

ОСОБЕННОСТЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *ICL* И *HSPX*, ИНДУЦИРУЕМЫХ ПРИ ВЫЖИВАНИИ В ОРГАНИЗМЕ ХОЗЯИНА, У ШТАММОВ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* КЛАСТЕРА W*

С. Н. АНДРЕЕВСКАЯ, Л. Н. ЧЕРНУСОВА, Т. Г. СМЕРНОВА, Е. Е. ЛАРИОНОВА

EXPRESSION OF THE *ICL* AND *HSPX* GENES INDUCED DURING SURVIVAL IN THE HOST IN *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* W CLUSTER STRAINS

S. N. ANDREEVSKAYA, L. N. CHERNOUSOVA, T. G. SMIRNOVA, E. E. LARIONOVA

ФГБУ «Центральный НИИ туберкулеза» РАМН, г. Москва

На модели культивирования *M. tuberculosis* разных генотипических кластеров (8 штаммов W кластера, 3 – AI кластера, 1 – BJ и лабораторный вирулентный штамм H37Rv) *in vitro* и *ex vivo* в перитонеальных макрофагах мыши были получены результаты экспрессии двух основных генов *icl* и *hspX*, индуцирующихся при попадании *M. tuberculosis* в макрофаги. В качестве референс-гена применялся ген домашнего хозяйства *rrs16S*. Выявлен полиморфизм штаммов разных кластеров и штаммов одного кластера по уровню экспрессии генов *icl* и *hspX* при культивировании в среде и в МФ. Показано повышение экспрессии генов *icl* (в 3 – 122 раз) и *hspX* (в 2 – 514 раз) при культивировании в макрофаг по сравнению с ростом *in vitro*. Уровень экспрессии гена *icl* отличался между штаммами не более чем в 30 раз. Разница в экспрессии гена *hspX*, являющегося маркером перехода в дормантное состояние, была большей в 140 раз. Выявлен штамм с экстремально высоким уровнем экспрессии гена *hspX* *in vitro* и *ex vivo*. Этот штамм относился к субкластеру W148, который составляет 30% от W-штаммов, циркулирующих на территории РФ. Показанная для МБТ W-кластера конститутивная повышенная экспрессия гена *hspX*, входящего в «регулон дормантности», возможно, дает этим штаммам ряд преимуществ для выживания в организме хозяина.

Ключевые слова: микобактерии туберкулеза, W-кластер, экспрессия генов, макрофаги.

In vitro and *ex vivo* models for culturing different *M. tuberculosis* genotypic clusters (8 W cluster strains, 3 AI cluster ones, and 1 BJ and laboratory virulent strain H37Rv) in murine peritoneal macrophages yielded results of expression of the two basic genes *icl* and *hspX* induced by *M. tuberculosis* entering the macrophages. The housekeeping *rrs16S* gene was used as reference. The polymorphism of strains of different clusters and those of one cluster was revealed from the expression of the *icl* and *hspX* genes when cultured in the medium and macrophages. It was shown that there were 3-122- and 2-514-fold increases in the expression of the *icl* and *hspX* genes when cultured in the macrophage as compared to their *in vitro* growth. The expression of the *icl* gene showed a not more than 30-fold difference between the strains. The difference in the expression of the *hspX* gene that is a marker of transition to dormancy was 140 times greater. A strain with *hspX* gene overexpression was identified *in vitro* and *ex vivo*. This strain was referred to as a W148 subcluster that was 30% of the W strains circulating in the Russian Federation. The increased MBT W cluster constitutive expression of the *hspX* gene included in the dormancy regulon may provide these strains some advantages for survival in the host.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, W cluster, gene expression, macrophages.

В последнее десятилетие филогенетически родственная группа штаммов *M. tuberculosis* W-Beijing привлекает внимание исследователей, так как, обладая высокой трансмиссивностью, является наиболее распространенной в мире [1, 5, 9]. Считается, что *M. tuberculosis* кластера W-Beijing эндемичны для Юго-Восточной Азии, и более чем у 50% больных туберкулезом из этого региона идентифицируют штаммы *M. tuberculosis* этой группы [13, 18]. В России встречаемость *M. tuberculosis* этого кластера также высока и составляет 40-60% в зависимости от региона [1, 11].

