

УДК 579.873.21.083.182:574.22

ВЫЯВЛЕНИЕ “НЕКУЛЬТИВИРУЕМЫХ” КЛЕТОК *Mycobacterium tuberculosis* КУЛЬТУРАЛЬНЫМИ МЕТОДАМИ

© 2023 г. Г. Р. Демина¹, *, М. О. Шлеева¹, Д. И. Багаева¹,
Г. Н. Вострокнутова¹, А. С. Капрельянц¹

¹ Институт биохимии им. А. Н. Баха, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: Galyademina@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.07.2022 г.

После доработки 18.08.2022 г.

Принята к публикации 10.09.2022 г.

Выявлены особенности реактивации “некультивируемых” клеток (НК) *Mycobacterium tuberculosis* (МТБ) для последующего размножения в жидкой среде, а также предложен подход количественной детекции таких клеток культуральными методами. После инокулирования, полученных *in vitro* НК МТБ в стандартную жидкую среду Сотона, наблюдалась продолжительная (до 20 сут) лаг-фаза, при которой размножение клеток отсутствовало. В течение лаг-фазы клетки секретируют вещества неустановленной природы, тормозящие или полностью прекращающие реактивацию и рост культур при исходных концентрациях НК выше 10^7 – 10^8 кл./мл. Введение мясопептонного бульона (3.25 г/л) в стандартную среду Сотона со сниженной в 10 раз концентрацией глицерина существенно стимулировало реактивацию и размножение НК при их инокулировании в концентрациях выше порогового значения. Такая модификация состава среды позволяла выявлять до 10^3 раз больше клеток в популяции МТБ методом наиболее вероятного числа клеток (НВЧК). Увеличение числа детектируемых НК в популяции (в среднем 2.5 порядка) достигалось также добавлением в среду для реактивации рекомбинантного белка RpfB (5 нг/мл), одного из белков семейства Rpf – факторов реактивации покоящихся бактерий. Возможно, действие Rpf связано с продуктами его ферментативной активности, поскольку увеличение НВЧК в популяции НК наблюдалось также при добавлении продуктов гидролиза пептидогликана (ПГ) микобактерий, полученных совместным действием RpfB и эндонуклеазы RipA. Подобный эффект оказывало также добавление озвученных фрагментов пептидогликана (ФПГ) в концентрации до 1 мкг/мл. Полученные результаты могут быть использованы в качестве подходов для оптимизации состава жидких сред и условий культивирования с целью выявления возбудителя туберкулеза в состоянии “некультивируемости” в клинических образцах.

Ключевые слова: *M. tuberculosis*, “некультивируемые” клетки, лаг-фаза, реактивация, белки Rpf, фрагменты пептидогликана

DOI: 10.31857/S0555109923020058, **EDN:** LLCNVA

В настоящее время диагностика туберкулеза (ТБ) базируется, в том числе, на микробиологическом обнаружении возбудителя с помощью культуральных методов в жидкостях пациента (в основном в мокроте для легочных форм ТБ). Общепринятый “золотой стандарт”, используемый для подтверждения наличия инфекционного агента, предусматривает отбор биопробы, ее внесение в селективную питательную среду, подрашивание клеток возбудителя до достаточно высоких концентраций и заключительную характеристику их видовой принадлежности посредством специфического окрашивания, микроскопии и др. В распространенной в клинике автоматической системе ВАСТЕС наличие МТБ в образцах оценивают по дыхательной активности бактериальных клеток после их длительного (до 20 сут) культивиро-

вания в жидкой среде [1]. Однако на практике, в таких исследованиях проблемой является получение ложноотрицательных результатов, причины которых не совсем ясны. В ряде публикаций эту проблему связывали с так называемой “некультивируемостью” микобактерий, возникающей в результате стресса, в том числе при контакте с макроорганизмом или антибиотиками. В экспериментах *in vitro* было выявлено, что такие НК нуждаются в специальной процедуре реактивации перед их размножением [2], что, вполне вероятно, является необходимой процедурой для выявления бактерий в биопробах пациентов. Наличие таких форм может требовать более длительного времени культивирования для их обнаружения, чем в существующих протоколах. О наличии НК МТБ в биообразцах свидетельствуют данные Медлар с

соавт. [3], которые сообщили, что поврежденные органы (легкие, селезенка) содержали микобактерии, которые могли быть выявлены микроскопически, но не образовывали колоний при высеве на плотные среды. Эти наблюдения подтверждены многими другими авторами [4, 5]. Бикетовым с соавт. было показано, что клетки МТБ, изолированные из культивируемых макрофагов, были неспособны к формированию колоний на агаризованной среде, но могли расти в жидкой среде после инкубации с белком Rpf [6]. Дилон с соавт. продемонстрировали, что в тканях животных с хронической формой туберкулеза лишь 1–5% изолированных микобактерий образовывали колонии на плотных средах, в то же время “оживление” этих клеток в жидкой среде приводило к увеличению численности культивируемых форм в 20–100 раз [7]. Было продемонстрировано наличие НК МТБ в мокроте пациентов [8], которые могли быть реактивированы в жидкой среде только в присутствии веществ неясной природы, содержащихся в фильтрате, полученном из культуры активных клеток МТБ [9].

Таким образом, проблема изначально “некультивируемых” или поврежденных клеток возбудителя туберкулеза, которые являются жизнеспособными и потенциально опасными, но не выявляются существующими культуральными методами, является актуальной для медицинской диагностики. В клинических образцах эти формы МТБ могут составлять значительную часть от всей популяции микобактерий [8].

Цель настоящей работы состоит в изучении особенностей реактивации клеток микобактерий и последующего их размножения на примере НК МТБ, полученных в экспериментальной модели *in vitro*, а также на поиск подходов для детекции таких клеток культуральными методами.

