей *in vitro* и *in vivo* для изучения ЛТБИ, поиск новых моделей продолжается с целью приближения к идеальной модели для выяснения неразрешенных вопросов в области диагностики, лечения и профилактики латентного туберкулеза.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной темы НИР Роспотребнадзора.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–47, 50–55 см. REFERENCES)

48. Шрамко П.А., Грищенко Н.С., Рудницкая Т.И., Потапов В.Д., Капрелянц А.С., Бикетов С.Ф. Моделирование хронической туберкулезной инфекции у мышей методом внутрибрюшинного заражения и анализ активации аминогликозидом мутантов штамма *Mycobacterium tuberculosis* H37RV с делециями по генам *grf*. *Туберкулез и болезни легких*. 2010; 4: 47-50.
49. Потапов В.Д. Разработка и применение биологических моделей для изучения хронической туберкулезной инфекции. Оболенск: ФБУН ГНЦ ПМБ; 2013.

#### REFERENCES

1. Global tuberculosis report 2017. Geneva: World Health Organization; 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. ISBN 978-92-4-156551-6. URL: [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/)
2. Zwerling A., Pai M. The BCG World Atlas: a database of global BCG vaccination policies and practices. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 2011; 9(8): 559-61.
3. Rangaka M.X., Wilkinson K.A., Glynn J.R., Ling D., Menzies D., Mwansa-Kambafwile J., Fielding K., Wilkinson R.J., Pai M. Predictive value of interferon- $\gamma$  release assays for incident active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2012; 12(1): 45-55.
4. Flynn J.L., Chan J. Tuberculosis: latency and reactivation. *Infect. Immun.* 2001; 69: 4195-4201.
5. Kaplan G., Post F.A., Moreira A.L., Wainwright H., Kreiswirth B.N., Tanverdi M., Mathema B., Ramaswamy S.V., Walther G., Steyn L.M., Barry C. E., Bekker L. G. *Mycobacterium tuberculosis* growth at the cavity surface: a microenvironment with failed immunity. *Infect. Immun.* 2003; 71: 7099-7108.
6. Grosset J. *Mycobacterium tuberculosis* in the extracellular compartment: an underestimated adversary. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47: 833-6.
7. Karakousis P.C., Yoshimatsu T., Lamichhane G., Woolwine S.C., Nuermberger E.L., Grosset J., Bishai W.R. Dormancy phenotype displayed by extracellular *Mycobacterium tuberculosis* within artificial granulomas in mice. *J. Exp. Med.* 2004; 200(5): 647-57.
8. Wayne L.G., Srobaskey C.D. Nonreplicating persistence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Annu. Rev. Microbiol.* 2001; 55: 139-63.
9. Wayne L.G., Sramek H.A. Metronidazole is bactericidal to dormant cells of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994; 38: 2054-8.
10. Murugasu-Oei B., Dick T. J. Bactericidal activity of nitrofurans against growing and dormant *Mycobacterium bovis* BCG. *Antimicrob. Chemother.* 2000; 46: 917-9.
11. Mayuri, Bagchi G., Das T.K., Tyagi J.S. Molecular analysis of the dormancy response in *Mycobacterium smegmatis*: expression analysis of genes encoding the DevR/DevS two-component system, Rv3134c and chaperone alpha-crystallin homologues. *FEMS Microbiol. Lett.* 2002; 211: 231-7.
12. Ignatov D.V., Salina E.G., Fursov M.V., Skvortsov T.A., Azhikina T.L., Kaprelyants A.S. Dormant non-culturable *Mycobacterium tuberculosis* retains stable low-abundant mRNA. *BMC Genomics.* 2015; 16: 954.
13. Zhang Y. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Front. Biosci.* 2004; 1(9): 1136-56.
14. Wayne L.G., Hayes L.G. An *in vitro* model for sequential study of shutdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence. *Infect. Immun.* 1996; 6: 2062-9.
15. Hu Y., Mangan J.A., Dhillon J., Sole K.M., Mitchison D.A., Butcher P.D., Coates A.R. Detection of mRNA transcripts and active transcription in persistent *Mycobacterium tuberculosis* induced by exposure to rifampin or pyrazinamide. *J. Bacteriol.* 2000; 182: 6358-65.
16. Cho S.H., Warit S., Wan B., Hwang C.H., Pauli G.F., Franzblau S.G. Low-oxygen-recovery assay for high-throughput screening of compounds against nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007; 51: 1380-5.