Феномен высокой трансмиссивности, отмеченный у этой группы штаммов, позволил предположить, что *M. tuberculosis* кластера W-Beijing могут обладать специфическими свойствами, помогающими им распространяться в человеческой популяции. В частности, для *M. tuberculosis* этого кластера было показано, что они обладают высо-

кой приспособляемостью к выживанию в макрофагах (МФ) [2, 22].

Попадая в макрофагальную фагосому, *M. tuberculosis* оказываются в условиях, обедненных по питательным веществам, и в качестве источника углерода используют липиды клетки хозяина, что в сочетании с пониженным уровнем кислорода приводит к перестраиванию метаболизма *M. tuberculosis* по пути гликолатного цикла [6], одним из ключевых ферментов которого является изоцитратлиаза [12], кодируемая геном *icl*.

Кроме того, у *M. tuberculosis* в условиях пониженного содержания кислорода активируется так называемый «регулон дормантности» DosR. Регулон DosR *M. tuberculosis* включает набор из 48 генов, которые координационно регулируются в ответ на гипоксию или на присутствие оксида азота [16, 19]. Оба этих условия приводят к ингибированию дыхания, что, как предполагают, приводит к развитию

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 07-04-00536-а.

нерепликативной персистенции у *M. tuberculosis* в условиях гранулемы в легких человека [14]. Одним из наиболее изученных генов, входящих в состав DosR, является *hspX*, который кодирует белок 16 кДа, подобный α -кристаллину. Известно, что этот белок необходим для роста *M. tuberculosis* в культуре МФ [20], а также при росте *M. tuberculosis in vitro* описана индукция транскрипции гена *hspX* в ответ на добавление в среду культивирования оксида азота и в условиях стационарной фазы [7, 8, 10, 21].

В исследовании предпринята попытка дать объяснение на молекулярном уровне способности *M. tuberculosis* кластера W выживать в МФ, изучив особенности транскрипции генов *icl* и *hspX*, активирующихся при внутриклеточных условиях существования.

Материалы и методы

Использовали чувствительные к противотуберкулезным препаратам штаммы *M. tuberculosis* наиболее распространенных в России кластеров W (8 штаммов) и AI (3 штамма), один штамм малого кластера BJ, а также лабораторный вирулентный штамм *M. tuberculosis* H37Rv. Кластерную принадлежность штаммов устанавливали генотипированием по ПДРФ IS6110 по стандартной методике [17]. Микобактерии были переведены в суспензию одиночных клеток в одинаковой фазе роста и стандартизованы по КОЕ [2].

МФ выделяли из клеток перитонеального экссудата мышей линии C57Bl/6 по стандартной методике [2]. Заражение МФ штаммами *M. tuberculosis* осуществляли в трипликатах в соотношении МБТ : МФ 10 : 1 и культивировали в полной среде RPMI 1640 в течение 7 дней.

Параллельно проводили культивирование *M. tuberculosis* каждого штамма в трипликатах *in vitro* в полной среде RPMI 1640 без МФ (исходное число КОЕ такое же, как и при заражении МФ).

РНК из образцов выделяли набором RNeasy[®] Total RNA Isolation System (Promega, США) согласно инструкции изготовителя. Оставшуюся в растворе ДНК разрушали с использованием набора для ДНК-азирования (Fermentas, Литва).

Синтез кДНК проводили с помощью набора RevertAid[™] H Minus (Fermentas, Литва) с 6-тинуклеотидными «random primers» (Fermentas, Литва) в термоциклере ICycler, Bio-Rad при 42°C в течение 1 ч. Полученную кДНК использовали в реакции ПЦР в режиме реального времени для определения экспрессии генов *M. tuberculosis*.