МЕТОДИКА

Культивирование *Mycobacterium smegmatis* mc² 155 и *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *M. smegmatis* mc² 155 выращивали на стандартной среде Сотона pH 7.0 (г/л): KH_2PO_4 – 0.5, MgSO_4 – 0.5, L-аспарагина – 4.0, глицерина – 60 мл, цитрата железа (III) аммония – 0.05, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ – 2.0, (г/л): 1% ZnSO_4 – 0.1 мл) при 37°C, в колбах с 200 мл среды при перемешивании (200 об./мин). Для предотвращения агрегации клеток в среду вносили Твин-80 (“Sigma”, США) в концентрации 0.05%.

Mycobacterium tuberculosis H37Rv (получен из Центрального научно-исследовательского института туберкулеза РАН) выращивали аналогичным образом, однако, кроме Твин-80 (0.05%) среда Сотона включала ростовую добавку ADC (смесь бычьего сывороточного альбумина, глюкозы и каталазы, “Himedia”, Индия) в соотношении 1 : 10.

В отдельных экспериментах в среду вносили определенное количество мясопептонного бульона (МПБ) (“Himedia”, Индия) и изменяли концентрацию глицерина.

Многокомпонентная среда МОД4 была приготовлена согласно авторской рецептуре [10].

Получение НК МТБ. Культуру МТБ выращивали 8–11 сут при 37°C с перемешиванием (200 об./мин) в колбах объемом 100 мл, содержащих 40 мл среды Сотона и 0.05%-ный Твин-80 с добавлением ростовой добавки ADC. Эту культуру использовали для пересева (конечная концентрация 10^5 – 10^6 кл./мл среды) в модифицированную среду Сотона, pH 6.0, с ADC и с тилосаполом (0.025%) вместо Твин-80. Культуру МТБ инкубировали в течение 40–60 сут при 37°C с перемешиванием (200 об./мин). Периодически проводили измерение pH среды. При повторном достижении значения pH 6.0–6.2 в стационарной фазе, культуру переносили в закрытые пластиковые фальконы на 50 мл и добавляли 2-(N-морфолино)этансульфоновую кислоту (МЭС) до конечной концентрации 20 мМ. Культуру МТБ хранили в статических условиях при комнатной температуре в темноте от 4 мес до 1 г.

Оценка метаболической активности МТБ. Метаболическую активность МТБ оценивали по интенсивности включения в клетки $[5,6\text{--}^3\text{H}]$ урацила. К 1 мл культуры добавляли 1 мкл (0.02 мкмоль, 1 мКи) меченого урацила. Инкубацию культуры с внесенной меткой проводили в течение 20 ч с перемешиванием при 37°C. Клетки отмывали 3 раза 7%-ной ТХУ и 96%-ным этанолом на стеклянных фильтрах GFC (“Whatman”, США), которые затем помещали в сцинтилляционную жидкость (Ultima GOLD™, “PerkinElmer”, США). Уровень радиоактивности измеряли на счетчике LS6500 (“Beckman Coulter”, США).

Число колониеобразующих единиц (КОЕ). Число колониеобразующих единиц определяли по высевам на плотную питательную (1.5% агара) среду МПБ (для *M. smegmatis*) или Сотона с ADC (для МТБ) по 100 мкл суспензии из серии последовательных десятикратных разведений исходной культуры. КОЕ для МТБ подсчитывали через 3–4 нед. инкубации при 37°C после посева, определяя его как среднее из результатов подсчета, сделанного в 3 повторностях. КОЕ для *M. smegmatis* определяли через 5 сут инкубации при 37°C. Предел обнаружения КОЕ составлял 10 кл./мл.

Подсчет наиболее вероятного числа клеток (НВЧК). Подсчет наиболее вероятного числа клеток в культурах МТБ, содержащих НК, проводили в пластиковых 48-луночных планшетах (“Corning”, США), каждая лунка которого содержала 0.9 мл среды Сотона с добавлением ADC и по 0.1 мл культуры из соответствующего десятикратного серийного разведения. В некоторых экспериментах в среду добавляли МПБ или другие добавки в

различных концентрациях. Каждое разведение было представлено в 3 повторностях. Планшеты инкубировали в течение 2 мес. при 37°C в статическом режиме. При подсчете наиболее вероятного числа реактивированных клеток учитывали лунки с видимым бактериальным ростом. Значение НВЧК в 1 мл и доверительные интервалы определяли по стандартным статистическим таблицам [10].

Реактивация НК МТБ. Процедуру реактивации НК МТБ проводили 2 способами: в жидкой среде в 48-луночных планшетах с одновременной оценкой НВЧК (как описано выше) или в колбах с 200 мл среды Сотона с добавкой ADC и другими добавками при 37°C с перемешиванием (100 об./мин). В последнем случае перед инокулированием клетки отмывали от среды культивирования 8–10 раз в фосфатном буфере pH 7.2. Периодически отбирали пробы для измерения оптической плотности при 600 нм (ОП₆₀₀), включения радиоактивного урата, определения КОЕ и НВЧК. В отдельных экспериментах к среде реактивации добавляли фильтраты, отобранные в разное время из реактивированной культуры МТБ.

Получение рекомбинантных белков RpfB и RipA. Литическая трансглюкозилаза RpfB (Resuscitation Promoting Factor B) и эндопептидаза RipA (Resuscitation Promoting Factor Interacting Protein A) были получены из Institute of Biostructures and Bioimaging, C.N.R. (Неаполь, Италия) в виде конструкций RpfB_{268–362} и RipA_{332–472}. Экспрессию белков в клетках *E. coli*, выделение и очистку белков проводили по методике, описанной в статье [11].

Получение пептидогликана микобактерий. Получение ПГ микобактерий проводили по методикам, описанным ранее [12, 13] в модификации [11] с использованием культуры *Mycobacterium smegmatis* mc² 155 и *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

Получение меченого препарата ПГ. Меченый флуоресцентным красителем (флуоресцеин-5-изотиоцианат, ФИТЦ, “Sigma”, США) препарат ПГ получали в соответствии с опубликованной методикой [11].

