

Эффективность применения векторной вакцины Flu/ESAT-6 в схеме комплексной терапии лекарственно-чувствительного и лекарственно-устойчивого экспериментального туберкулеза

Н.В. Заболотных¹, Т.И. Виноградова¹, М.З. Догонадзе¹, М.Л. Витовская¹,
Б.М. Ариэль¹, К.А. Васильев², А.-П.С. Шурыгина², Ж.В. Бузицкая², М.А. Стукова²

¹ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии

² Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург

Vector vaccine Flu/ESAT-6 application in the regimen of complex therapy of drug-sensitive and drug-resistant experimental tuberculosis estimation of the efficiency

N. Zabolotnykh¹, T. Vinogradova¹, M. Dogonadze¹, M. Vitovskaya¹, B. Ariel¹,
K. Vasilyev², A.-P. Shurygina², Zh. Buzitskaya², M. Stukova²

¹ St. Petersburg State Research Institute of Phthisiopulmonology

² Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg

© Коллектив авторов, 2020 г.

Резюме

Неуклонный рост частоты случаев туберкулеза с лекарственной устойчивостью, характеризующегося низкой эффективностью терапии, требует разработки инновационных подходов к лечению этой инфекции. Одним из них является вакциноterapia, обладающая иммуностимулирующей активностью и способная корректировать дисфункцию иммунной системы при данной форме инфекции. Целью данного исследования является изучение эффективности включения в схему комплексного лечения экспериментального туберкулеза легких муккозальной векторной вакцины Flu/ESAT-6. Мышей линии C57BL/6 внутривенно инфицировали лекарственно-чувствительным (ЛЧ) (*M. tuberculosis H37Rv*) или клиническим лекарственно-устойчивым (ЛУ) (*M. tuberculosis* генотипа *Beijing*) штаммами МБТ. Терапия ЛЧ инфекции включала два (HR), ЛУ туберкулеза — четыре противотуберкулезных препарата (AETppBq). Вакцину Flu/ESAT-6

на основе аттенуированного штамма вируса гриппа А, экспрессирующего микобактериальный белок ESAT-6, вводили интраназально в дозе 6 Ig/мышь. Оценку эффективности различных схем терапии проводили с использованием биометрических, бактериологических и гистологических методов. Выбраны оптимальные схемы введения Flu/ESAT-6: при ЛЧ инфекции — в начале курса химиотерапии двукратно с интервалом 3 нед; при ЛУ туберкулезе — через 2 нед от начала курса терапии троекратно с интервалом 4 нед. Включение Flu/ESAT-6 в схему противотуберкулезного лечения привело к существенному повышению эффективности терапии при обеих формах инфекции, что выразилось в: (i) снижении бактериальной нагрузки в легких по окончании 2-месячного курса терапии при ЛЧ туберкулезе на 1,83 Ig КОЕ; через 4 мес лечения при ЛУ туберкулезе — на 0,93 Ig КОЕ; (ii) уменьшении распространенности специфического воспаления и степени выраженности

экссудативного, а при ЛУ туберкулезе и альтеративного компонентов; (iii) стимуляции лимфоидной составляющей клеточного иммунного ответа легких, зафиксированной по перестройке клеточного состава гранулем на лимфоидный, и по образованию перибронхиальных лимфогистиоцитарных инфильтратов. Таким образом, терапевтическая иммунизация вакциной Flu/ESAT-6 существенно повышает эффективность лечения экспериментального туберкулеза и способна сократить сроки противотуберкулезной терапии, что особенно важно для ЛУ туберкулеза, характеризующегося замедленной инволюцией специфического воспаления.