При изучении генов, индукция которых зависит от условий внешней среды, чтобы иметь возможность сравнивать уровень экспрессии одного и того же гена, полученного из разных образцов, необходимо проведение нормализации по уровню экспрессии одного из генов домашнего хозяйства. Для этого использовали ген *rrs16S*, кодирующий 16S субъединицу рРНК.

Подбор праймеров осуществляли с применением специализированного программного обеспечения и верифицировали с помощью биоинформационных инструментов-web-сервисов (NCBI BLAST, In silico PCR). Последовательности праймеров и TaqMan зондов приведены в таблице.

Праймеры и зонды синтезировали в ООО «Синтол». Для зондов к мРНК всех исследованных генов использовали пары флюорофор – гаситель FAM и BHQ1 соответственно. Состав реакционных смесей: праймеры 0,5 мкМ каждый, 200 мкМ dNTP, 2,5 мМ MgCl₂, зонд 0,5 мкМ, Taq-полимераза 0,5 ед/мкл. ПЦР проводили в одинаковых условиях, подходящих для всех праймеров: 95° 1,5 мин – (95° 15 с – 60° 40 с) × 40 циклов.

Уровень экспрессии гена выражали в относительных единицах (ОЕ) по отношению к экспрессии гена домашнего хозяйства *rrs16S* и определяли по формуле:

$$\frac{N}{N(rrs16S)} = 2^{(x(rrs16S)-x)}$$

где: N – число копий мРНК, синтезированной с исследуемого гена у тестируемого штамма;

N(*rrs16S*) – число копий мРНК, синтезированной с гена домашнего хозяйства *rrs16S*;

x – значение порогового цикла при амплификации исследуемого гена;

x(*rrs16S*) – значение порогового цикла гена домашнего хозяйства *rrs16S*.

Результаты и обсуждение

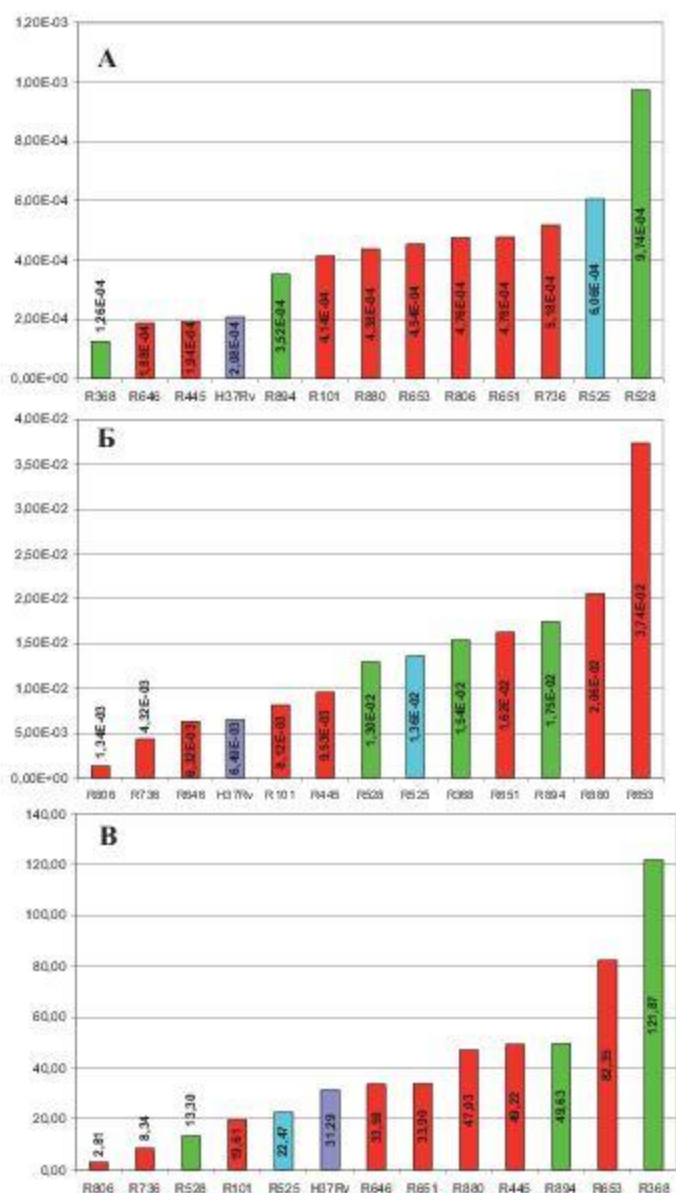
При культивировании штаммов *M. tuberculosis* на среде RPMI1640 без МФ экспрессия гена *icl* была сходной у всех штаммов. Минимальный ($1,26 \times 10^{-4}$ ОЕ) и максимальный ($9,74 \times 10^{-4}$ ОЕ) уровни экспрессии были зафиксированы у AI-штаммов (R368 и R528 соответственно) и отличались приблизительно в 8 раз (рис. 1А).