Получение фрагментов пептидогликана (ФПГ) путем ферментативного гидролиза. ФПГ получали из меченого и немеченого ПГ путем его гидролиза белками RpfB и RipA (по 20 мкг/мл каждого белка) отдельно и в комбинации в течение 6 сут при 37°C при постоянном перемешивании. Через 6 сут ферментативную реакцию останавливали нагреванием при 80°C в течение 20–40 мин. Нерастворенные и не гидролизованные остатки ПГ удаляли центрифугированием при 10000 g в течение 15 мин.

В случае с меченым ПГ интенсивность флуоресценции супернатанта после центрифугирования измеряли при длине волны возбуждения 492 нм и длине волны испускания 515 нм. Уровень гидролиза оценивали по интенсивности флуоресцен-

ции супернатанта. При гидролизе немеченого ПГ концентрацию полученных ФПГ определяли фенол-серноокислотным методом [14].

Получение ФПГ путем ультразвуковой дезинтеграции. Пептидогликан микобактерий в концентрации 2 мг/мл суспендировали в фосфатном буфере pH 6.0. ПГ озвучивали на ультразвуковом дезинтеграторе HD 2200 (“Sonopuls”, Германия) в течение 1 мин (режим пульсаций – 9 циклов в минуту). Озвученную смесь центрифугировали при 10000 g 15 мин для удаления неразрушенного ПГ, а супернатант, содержащий ФПГ, собирали и лиофилизировали.

Определение суммарной концентрации ФПГ. Концентрацию ФПГ определяли фенол-серноокислотным методом Дюбуа [14]. К 500 мкл исследуемого образца добавляли 6 мкл фенола (80%-ный водный раствор) и 500 мкл концентрированной серной кислоты. ОП полученного раствора измеряли при 485 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Эффект “самоингибирования” при реактивации покоящихся клеток *M. tuberculosis*. В лабораторной практике для выявления МТБ в клинических образцах используют культуральные методы, предполагающие размножение клеток возбудителя в специальных жидких средах. Однако, как ведут себя НК в таких условиях практически не было исследовано. С этой целью в настоящей работе были использованы покоящиеся формы МТБ, утратившие способность расти на стандартных плотных средах. Такие НК МТБ были получены *in vitro* в условиях длительной стационарной фазы при медленном самозакислении жидкой среды и последующего хранения клеток в этой среде [15]. В результате, после 4 мес. пребывания в состоянии покоя, культура в основном была представлена морфологически измененными клетками, обладающими выраженной “некультивируемостью”: КОЕ от 10 до 10³ кл./мл при общей концентрации клеток 10⁹–10¹⁰ кл./мл [15]. Такие формы бактерий могли быть реактивированы в жидкой среде Сотона с ростовой добавкой ADC, а количество клеток в исходной культуре могло быть определено с помощью метода НВЧК в планшетном варианте с использованием серийных разведений с последующей инкубацией [2, 9]. Однако при воспроизведении подобных экспериментов при инокулировании НК микобактерий в колбы с той же средой было выяснено, что эффективность их реактивации сильно зависит от начальной концентрации клеток. Так, при использовании НК в исходной концентрации 10⁵–10⁶ кл./мл (суммарное количество) наблюдалось размножение бактерий в культуре (увеличение ОП) спустя 20–35 сут для разных экспериментов

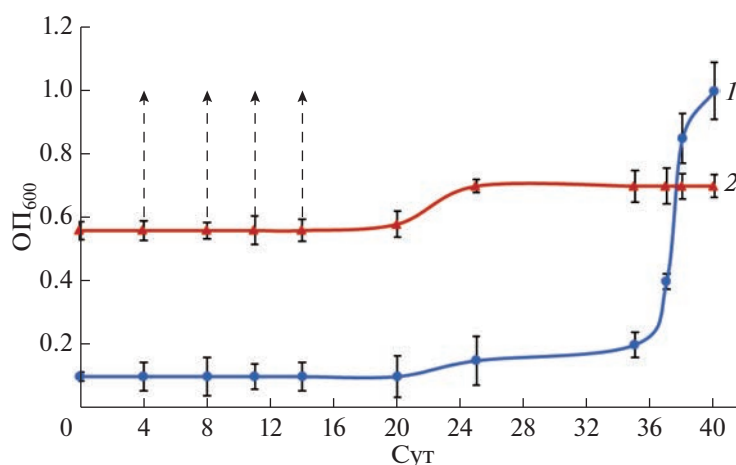


Рис. 1. Изменение ОП₆₀₀ культур при реактивации НК МТБ в среде Сотона с АДС: 1 — исходная концентрация клеток 10^6 кл./мл, 2 — исходная концентрация клеток 5×10^7 кл./мл. Стрелками показаны точки отбора культуры.

в зависимости от срока хранения НК (рис. 1). В тоже время при инокулировании тех же клеток до оптических плотностей 0.4 и выше (около 10^7 – 10^8 кл./мл) реактивация не происходила вовсе и со временем клетки погибали (рис. 1). Это позволило предположить, что в процессе реактивации НК МТБ секретируют в окружающую среду некие ингибирующие вещества. Для экспериментального подтверждения этого предположения из инкубированных культур НК МТБ (с исходной высокой концентрацией клеток) периодически отбирали пробы (рис. 1), которые затем пропускали через фильтр с диаметром пор 0.22 мкм. Было изучено действие полученного фильтрата на рост вегетативных клеток МТБ, взятых в экспоненциальной фазе роста. Как оказалось, ингибирующее действие фильтрата, вызывающее торможение роста клеток, зависело от продолжительности инкубации НК в среде Сотона, и достигало максимума при инкубировании в течение 11 сут (рис. 2). Обнаружено также снижение ингибирующей активности фильтрата с увеличением времени инкубации более 11 сут, что могло свидетельствовать об относительной нестойкости секретируемого вещества (рис. 2). Таким образом, была установлена секреция неких антибактериальных веществ НК МТБ в процессе их реактивации. Такое “самоингибирование”, очевидно, удлиняет лаг-фазу и увеличивает время детекции возбудителя в образцах, особенно в условиях их значительной обсемененности. Ранее подобный эффект был отмечен для реактивированной культуры *Micrococcus luteus* [16]. Установление природы этих антибактериальных соединений, способов их инактивации, или ингибирование их синтеза может быть перспективным для ускорения культурального метода детекции МТБ.