Ключевые слова: векторная вакцина, *M. tuberculosis* генотипа *Beijing*, иммунотерапия, специфическое воспаление

Summary

The steady growth of drug-resistant tuberculosis, characterized by low therapeutic efficacy, requires the development of innovative approaches to the treatment of this infection. One of such approaches is vaccine therapy that has immunostimulating activity and is capable to correct dysfunction of the immune system in this infection. In this study, the authors aimed to estimate the efficacy of the mucosal vector vaccine Flu/ESAT-6 included into the complex therapy of experimental pulmonary tuberculosis. C57BL/6 mice were intravenously infected with drug-susceptible (DS) (*M. tuberculosis* H37Rv) or drug-resistant (DR) (*M. tuberculosis Beijing* genotype) MBT strains. DS-infection was treated with two anti-TB drugs (HR), and

DR-infection with four (AETppBq). Flu/ESAT-6 vaccine based on the attenuated influenza A virus strain expressing the mycobacterial protein ESAT-6 was administered intranasally at a dose of 6 lg/mouse. Efficacy of various therapeutic regimens was assessed with biometric, bacteriological, and histological methods. Two optimal therapeutic regimens of Flu/ESAT-6 administration were chosen: twice (with a 3 week interval) at the beginning of chemotherapy in case of DS infection; and thrice (with a 4 week interval) 2 weeks after the beginning of chemotherapy in case of DR infection. Flu/ESAT-6 addition to the anti-tuberculosis treatment led to a significant increase in the efficacy of therapy for both forms of infection which manifested in (i) the pulmonary bacterial load decrease at the end of a 2-months therapy of DS tuberculosis by 1.83 lg CFU; and after 4-months therapy of DR tuberculosis by 0.93 lg CFU; (ii) decrease in the prevalence of specific and the severity of exudative inflammation, and reduction of alternative components in case of DR tuberculosis; (iii) stimulation of the lymphoid component of the cellular immune response in lungs, demonstrated by reorganization of granulomas' cellular composition to lymphoid type, and in the formation of peribronchial lymphohistiocytic infiltrates. Thus, therapeutic immunization with Flu/ESAT-6 vaccine significantly increases the efficacy of experimental tuberculosis therapy and can shorten the duration of anti-tuberculosis therapy which is especially important in case of DR tuberculosis characterized by a slow involution of specific inflammation.

Keywords: vector vaccine, *M. tuberculosis*, *Beijing* genotype, immunotherapy, specific inflammation

Введение

Отчетливый рост туберкулеза с множественной и широкой лекарственной устойчивостью (МЛУ/ШЛУ) свидетельствует о назревшей необходимости решения проблемы терапии этих форм инфекции, все больше распространяющихся даже в развитых странах [1]. Терапия МЛУ/ШЛУ туберкулеза отличается сложностью и высокой затратностью, поскольку устойчивость МБТ обычно регистрируется к основным, наиболее эффективным противотуберкулезным препаратам [2]. Часто лекарственно-устойчивый туберкулез переходит в хронические формы с сохранением нереплицирующихся микобактерий, что неизбежно ведет к рецидивам инфекции [3–5]. Нарушения иммунного ответа при лекарственно-устойчивом туберкулезе обусловлены как индукцией дисфункции Т-клеток персистирующими микобактериями, вызывающей затяжное течение и хронизацию

туберкулезного процесса [6], так и иммунодепрессивным эффектом противотуберкулезных препаратов при массивной, длительной полихимиотерапии, необходимой при полирезистентном туберкулезе [7]. Одним из возможных путей решения этой проблемы является стимуляция иммунной системы макроорганизма.

В последние годы противотуберкулезные вакцинные кандидаты, наряду с изучением их эффективности в схемах профилактической вакцинации, исследуют и в режиме терапевтической иммунизации. При экспериментальном лекарственно-чувствительном туберкулезе показано, что специфическая терапевтическая иммунизация может способствовать сокращению длительности этиотропной терапии [8], а также обеспечить ускоренную иммунную защиту при повторной встрече организма с МБТ, что чрезвычайно важно для предотвращения реактивации туберкулеза [9, 10].