Большинство штаммов W-кластера (6 из 8) имели уровень экспрессии в диапазоне $4,14 \times 10^{-4}$ – $5,18 \times 10^{-4}$ ОЕ. Сравнимый с ними уровень экспрес-

Таблица

Последовательности праймеров и зондов для проведения ПЦР в реальном времени для анализа экспрессии генов *icl*, *hspX* и *rrs16S*

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер	TaqMan зонд
<i>icl</i>	c atc cgc a ctt gac gct g	atc acc acc gt ggg aac atc	tcggctcgccgcgatgt
<i>hspX</i>	ATCCCGGCCACCTTCGACA	AGCACCTACCGGCAGCGACA	GCAAGTCCTTCTGCTCGGTGCGCTC
<i>rrs16S</i>	GAGTGGCGAAGCGGTGAGTAACA	CACCCACCAACAAGCTGATAGG	TCCACCACAAGACATGCATCCCGTG



■ - штаммы кластера W; ■ - штаммы кластера AI;

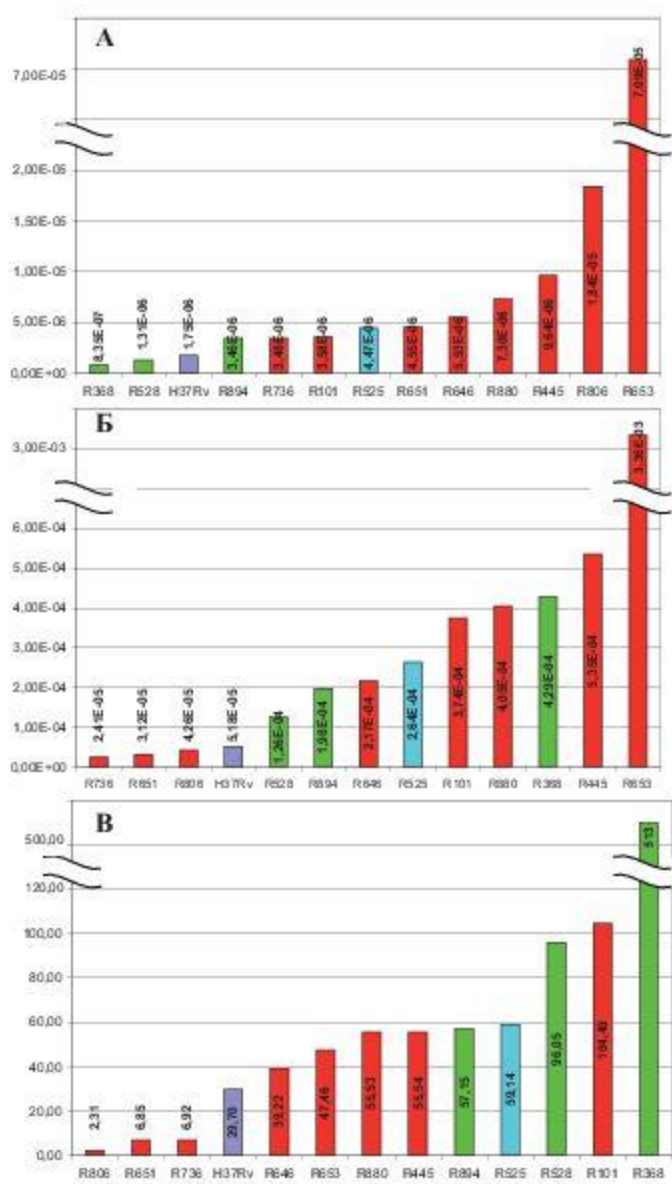
Рис. 1. Уровень экспрессии (OE) гена *icl* у штаммов *M. tuberculosis*, А: культивируемых *in vitro*; Б: фагоцитированных макрофагами; В: отношение уровней экспрессии гена в условиях *in vitro* и *ex vivo*