17. 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. *Mol. Microbiol.* 2002; 3: 717-31.
18. James B.W., Bacon J., Hampshire T., Morley K., Marsh P.D. *In vitro* gene expression dissected: chemostat surgery for *Mycobacterium tuberculosis*. *Comp. Funct. Genomics.* 2002; 3: 345-7.
19. Deb C., Lee C. M., Dubey V., Daniel J., Abomoelak B., Sirakova T., 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; 4: e6077.
20. 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. Exp. Med.* 2003; 198: 705-13.
21. 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 (Edinb.)*. 2011; 91(2): 146-54.
22. Alnimr A.M. Dormancy models for *Mycobacterium tuberculosis*: A minireview. *Braz. J. Microbiol.* 2015; 46(3): 641-7.
23. Carlsson H.E., Schapiro S.J., Farah I., Hau J. Use of primates in research: a global overview. *Am. J. Primatol.* 2004; 63: 225-37.
24. Sugawara I., Udagawa T., Aoki T., Mizuno S. Establishment of a guinea pig model of latent tuberculosis with GFP-introduced *Mycobacterium tuberculosis*. *Tohoku. J. Exp. Med.* 2009; 3: 257-62.
25. Phyu S., Mustafa T., Hofstad T., Nilsen R., Fosse R., Bjune G. A mouse model for latent tuberculosis. *Scand. J. Infect. Dis.* 1998; 1(30): 59-68.
26. Kashino S.S., Ovendale P., Izzo A., Campos-Neto A. Unique model of dormant infection for tuberculosis vaccine development. *Clin. Vaccine Immunol.* 2006; 9: 1014-21.
27. Young M., Mukamolova G.V., Kaprelyants A.S. Mycobacterial dormancy and its relation to persistence. In: *Mycobacterium: molecular microbiology*. Ed. Parish T. London, United Kingdom: Horizon Bioscience; 2005; 265-320.
28. Lanoix J.P., Betoudji F., Nuermberger E. Novel regimens identified in mice for treatment of latent tuberculosis infection in contacts of patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014; 58(4): 2316-21.
29. Corper H.J., Cohn M.L. The virulence of tubercle bacilli and the fallacy of assuming the grade of virulence from arbitrary designations. *Am. Rev. Tuberc.* 1933; 28: 856-74.
30. Biketov S., Mukamolova G.V., Potapov V., Gilenkov E., Vostroknutova G., Kell D.B., Young M., Kaprelyants A.S. Culturability of *Mycobacterium tuberculosis* cells isolated from murine macrophages: a bacterial growth factor promotes recovery. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2000; 29(4): 233-40.
31. Shleeva M.O., Bagramyan K., Telkov M.V., Mukamolova G.V., Young M., Kell D.B., Kaprelyants A.S. Formation and resuscitation of "non-culturable" cells of *Rhodococcus rhodochrous* and *Mycobacterium tuberculosis* in prolonged stationary phase. *Microbiology.* 2002; 148(5): 1581-91.
32. Gordillo S., Guirado E., Gil O., Díaz J., Amat I., Molinos S., Vilaplana C., Ausina V., Cardona P.J. Usefulness of *acr* expression for monitoring latent *Mycobacterium tuberculosis* bacilli in 'in vitro' and 'in vivo' experimental models. *Scand. J. Immunol.* 2006; 64(1): 30-9.
33. Salina E.G., Mollenkopf H.J., Kaufmann S.H., Kaprelyants A.S. *M. tuberculosis* Gene Expression during Transition to the "Non-Culturable" State. *Acta Naturae.* 2009; 1(2): 73-7.
34. Salina E., Ryabova O., Kaprelyants A., Makarov V. New 2-thiopyridines as potential candidates for killing both actively growing and dormant *Mycobacterium tuberculosis* cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014a; 58(1): 55-60.
35. 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 Biol.* 2014b; 4(10) pii 140106.
36. Sala C., Dhar N., Hartkoorn R.C., Zhang M., Ha Y.H., Schneider P., Schneider P., Cole S.T. Simple model for testing drugs against nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54(10): 4150-8.
37. Kapoor N., Pawar S., Sirakova T.D., Deb C., Warren W.L., Kolattukudy P.E. Human granuloma *in vitro* model, for TB dormancy and resuscitation. *PLoS One.* 2013; 8(1): e53657.
38. Soto-Ramirez M.D., Aguilar-Ayala D.A., Garcia-Morales L., Rodriguez-Peredo S.M., Badillo-Lopez C., Rios-Muñiz D.E., Meza-Segura M.A., Rivera-Morales G.Y., Leon-Solis L., Cerna-Cortes J.F.,