Особенности лаг-фазы при реактивации покоящихся клеток *M. tuberculosis*. При исследовании реактивации НК МТБ в жидкой среде при исходной концентрации клеток ниже порогового уровня ($\sim 10^7$ кл./мл) была выявлена двухстадийность этого процесса: быстрое нарастание числа КОЕ на ранних стадиях реактивации (4 сут) и последующая длительная лаг-фаза, предшествующая началу деления клеток до 20 сут (рис. 3). Вероятно, быстрый подъем значения КОЕ не связан с размножением клеток, поскольку, во-первых, значение НВЧК культуры (концентрация клеток, способных к размножению) не изменялось за этот период (рис. 3). Во-вторых, несмотря на изменение в КОЕ, клетки в культуре проявляли фоновую дыхательную активность, которая увеличивалась лишь к началу активного деления клеток (30 сут), и незначительный уровень включения радиоактивного урацила (маркер синтеза РНК) до этого момента (рис. 3). Наконец, скорость изменения КОЕ в этот период соответствует кажущемуся времени генерации ~ 1.5 ч, что значительно ниже известного времени генерации для МТБ (около 20 ч). Очевидно, что резкий подъем КОЕ на начальной стадии реактивации отражает изменения каких-то свойств НК, в результате которых они приобретают способность к росту на плотных средах.

В случае реактивации НК с исходной концентрацией выше пороговой ($\sim 10^7$ кл./мл) также наблюдалась быстрая стадия увеличения КОЕ, сменяющаяся длительной фазой медленного снижения КОЕ, которое в итоге достигало значений ниже детектируемого уровня (рис. 4).

Таким образом, эти результаты свидетельствовали о наличии продолжительной истинной лаг-фазы при реактивации НК МТБ (при относительно небольших начальных концентрациях), в течение ко-

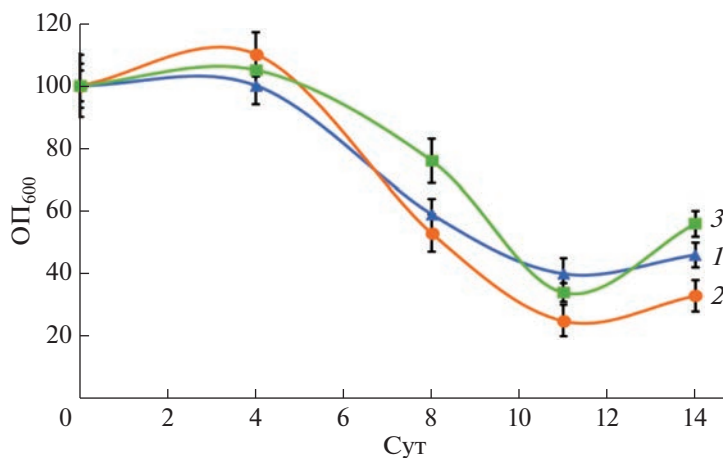


Рис. 2. Ингибирование роста активных клеток МТБ в присутствии фильтратов реактивированной культуры МТБ, содержащей НК. На оси абсцисс — время отбора фильтратов из реактивированной культуры. На оси ординат — отношение ОП₆₀₀ активной культуры, выращенной в присутствии фильтратов к таковому без фильтрата (контроль) через 3 сут (1); 4 сут (2) и 7 сут (3) инкубации.

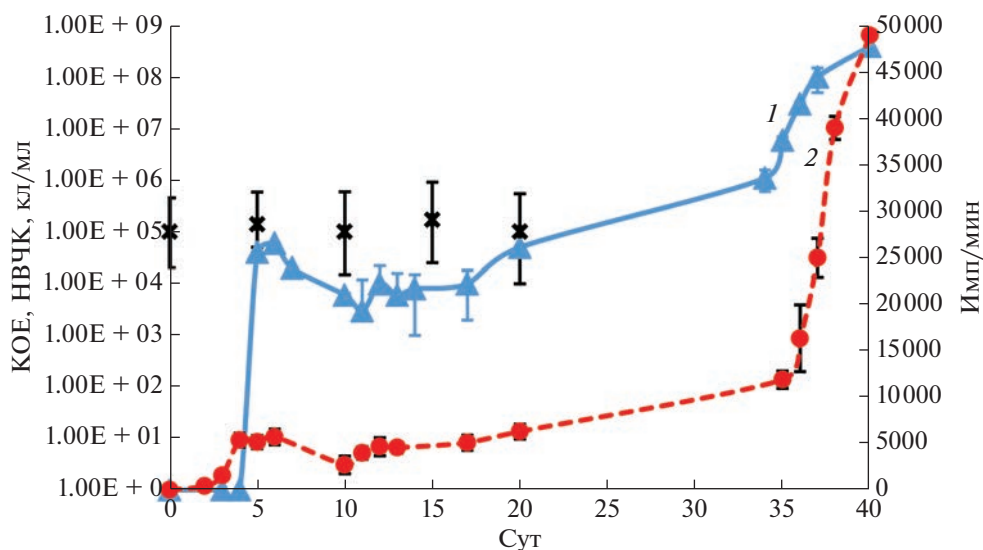


Рис. 3. Изменение метаболической активности клеток (2, импульсов/мин) и КОЕ (1, кл./мл) при реактивации НК МТБ на среде Сотона с добавкой АДС. Крестиками отмечены значения НВЧК. (Исходная концентрация бактерий 2×10^5 кл./мл). Показаны стандартные отклонения для КОЕ и включения метки, а также доверительные интервалы на уровне 95% для НВЧК. Приведены результаты типичного из 4 проведенных экспериментов.