сии был у штамма AI-кластера R894 ($3,52 \times 10^{-4}$ OE) и BJ-кластера ($6,06 \times 10^{-4}$ OE). У двух других штаммов кластера W был более низкий уровень экспрессии $1,88 \times 10^{-4} - 1,94 \times 10^{-4}$, сходный с *M. tuberculosis* H37Rv ($2,08 \times 10^{-4}$ OE).

Экспрессия гена *hspX* *in vitro* существенно различалась между штаммами (минимальный от максимального отличался приблизительно в 85 раз). Минимальный уровень экспрессии гена был у штамма AI-кластера R368 ($8,35 \times 10^{-7}$ OE), а максимальный – у штамма W-кластера R653 ($7,09 \times 10^{-5}$ OE).

При этом уровень экспрессии *hspX* штаммов W-кластера превышал экспрессию всех 3 штаммов кластера AI и H37Rv. Штамм кластера BJ имел базовый уровень экспрессии гена *hspX* на том же уровне, что и некоторые штаммы кластера W.

Таким образом, штаммы W-кластера имели до-



■ - штамм кластера BJ; ■ - лабораторный штамм H37Rv

Рис. 2. Уровень экспрессии (OE) гена *hspX* у штаммов *M. tuberculosis*, А: культивируемых *in vitro*; Б: фагоцитированных макрофагами; В: отношение уровней экспрессии гена в условиях *in vitro* и *ex vivo*

статочно высокий уровень экспрессии гена *hspX* при культивировании *in vitro*. При этом для двух штаммов W-кластера выявлены максимальные значения экспрессии этого гена.

При проведении экспериментов *ex vivo* с помощью метода обратной транскрипции со специфическими праймерами было показано, что на 7-й день культивирования РНК микобактерии туберкулеза визуализировалась во всех образцах фагоцитированных микобактерий. Поскольку РНК присутствует только в живых клетках, тот факт, что РНК была получена из всех исследованных штаммов, свидетельствовал о том, что все *M. tuberculosis* были достаточно хорошо приспособленными к выживанию внутри МФ.

Уровень экспрессии гена *icl* *ex vivo* различался между штаммами не более чем в 30 раз, и

минимальный ($1,34 \times 10^{-3}$ OE) и максимальный ($3,74 \times 10^{-2}$ OE) уровни экспрессии были у штаммов W-кластера (рис. 1Б).

У штамма H37Rv был зафиксирован относительно низкий уровень экспрессии этого гена, в то время как у штаммов кластеров AI и BJ – более высокий. Штаммы W-кластера равномерно распределялись и имели как низкий, так средний и высокий уровень экспрессии гена *icl* при культивировании в МФ.

Экспрессия гена *hspX* *ex vivo* достаточно сильно различалась между штаммами (приблизительно в 140 раз), и минимальный уровень экспрессии гена был у штамма W-кластера R736 ($2,41 \times 10^{-5}$ OE), а максимальный – у штамма W-кластера R653 ($3,36 \times 10^{-3}$ OE) (рис. 2Б).