- Rivera-Gutierrez S., Helguera-Repetto A.C., Gonzalez-Y-Merchand J.A. Cholesterol plays a larger role during *Mycobacterium tuberculosis* in vitro dormancy and reactivation than previously suspected. *Tuberculosis* (Edinb.). 2017; 103: 1-9.
39. Aguilar-Ayala D.A., Cnockaert M., Vandamme P., Palomino J.C., Martin A., Gonzalez-Y-Merchand J. Antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* under in vitro lipid-rich dormancy conditions. *J. Med. Microbiol.* 2018; 67(3): 282-285.
40. McCune R. M., Tompsett R. Fate of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse tissues as determined by the microbial enumeration technique. I. The persistence of drug susceptible tubercle bacilli in the tissues despite prolonged antimicrobial therapy. *J. Exp. Med.* 1956a; 104: 737.
41. McCune R.M., Tompsett R., McDermott W. Fate of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse tissues as determined by the microbial enumeration technique. II. The conversion of tuberculosis infection to the latent state by the administration of pyrazinamide and a companion drug. *J. Exp. Med.* 1956b; 104: 763.
42. McCune R.M., Feldmann F.M., Lambert H.P., McDermott W. Microbial persistence. The capacity of tubercle bacilli to survive sterilization in mouse tissues. *J. Exp. Med.* 1966; 123: 445-68.
43. Mustafa T., Phyu S., Nilsen R., Jonsson R., Bjune G. In situ expression of cytokines and cellular phenotypes in the lungs of mice with slowly progressive primary tuberculosis. *Scand. J. Immunol.* 1999; 2: 127-36.
44. Capuano S.V., Croix D.A., Pawar S., Zinovik A., Myers A., Lin P.L., Bissel S., Fuhrman C., Klein E., Flynn J.L. Experimental *Mycobacterium tuberculosis* infection of cynomolgus macaques closely resembles the various manifestations of human *M. tuberculosis* infection. *Infect. Immun.* 2003; 10: 5831-44.
45. Lin P.L., Rodgers M., Smith L., Bigbee M., Myers A., Bigbee C., Chiosea I., Capuano S.V., Fuhrman C., Klein E., Flynn J. L. Quantitative comparison of active and latent tuberculosis in the cynomolgus macaque model. *Infect. Immun.* 2009; 10: 4631-42.
46. Radaeva T.V., Nikonenko B.V., Mischenko V.V., Averbakh M.M. Direct comparison of low-dose and Cornell-like models of chronic and reactivation tuberculosis in genetically susceptible I/St and resistant B6 mice. Jr, Apt A.S. *Tuberculosis* (Edinb.). 2005; 1-2: 65-72.
47. Biketov S., Potapov V., Ganina E., Downing K., Kana B.D., Kaprelyants A. The role of resuscitation promoting factors in pathogenesis and reactivation of *Mycobacterium tuberculosis* during intra-peritoneal infection in mice. *BMC Infect. Dis.* 2007; 7: 146.
48. Shramko P.A., Grishenko N.S., Rudnitskaya T.I., Potapov V.D., Kaprelyants A.S., Biketov S.F. Modelling of chronic tuberculosis infection in mice by intraperitoneal infection and analysis of aminoguanidin activation in mutants of the *Mycobacterium tuberculosis* strain H37RV with *rpf* gene deletions. *Tuberkulez i bolezni legkikh*, 2010; 4: 47-50. (in Russian)
49. Potapov V.D. Development and application of biological models to study chronic tuberculosis infection. Obolensk: SRCAMB; 2013. (in Russian)
50. Manabe Y.C., Kesavan A.K., Lopez-Molina J., Hatem C.L., Brooks M., Fujiwara R., Hochstein K., Pitt M.L., Tufariello J., Chan J., McMurray D. N., Bishai W. R., Dannenberg A. M. Jr, Mendez S. The aerosol rabbit model of TB latency, reactivation and immune reconstitution inflammatory syndrome. *Tuberculosis* (Edinb.). 2008; 3: 187-96.
51. Kashino S.S., Napolitano D.R., Skobe Z., Campos-Neto A. Guinea pig model of *Mycobacterium tuberculosis* latent/dormant infection. *Microbes Infect.* 2008; 10(14-15): 1469-76.
52. Radaeva T.V., Kondratieva E.V., Sosunov V.V., Majorov K.B., Apt A. A human-like TB in genetically susceptible mice followed by the true dormancy in a Cornell-like model. *Tuberculosis* (Edinb.). 2008; 88: 576-85.
53. Elwood R.L., Rajnik M., Wilson S., Yim K., Blanco J.C., Nikonenko B., Hemming V.G. Characterization of late tuberculosis infection in *Sigmodon hispidus*. *Tuberculosis* (Edinb.). 2009; 89(2): 183-8.
54. Mehra S., Golden N.A., Dutta N.K., Midkiff C.C., Alvarez X., Doyle L.A., Asher M., Russell-Lodrigue K., Monjure C., Roy C.J., Blanchard J.L., Didier P.J., Veazey R.S., Lackner A.A., Kaushal D. Reactivation of latent tuberculosis in rhesus macaques by coinfection with simian immunodeficiency virus. *J. Med. Primatol.* 2011; 40(4): 233-43.
55. Shleeva M., Kondratieva T., Rubakova E., Vostroknutova G., Kaprelyants A., Apt A. Reactivation of dormant "non-culturable" *Mycobacterium tuberculosis* developed in vitro after injection in mice: both the dormancy depth and host genetics influence the outcome. *Microb. Pathog.* 2015; 78: 63-6.

Поступила 14.03.19

Принята к печати 20.03.19