торой не происходит размножение, в отличие от кажущейся лаг-фазы, когда при неизменяющейся ОП происходит размножение культивируемых клеток при их малом начальном количестве. Ранее подобная двухстадийность была обнаружена при реактивации НК *M. smegmatis*. Было выяснено, что в течение истинной лаг-фазы, тем не менее, происходит “метаболическая реактивация”, при которой регистрируется увеличение мембранного потенциала, разрушение накопленной в покое трегалозы и изменения в морфологии клеток [17]. Обнаруженная длительная лаг-фаза,

предположительно, связана с несбалансированным метаболизмом клетки в процессе реактивации, при котором возможно накопление промежуточных метаболитов с ингибирующими свойствами, например, таких активных карбонильных соединений, как метилглиоксаль [18]; либо с недостатком неких метаболитов, необходимых для запуска метаболических процессов в клетках (“фенотипическая ауксотрофия”); либо необходимостью присутствия факторов, способствующих делению клеток. В любом случае, обнаруженная истинная лаг-фаза, очевидно, определяет длительность культивиру-

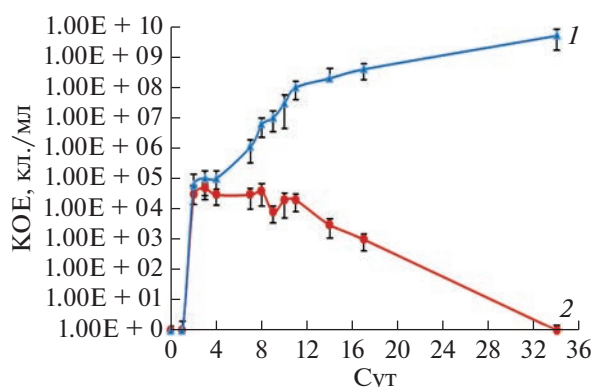


Рис. 4. Изменение количества КОЕ (кл./мл) при реактивации НК МТБ на средах: Сотона + ADC + МПБ (1, 3.25 г/л), Сотона + ADC (2). Исходная концентрация бактерий 2×10^7 кл./мл.

вания образцов с НК для их детекции культуральными методами.

Модификация среды для стимуляции реактивации НК *M. tuberculosis*. Для поиска состава среды оптимальной для реактивации НК был проведен скрининг различных добавок, в том числе субстратов и антиоксидантов. В качестве объекта на начальном этапе использовали НК быстрорастущей микобактерии *M. smegmatis*, часто применяемой в качестве модельного микроорганизма для МТБ [19]. НК *M. smegmatis* получали аналогично НК МТБ при медленном закислении среды [20]. В итоге было проверено в качестве добавок 16 веществ в разных концентрациях, потенциально способных влиять на рост микобактерий. Наибольшая стимуляция реактивации, которую оценивали по увеличению КОЕ в течении реактивации, была отмечена при введении в среду Сотона мясоептонного бульона (МПБ) в оптимальной концентрации 3.25 г/л. Найденный эффект МПБ был использован в экспериментах по стимуляции реактивации НК МТБ. В качестве базовой среды использовали среду Сотона с добавкой ADC, в которую инокулировали НК в исходной концентрации выше порогового уровня ($\sim 10^7$ кл./мл). Как видно из рис. 4, при добавлении в среду МПБ происходило сокращение лаг-фазы (до 2 сут) и быстрое последующее размножение клеток. Эти эксперименты указывают на наличие неких компонентов, содержащихся в МПБ, необходимых для реактивации НК и дальнейшего их размножения.

Оптимизация культурального метода НВЧК для количественного определения содержания “некультивируемых” форм *M. tuberculosis*. Выявление возбудителя в образцах путем культивирования в жидкой среде (см. выше), по-существу, является качественным методом, особенно если в популяции содержатся НК. Действительно, в этом случае трудно разделить процессы реактивации НК и

размножения начально культивируемых клеток. В настоящее время метод НВЧК является единственным количественным методом, позволяющим определять в бактериальной популяции концентрацию НК, потенциально способных к размножению. Многочисленные физические методы (например, флуоресцентная микроскопия) или молекулярно-биологические методы (ПЦР или ПЦР в реальном времени) не могут определить способна ли данная бактериальная клетка к делению. В тоже время ясно, что именно способность к делению определяет инфекционный потенциал НК МТБ. В этой связи были предприняты попытки модификации жидкой среды при определении методом НВЧК для повышения его эффективности. Как видно из рис. 5, внесение МПБ (3.25 г/л) в базовую среду Сотона, используемую в методе НВЧК, увеличивало на 2.5 порядка количество детектируемых в исходной популяции клеток, способных к размножению, по сравнению с определением НВЧК без добавки. При этом также было обнаружено, что для максимальной эффективности метода, концентрация глицерина в среде должна быть снижена по сравнению с классической прописью среды Сотона до 0.5%.

В отдельных экспериментах была протестирована полная многокомпонентная среда МОД4, описанная недавно в литературе в качестве эффективной среды для стимуляции роста активной культуры МТБ [10]. Однако реактивация НК и их размножение на данной среде не наблюдались (рис. 5). По-видимому, обогащение среды реактивации метаболизируемыми субстратами оказывает отрицательный эффект на реактивацию и выявление НК МТБ, о чем также свидетельствует необходимость снижения концентрации глицерина (основной субстрат, используемый МТБ) и использование оптимального количества МПБ. Отрицательный эффект повышенных концентраций субстратов в среде напоминает явление гибели голодающей культуры бактерий при добавлении питательного компонента, усиливающего её рост в нормальных условиях (substrate accelerated death) [21].