По результатам определения экспрессии *hspX* при культивировании в МФ видно, что штаммы W-кластера разделились на группы. В группу с более низким уровнем экспрессии ($2,41 \times 10^{-5}$ – $4,26 \times 10^{-5}$ OE) вошло 3 штамма (R736, R651, R806). Сходные значения экспрессии были у H37Rv ($5,18 \times 10^{-5}$ OE). Еще у 4 штаммов кластера W (R646, R101, R880, R445) регистрировался достаточно высокий уровень экспрессии ($2,17 \times 10^{-4}$ – $5,35 \times 10^{-4}$ OE). У одного штамма кластера W R653 фиксировался экстремально высокий ($3,36 \times 10^{-3}$ OE) уровень экспрессии этого гена.

Сравнение экспрессии генов *M. tuberculosis* в условиях *in vitro* и *ex vivo* показало, что уровень экспрессии гена *icl* при культивировании в МФ повышался по сравнению с базовым уровнем в 3-122 раза в зависимости от штамма (рис. 1В). Наименьшее изменение уровня экспрессии *icl* в МФ было у 2 штаммов W-кластера R806 (увеличение в 3 раза) и R736 (увеличение в 8 раз), имевших средний базовый уровень экспрессии *icl*, и наиболее низкие значения при культивировании в МФ. Максимальное увеличение (в 122 раза) было у штамма R368 AI-кластера, имевшего низкий базовый уровень экспрессии *icl*, который увеличился до высоких значений при культивировании штамма в МФ. Также достаточно большая разница в уровне экспрессии *icl* в МФ и без (в 82 раза) показана для штамма W-кластера R653, имевшего средний базовый уровень экспрессии *icl*, который в МФ становился самым высоким среди всех исследованных штаммов.

Повышение экспрессии гена *hspX* при культивировании *M. tuberculosis* в МФ по сравнению с ростом *in vitro* происходило в 2-514 раза в зависимости от штамма (рис. 2В).

Наименьшее изменение уровня экспрессии *hspX* в МФ (в 2-7 раз) было у 3 штаммов W-кластера (R651, R736, R806). Причем все эти штаммы имели средний (R651, R736) или высокий (R806) базовый уровень экспрессии *hspX*, а в МФ – относительно низкий уровень экспрессии. Максимальное увеличение экспрессии *hspX* в МФ по сравнению с базовым уровнем (в 514 раз) было показано для штамма

R368 AI-кластера, который характеризовался низким уровнем экспрессии *hspX* *in vitro*, но при попадании в МФ экспрессия достигала относительно высоких значений.

Таким образом, среди исследованных штаммов *M. tuberculosis* был выявлен полиморфизм по уровню экспрессии генов *icl* и *hspX* как при культивировании в среде, так и в МФ. При этом различия в уровне экспрессии генов были показаны как между штаммами разных кластеров, так и среди штаммов, относящихся к одному кластеру. У всех штаммов происходила индукция экспрессии обоих генов после фагоцитоза.

Показано, что по уровню экспрессии гена *icl* штаммы были достаточно однородны. Данный факт свидетельствует, что все исследованные штаммы при попадании в МФ были одинаково хорошо приспособлены для использования продуктов распада липидов фагосом в качестве субстрата для своей жизнедеятельности. У штаммов кластера W не выявлено каких-либо особенностей экспрессии гена *icl* в МФ и без МФ.

Разница в экспрессии гена *hspX*, являющегося маркером перехода в дормантное состояние, была более существенной – в 140 раз. Такая разница в уровне экспрессии может свидетельствовать о разной степени «склонности» штамма к переходу в нерепликативное состояние.

Для штаммов кластера W был показан более высокий базовый уровень экспрессии гена *hspX* по сравнению с изученными штаммами кластера AI и лабораторным штаммом H37Rv. Подобные результаты были получены M. B. Reed et al. В работе сравнивалась базовая экспрессия 5 генов DosR регулона, в том числе и *hspX*, у штаммов W-кластера и «не W»-штаммов, культивируемых на среде Middlebrook 7H9. Было продемонстрировано, что ряд штаммов *M. tuberculosis* W-Beijing имел базовый уровень транскрипции *hspX*, 50-кратно превышающий уровень транскрипции этого гена у «не-W»-штаммов. Авторы сделали предположение о том, что W-штаммы, обладающие конститутивной повышенной экспрессией генов, включенных в адаптивный ответ *M. tuberculosis* на гипоксию и промежуточные продукты реактивного азота, могут быть «преадаптированы» к внутриклеточному выживанию [15].