В нашем исследовании в качестве иммунотерапевтического средства использовали вакцину на основе аттенуированного гриппозного вектора, экспрессирующего микобактериальный антиген ESAT-6 (Flu/ESAT-6). Иммуномодулирующая способность вакцины во многом обусловлена свойствами самого гриппозного вектора, сконструированного на основе штаммов вируса гриппа А с модифицированным геномом NS. Показано, что мутанты вируса гриппа по гену NS в зоне вирусной репликации вызывают продукцию широкого спектра провоспалительных цитокинов, способствующих развитию полноценного системного иммунного ответа с поляризацией в сторону Th-1 звена [11].

Цель исследования

Целью данного исследования является изучение эффективности применения вакцины Flu/ESAT-6, показавшей протективный эффект и активирующее действие на Th1 иммунитет при профилактике инфекции, для специфической иммунотерапии экспериментального туберкулеза, вызванного микобактериями с различной лекарственной чувствительностью.

Материалы и методы исследования

Лабораторные животные. Исследование проведено на 233 мышах линии C57BL/6 массой 16–18 г, полученных из питомника «Андреевка» — филиала ФГБУ «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА, согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 266 МЗ РФ от 19.06.2003).

Инфицирование и иммунизация мышей. Лекарственно-чувствительный туберкулез у мышей C57BL/6 ($n=73$) моделировали введением в латеральную хвостовую вену 1×10^6 КОЕ суспензии трехнедельного штамма *M. tuberculosis H37Rv*, лекарственно-устойчивый ($n=160$, 2 серии опытов) — инокуляцией клинического штамма 558 *M. tuberculosis* генотипа *Beijing* (из коллекции ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России) с резистентностью к четырем противотуберкулезным препаратам: изониазиду, рифампицину, стрептомицину и пипразинамиду. Терапия в каждой из 3 серий опытов начиналась после визуализации у инфицированных животных при пробных вскрытиях множественных субмилиарных либо единичных милиарных очагов специфического воспаления в легких и проводилась с учетом спектра ЛЧ МБТ. Противотуберкулезная терапия лекарственно-чувствительного туберкулеза включала изониазид 10 мг/кг (H) + рифампицин 10 мг/кг (R), лекарственно-устойчивого — амикацин 30 мг/кг (A), этамбутол 20 мг/кг (E), бедаквилин 14 мг/кг (Bq) и тиоуреидоиминометилпиридиния перхлорат 12 мг/кг (перхлорон, Trp). Вакциноterapia

аттенуированным рекомбинантным штаммом вируса гриппа А, экспрессирующим микобактериальный белок ESAT-6 (Flu/ESAT-6, интраназально, ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России), проводилась по разным схемам в каждом опыте. Контролем вакцинотерапии служили зараженные нелееченные мыши и мыши, получавшие только ПТП (контроль терапии).

Оценка эффективности вакцинотерапии. Результативность вакцинотерапии определялась по окончании курса этиотропной терапии (2,5-месячного при лекарственно-чувствительной и 4-месячного при лекарственно-устойчивой инфекции) по летальности мышей; макроскопической оценке пораженности легких, высеваемости *M. tuberculosis* из легких и по результатам гистологического исследования легких. Для гистологического изучения легкие фиксировали в 10% нейтральном формалине, заливали в целлоидин-парафин-масло, срезы окрашивали гематоксилином и эозином. При бактериологическом исследовании осуществляли дозированный посев гомогенатов легких и селезенки на плотную яичную среду Левенштейна–Йенсена методом серийных разведений. Нижняя граница чувствительности метода — 2×10^3 колониеобразующих единиц (КОЕ). Массивность роста МБТ выражали в десятичных \log (lg) от числа КОЕ на массу легких.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием параметрического критерия Стьюдента, ANOVA теста множественных сравнений Тьюки, точного метода Фишера (*Fisher's exact test*) и логарифмического рангового критерия (*Log Rank test*).