Другой подход к оптимизации метода НВЧК мог состоять в использовании веществ, способствующих делению клеток на заключительном этапе реактивации НК [11, 22–24]. Как было ранее выяснено, фильтраты активно растущих культур микобактерий способствуют обнаружению НК микобактерий как в образцах, полученных *in vitro* [2, 9], так и в образцах больных ТБ (мокрота) [25]. Однако природа, присутствующих веществ установлена не была. Более того, несмотря на эффективность применения фильтрата для стимуляции реактивации НК, на практике их применение затруднено из-за короткого срока сохранения их реактивирующей активности, даже в замороженном состоянии, и дополнительной трудности

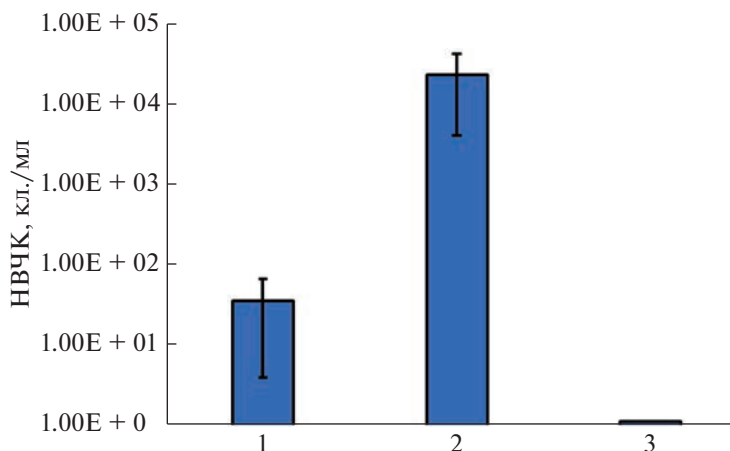


Рис. 5. Количество способных к размножению клеток (клет./мл) в культурах МТБ, содержащих НК, определенных методом НВЧК на средах: Сотона + АСД (1), Сотона + АСД + МПБ (2, 3.25 г/л) и МОД4 (3). Указаны доверительные интервалы на уровне 95% для значений НВЧК.

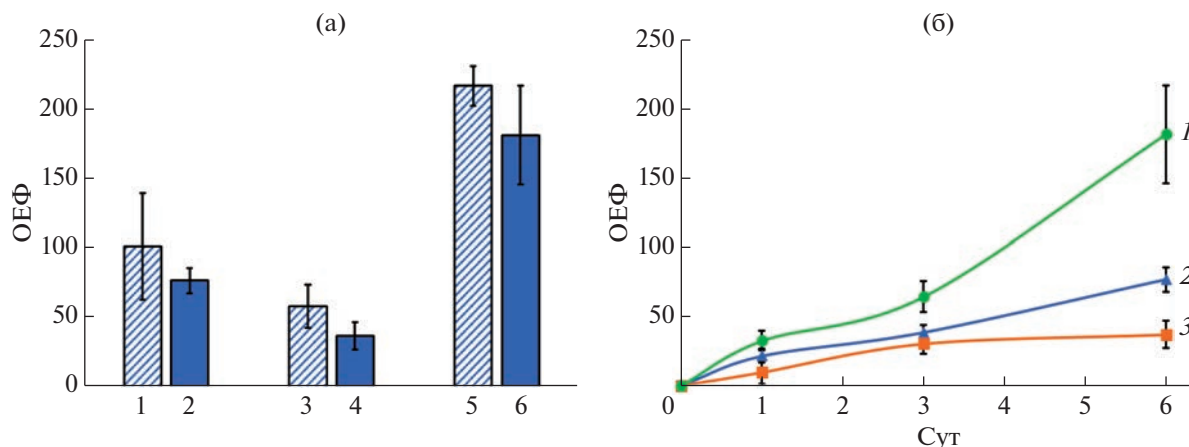


Рис. 6. Гидролиз меченых ФИТЦ препаратов ПГ, выделенных из *M. smegmatis* и МТБ (а) белками RpfB (1, 2 соответственно), RipA (3, 4 соответственно) и RpfB + RipA (5, 6 соответственно), динамика гидролиза ФИТЦ-ПГ (б) при 37°C под действием RpfB + RipA (1), RpfB (2); RipA (3). На оси ординат – относительные единицы флуоресценции (ОЕФ) супернатантов, полученных после осаждения негидролизованых препаратов.

получения. В этой связи были предприняты попытки использования активных компонентов, которые могут находиться в фильтрате. Ранее было обнаружено, что секретируемые белки семейства Rpf микобактерий и продукты их ферментативского действия стимулируют реактивацию НК *M. smegmatis* на этапе деления клеток [11, 22]. В настоящем исследовании это явление было проверено на модели НК МТБ. Для этих экспериментов были получены рекомбинантные белки RpfB и RipA [26–28]. Эти белки гидролизуют ПГ с образованием минимальной структуры, ответственной за реактивацию – дисахарид дипептида (N-ацетилглюкозамин-N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамин), вне зависимости от наличия аминокислоты во втором положении (D-глутамат или D-изоглутамин) [11].

С помощью полученных белков был проведен гидролиз выделенного препарата ПГ из двух источников – МТБ и *M. smegmatis*. Сравнение эффективности гидролиза ПГ из *M. smegmatis* и МТБ в течение 6 сут инкубации ПГ с белками не выявило существенных различий в количестве высвободившихся ФПГ (рис. 6а). Из рис. 6б видно, что при совместном действии двух белков по сравнению с действием отдельных белков, при гидролизе меченого ФИТЦ ПГ МТБ наблюдался синергетический эффект.