Полученные нами при культивировании *M. tuberculosis* в МФ результаты показали, что у ряда штаммов W-кластера уровень экспрессии *hspX* действительно повышался незначительно (в 2-7 раз по сравнению с базовым уровнем) и оказывался достаточным для выживания в МФ. Однако была выявлена еще одна группа штаммов W-кластера, которые после попадания в МФ существенно (в 39-100 раз) повышали и без того высокий базовый уровень экспрессии гена *hspX*, что могло свидетельствовать о тенденции к переходу в дормантность.

Следовательно, можно предположить, что

штаммы *M. tuberculosis* кластера W лучше приспособлены к условиям существования в клетках макроорганизма за счет конститутивного высокого уровня экспрессии *hspX* и имеют тенденцию к переходу в дормантность.

Обращает на себя внимание один из штаммов W-кластера – R653, имевший экстремально высокий базовый уровень *hspX* ($7,09 \times 10^{-5}$ ОЕ), который еще больше повышался в МФ, где также достигал наибольших величин ($3,36 \times 10^{-3}$ ОЕ). Этот штамм относился к субкластеру W148, который составляет приблизительно 30% от W-штаммов, циркулирующих на территории РФ (по сравнению с другими субкластерами W, частота встречаемости которых не превышает 6% от всех W) [1, 11]. На основании данных, полученных нами ранее в модели *in vivo*, для штамма этого субкластера были показаны низкая высеваемость из органов и малые патоморфологические изменения на ранних сроках инфицирования [3, 4]. Возможно, именно для этой группы штаммов кластера W характерен преимущественный переход в нерепликативное состояние при попадании в организм хозяина, что позволяет *M. tuberculosis* этой группы успешно распространяться среди человеческой популяции, избегая распознавания клетками иммунной системы.