Результаты исследования

По результатам эксперимента на мышах с лекарственно-чувствительным туберкулезом, в котором 2,5 курс терапии HR снизил по сравнению с нелечеными животными интегральный показатель эффективности лечения — обсемененность легких МБТ на 3,38 lg числа жизнеспособных бактерий ($p < 0,001$), дополнительная иммунизация мышей Flu/ESAT-6 значительно ($p < 0,001$) уменьшила бактериальную нагрузку еще на 1,8 lg числа жизнеспособных бактерий (рис. 1). При этом в разных режимах назначения Flu/ESAT-6 (интраназально, двукратно, с 3-недельным интервалом в начале терапии либо через месяц от назначения ПТП) ни в одном из посевов гомогенатов легких микобактерий не обнаружено, тогда как у мышей группы контроля лечения рост МБТ из гомогенатов легких отмечен в 3 из 6 случаев (50%).

Гистологическое исследование легких мышей с лекарственно-чувствительной инфекцией показало преимущество терапии с введением Flu/ESAT-6 в начале курса ПТП даже на фоне относительно не

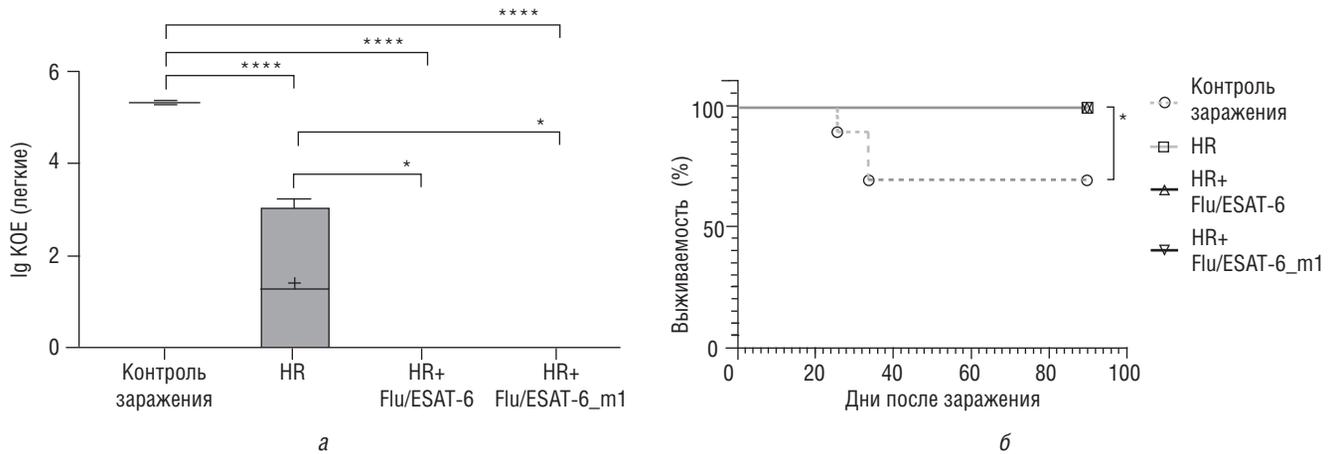


Рис. 1. Показатели тяжести течения лекарственно-чувствительного туберкулеза у мышей C57BL/6. HR+Flu/ESAT-6 — двукратное введение вакцины в начале терапии, HR+Flu/ESAT-6_m1 — двукратное введение вакцины через месяц от назначения ПТП: *а* — высеваемость *M. tuberculosis H37Rv* из легких через 2,5 мес терапии; * $p=0,0247$; **** $p<0,0001$ (ANOVA тест множественных сравнений Тьюки); *б* — динамика выживаемости; достоверность различий между группами рассчитывалась по Log Rank test (* $p=0,0105$)