ФПГ, полученные после гидролиза ПГ, а также белок RpfB были испытаны в различных вариантах для стимуляции реактивации НК. В присутствии ФПГ и белка RpfB было обнаружено увеличение НК МТБ, способных к реактивации. Хотя уровень

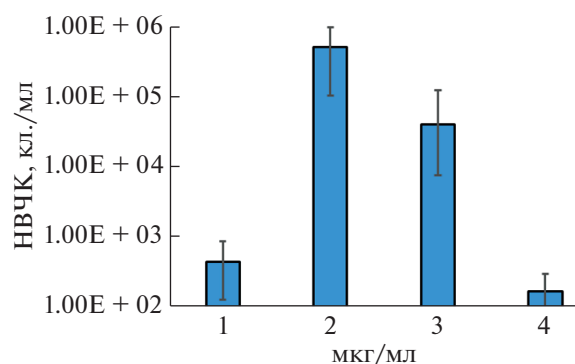


Рис. 7. Количество способных к размножению клеток в культурах МТБ, содержащих НК, определенных методом НВЧК на средах: Сотона + АДС (1); Сотона + АДС + RpfB (2, 5 нг/мл); Сотона + АДС + ФПГ после гидролиза белком RpfB (3, 200 нг/мл); Сотона + АДС + препарат арабиногалактана (4, в качестве контроля, 200 нг/мл). Показано стандартное отклонение данных в сериях от 3 до 10 повторностей.

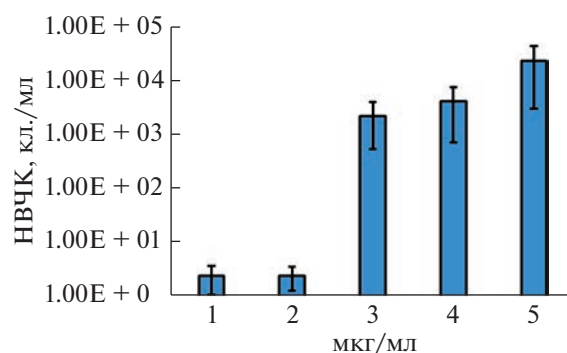


Рис. 8. Влияние ФПГ после ультразвуковой обработки ПГ в культурах МТБ, содержащих НК, на количество способных к размножению клеток, определенных методом НВЧК на средах: Сотона + АДС (1, контроль); Сотона + АДС + 0.05 мкг/мл ФПГ (2); Сотона + АДС + 0.1 мкг/мл ФПГ (3); Сотона + АДС + 0.2 мкг/мл ФПГ (4) и Сотона + АДС + 1 мкг/мл ФПГ (5). Доверительные интервалы указаны на уровне 95% для значений НВЧК.

стимуляции варьировал в экспериментах, увеличение эффективности детекции было достоверным и составляло от 2 до 3 порядков (рис. 7).

Поскольку результатом ферментативского действия белков Rpf является разрушение ПГ, действие ФПГ, полученных в результате ферментативского гидролиза сравнили с действием ФПГ, полученных в результате озвучивания. Как оказалось, “ультразвуковые” ФПГ также увеличивают количество детектируемых НК МТБ методом НВЧК (рис. 8).

Таким образом, вполне вероятно, что используемые в вышеперечисленных работах фильтраты оказывали положительное действие за счет присутствия в них ФПГ. Исследования позволили установить, что стимуляция реактивации НК МТБ может быть достигнута заменой фильтрата на продукты гидролиза ПГ, полученные с помощью RpfB и RipA, и даже на ФПГ, полученные при его ультразвуковом разрушении. Обработка ультразвуком намного проще технически, а ФПГ намного стабильнее фильтрата при хранении.

В результате проведенного исследования были установлены особенности ранней стадии реактивации НК МТБ. Выявлены факторы, влияющие на скорость и уровень детекции таких клеток в культурах МТБ. Эти знания могут быть использованы в качестве подходов для усовершенствования микробиологической диагностики туберкулеза при исследовании биологических образцов больных ТБ.

Авторы выражают благодарность В.Д. Никитушкину за участие в работе по получению клеточных стенок микобактерий, а также выражают благодарность А. Ruggiero и R. Berisio (Institute of Biostructures and Bioimaging, C.N.R., Неаполь,

Италия) за предоставленные конструкции белков RpfB и RipA.

При проведении исследований использовалось оборудование Центра коллективного пользования “Промышленные биотехнологии” Федерального исследовательского центра “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Эргешов А.Э., Черноусова Л.Н., Андреевская С.Н. // Вестник РАМН. 2019. Т. 74. № 6. С. 413–422.
2. Shleeva M.O., Bagramyan K., Telkov M.V., Mukamolova G.V., Young M., Kell D.B., Kaprelyants A.S. // Microbiology. 2002. V. 148. № 5. P. 1581–1591.
3. Medlar E.M., Bernstein S., Steward D.M. // Am. Rev. Tuberc. 1952. V. 66. № 1. P. 36–43.
4. Beck F., Yegian D. // Am. Rev. Tuberc. 1952. V. 66. № 1. P. 44–51.
5. Hobby G.L., Auerbach O., Lenert T.F., Small M.J., Comer J.V. // Am. Rev. Tuberc. 1954. V. 70. № 2. P. 191–218.
6. Biketov S.F., Mukamolova G.V., Potapov V., Gilenkov E., Vostroknutova G.N., Kell D.B., Young M., Kaprelyants A.S. // FEMS Immunol Med Microbiol. 2000. V. 29. № 4. P. 233–240.
7. Dhillon J., Lowrie D.B., Mitchison D.A. // BMC Infect. Dis. 2004. V. 4. P. 4–7.
8. Mukamolova G.V., Turapov O., Malkin J., Woltmann G., Barer M.R. // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2010. V. 181. P. 174–180.
9. Shleeva M.O., Kudiykina Y.K., Vostroknutova G.N., Suzina N.E., Mulyukin A.L., Kaprelyants A.S. // Tuberculosis (Edinb). 2011. V. 91. № 2. P. 146–154.
10. Ghodbane R., Raoult D., Drancourt M. // Sci Rep. 2014. V. 4. P. 4236.