Представлено первое описание феноменов, присутствующих у штаммов *M. tuberculosis* кластера W. Выявленная конститутивная повышенная экспрессия гена *hspX*, входящего в «регулон дормантности», возможно, дает этим штаммам ряд преимуществ, особенно на ранних стадиях инфекции, что может помочь в объяснении эпидемиологических особенностей, характерных для штаммов кластера W-Beijing.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреевская С. Н., Черноусова Л. Н., Смирнова Т. Г. и др. Трансмиссия штаммов микобактерий туберкулеза, обусловленная миграционными процессами в Российской Федерации (на примере миграции населения из кавказского региона в Москву и Московскую область) // Пробл. туб. – 2006. – № 1. – С. 29-35.
2. Андреевская С. Н., Черноусова Л. Н., Смирнова Т. Г. и др. Изучение *ex vivo* роста в макрофагах штаммов *Mycobacterium tuberculosis* разных генотипических кластеров // Пробл. туб. – 2006. – № 12. – С. 43-48.
3. Андреевская С. Н., Черноусова Л. Н., Смирнова Т. Г. и др. Влияние генотипа *M. tuberculosis* на выживаемость мышей при экспериментальном туберкулезе // Пробл. туб. – 2007. – № 7. – С. 45-50.
4. Черноусова Л. Н., Андреевская С. Н., Смирнова Т. Г. и др. Биологические свойства штаммов *M. tuberculosis* W-кластера // Пробл. туб. – 2008. – № 10. – С. 45-50.
5. Bifani P. J., Mathema B., Kurepina N. E. и др. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains // Trends Microbiol. – 2002. – Vol. 10. – P. 45-52.
6. Cole S. T., Brosch R., Parkhill J. et al. // Nature (London). – 1998. – Vol. 393. – P. 537-544.
7. Cunningham A. F., Spreadbury C. L. Mycobacterial stationary phase induced by low oxygen tension: cell wall thickening and localization of the 16-kilodalton α -crystallin homolog // J. Bacteriol. – 1998. – Vol. 180. – P. 801-808.
8. Garbe T. R., Hibler N. S., Deretic V. Response to reactive nitrogen intermediates in *Mycobacterium tuberculosis*: induction of the 16-kilodalton α -crystallin homolog by exposure to nitric oxide donors // Infect. Immun. – 1999. – Vol. 67. – P. 460-465.
9. Glynn J. R., Whiteley J., Bifani P. J. et al. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review // Emerg. Infect. Dis. – 2002. – Vol. 12. – P. 843-849.
10. Hu Y., Coates A. R. M. Transcription of the stationary-phase-associated *hspX* gene of *Mycobacterium tuberculosis* is inversely related to synthesis of the 16-kilodalton protein // J. Bacteriol. – 1999. – Vol. 181. – P. 1380-1387.
11. Khomenko A. G., Chernousova L. N., Kurepina N. E. et al. Molecular fingerprint *M. tuberculosis* from Russia TB patients // Int. J. Tub. Lung Dis. – 1998. – Vol. 11, № 2. – P. 280.
12. Kornberg H. L. Anapleurotic sequences and their role in metabolism // Essays Biochem. – 1966. – Vol. 2. – P. 1-31.
13. Mokrousov I., Ly H. M., Otten T. et al. Origin and primary dispersal of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: clues from human phylogeography // Genome Res. – 2005. – Vol. 15. – P. 1357-1364.
14. Nathan C. Inducible nitric oxide synthase in the tuberculous human lung // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2002. – Vol. 166. – P. 130-131.
15. Reed M. B., Gagneux S., Deriemer K. et al. The W-Beijing lineage of *Mycobacterium tuberculosis* overproduces triglycerides and Has the DosR dormancy regulon constitutively unregulated // J. Bact. – 2007. – Vol. 189, № 7. – P. 2583-2589.
16. Sherman D. R., Voskuil M., Schnappinger D. et al. Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* hypoxic response gene encoding alpha-crystallin // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – Vol. 98. – P. 7534-7539.
17. van Embden J. D., Cave M. D., Crawford J. T. et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology // J. Clin. Microbiol. – 1993. – Vol. 31, № 2. – P. 406-409.
18. van Soolingen D., Qian L., de Haas P. E. et al. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of East Asia // J. Clin. Microbiol. – 1995. – Vol. 33. – P. 3234-3238.
19. Voskuil M. I., Schnappinger D., Visconti K. C. et al. Inhibition of respiration by nitric oxide induces a *Mycobacterium tuberculosis* dormancy program // J. Exp. Med. – 2003. – Vol. 198. – P. 705-713.
20. Yuan Y., Crane D. D., Barry C. E., III. Stationary phase-associated protein expression in *Mycobacterium tuberculosis*: function of the mycobacterial α -crystallin homolog // J. Bacteriol. – 1996. – Vol. 178. – P. 4484-4492.
21. Yuan Y., Crane D. D., Simpson R. M. et al. The 16-kDa α -crystallin (Acr) protein of *Mycobacterium tuberculosis* is required for the growth in macrophages // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1998. – Vol. 95. – P. 9578-9583.
22. Zhang M., Gong J., Yang Z., Samten B. et al. Enhanced Capacity of a Widespread Strain of *Mycobacterium tuberculosis* to Grow in Human Macrophages // J. Infect. Dis. – 1999. – Vol. 179. – P. 1213-1217.

ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

Андреевская Софья Николаевна

ФГБУ «Центральный НИИ туберкулеза» РАМН,
кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник,
107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2.
Тел. 8 (499) 785-90-91.
E-mail andsofia@mail.ru

ЛЕВОФЛОРИПИН®

Оригинальная комбинация –
универсальное решение



**Новый комбинированный
противотуберкулезный препарат -
гарантия успеха в лечении
лекарственно устойчивых
форм туберкулеза**

Открытое акционерное общество
"Химико-фармацевтический комбинат "АКРИХИН",
142450, Московская область, Ногинский район, г. Старая Купавна, ул. Кирова, 29.
Тел. (495) 702-95-064, факс: (495) 702-95-03