11. Nikitushkin V.D., Demina G.R., Shleeva M.O., Guryanova S.V., Ruggiero A., Berisio R., Kaprelyants A.S. // FEBS J. 2015. V. 282. № 13. P. 2500–2511.
12. Parish T., Stoker N. // Methods in molecular Biology. In Mycobacteria protocols, Humana Press, Totowa, NJ. 1998. P. 91–107.
13. Mahapatra S., Crick D.C., McNeil M.R., Brennan P.J. // J Bacteriol. 2008. V. 190. № 2. P. 655–661.
14. Du Bois A.B., Botelho S.Y., Bedell G.N., Marshall R., Comroe J.H. Jr. // J Clin Invest. 1956. V. 35. P. 322–326.
15. Shleeva M.O., Kudykina Y.K., Vostroknutova G.N., Suzina N.E., Mulyukin A.L., Kaprelyants A.S. // Tuberculosis (Edinb). 2011. V. 91. № 2. P. 146–154.
16. Mukamolova G.V., Kaprelyants A.S., Kell D.B. // Antonie Van Leeuwenhoek. 1995. V. 67. № 3. P. 289–295.
17. Shleeva M.O., Trutneva K.A., Demina G.R., Zinin A.I., Sorokoumova G.M., Laptinskaya P.K., Shumkova E.S., Kaprelyants A.S. // Front Microbiol. 2017. V. 8. P. 524.
18. Nikitushkin V.D., Trenkamp S., Demina G.R., Shleeva M.O., Kaprelyants A.S. // Metabolomics. 2020. V. 16. № 2. P. 24.
19. He Z., De Buck J. // BMC Microbiol. 2010. V. 10. P. 121.
20. Кудыкина Ю.К., Шлеева М.О., Арцатбанов В.Ю., Сузина Н.Е., Капрельянц А.С. // Микробиология. 2011. Т. 80. № 5. С. 625–636.
21. Postgate J.R., Hunter J.R. // Nature. 1963. V. 198. P. 273.
22. Nikitushkin V.D., Demina G.R., Shleeva M.O., Kaprelyants A.S. // Antonie Van Leeuwenhoek. 2013. V. 103. № 1. P. 37–46.
23. Shleeva M.O., Goncharenko A.V., Kudykina Y.K., Young D., Young M., Kaprelyants A.S. // PLoS One. 2013. V. 8. № 12. e82914. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082914>
24. Назарова Е.В., Шлеева М.О., Морозова Н.С., Кудыкина Ю.К., Вострокнутова Г.Н., Ружицкий А.О., Селищева А.А., Сорокоумова Г.М., Швец В.И., Капрельянц А.С. // Биохимия. 2011. Т. 76. № 6. С. 781–791.
25. Zainabadi K., Walsh K.F., Vilbrun S.C., Mathurin L.D., Lee M.H., Saito K., Mishra S., Ocheretina O., Pape J.W., Nathan C., Fitzgerald D.W. // Antimicrob. Agents Chemother. 2021. V. 65. № 8. e0060821. <https://doi.org/10.1128/aac.00608-21>
26. Hett E.C., Chao M.C., Steyn A.J., Fortune S.M., Deng L.L., Rubin E.J. // Mol. Microbiol. 2007. V. 66. № 3. P. 658–668.
27. Hett E.C., Chao M.C., Deng L.L., Rubin E.J. // Plos pathogens. 2008. V. 4. № 2. e1000001. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000001>
28. Ruggiero A., Marasco D., Squeglia F., Soldini S., Pedone C., Berisio R. // Structure 2010. V. 18. № 9. P. 1184–1190.

Detection of “Non-culturable” *Mycobacterium tuberculosis* Cells by Culture Methods

G. R. Demina^a, *, M. O. Shleeva^a, D. I. Bagaeva^a, G. V. Vostroknutova^a, and A. S. Kaprelyants^a

^a Bach Institute of Biochemistry, Fundamentals of Biotechnology Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: Galyademina@yandex.ru

The specific features of the reactivation of “non-culturable” (NC) *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) cells for the following propagation in liquid medium were defined, as well as the approach for the quantification of these cells by culture methods was suggested. When NC cells obtained in vitro were inoculated into standard Sauton’s liquid medium, a prolonged (up to 20 days) lag-phase is observed, in which no cell propagation is occurred. During the lag-phase, dormant cells secrete substances of unknown nature that inhibit or completely arrest the reactivation and growth of cultures when initial dormant cells concentration is above 10^7 – 10^8 cells/mL. Addition of meat-peptone broth (3.25 g/L) into a standard Sauton’s medium with a 10-fold reduced concentration of glycerol significantly stimulated the reactivation and propagation of the initially dormant cells inoculated at a concentration above the threshold. This modification of the medium composition made it possible to detect up to 10^3 times more cells in the MTB population by the method of the Most Probable Number (MPN) of cells. Increased number of the detected dormant cells in the population (up to an average of 2.5 orders of magnitude) was also achieved by adding to the reactivation medium recombinant protein RpfB (5 ng/mL), a protein of the Rpf family – resuscitation promoting factor of dormant bacteria. Perhaps the action of a Rpf enzyme is related to the products of its enzymatic activity, since an increased MPN value in the dormant cells population was also observed when the products of mycobacteria peptidoglycan hydrolysis obtained by the coaction of RpfB and endopeptidase RipA were added. The addition of sonicated peptidoglycan fragments at a concentration up to 1 µg/mL had a similar effect. The obtained results may be used as approaches to optimize liquid media composition and culture conditions aiming to identify in clinical samples the pathogen of tuberculosis remain in “non-culturable” state.

Keywords: *M. tuberculosis*, dormant cells, “non-culturable” cells, lag-phase, reactivation, Rpf proteins, peptidoglycan fragments