распространенного по сравнению с нелечеными зараженными животными (рис. 2, *а, б*) поражения легких, обеспеченного 2,5-месячным курсом HR (рис. 2, *в*). При этом у мышей, получавших иммунотерапию в начале курса лечения, значимо реже регистрировались даже небольшие очаги инфильтрации площадью 2–6 альвеол ($p<0,001$) и крупные гранулемы ($p<0,02$), а специфическая воспалительная реакция в легких проявилась только в виде инфильтрации межальвеолярных перегородок лимфоцитами, макрофагами и единичными эпителиоидными клеткам (рис. 2, *д*). Гранулемы, в отличие от мышей, получавших только HR (рис. 2, *з*), не содержали эпителиоидных клеток и состояли только из лимфоцитов (рис. 2, *е*). Более сильной, чем в контроле терапии, была и лимфогистиоцитарная инфильтрация легких, которая отмечалась не только периартериально, но и перибронхиально

(рис. 2, *д, е*). У мышей с назначением Flu/ESAT-6 через 1 мес от начала курса ПТП значимых различий с контролем лечения в характеристиках специфического поражения легких отмечено не было.

Результативность терапевтической вакцинации Flu/ESAT-6 при лекарственно-устойчивом туберкулезе оценивалась в нескольких сериях опытов.

В тех сериях, где вакцина назначалась двукратно в начале этиотропной терапии либо через месяц от ее начала, при введении Flu/ESAT-6 отмечено некоторое снижение бактериальной нагрузки легких, однако оно составило менее 0,5 lg числа жизнеспособных бактерий и было незначимым (данные не приводятся).

Существенное влияние иммунотерапии Flu/ESAT-6 на течение лекарственно-устойчивой инфекции, моделированной высоковирулентным клиническим штаммом из семейства *Beijing*, получено при троекратном

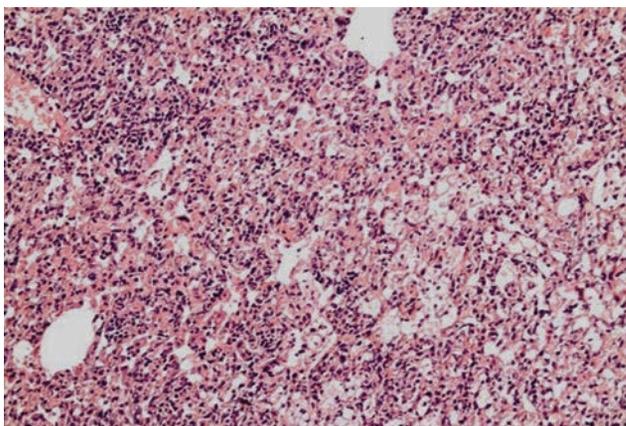
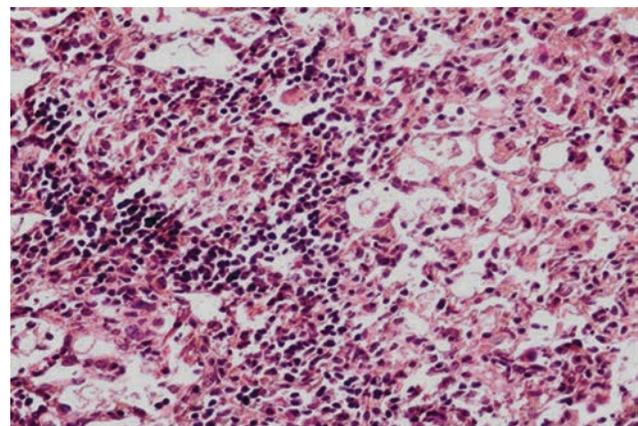
*а**б*

Рис. 2. Репрезентативные микрофотографии гистологических срезов легких зараженных *M. tuberculosis H37Rv* мышей через 2,5 мес от начала терапии. Крупные сливающиеся очаги специфической инфильтрации без четкой пространственной ориентации клеток (*а*) и преимущественно эпителиоидноклеточная гранулема (*б*) в легких зараженных не леченных мышей. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 300$ (*а, в, д*) и $\times 600$ (*б, г, е*)

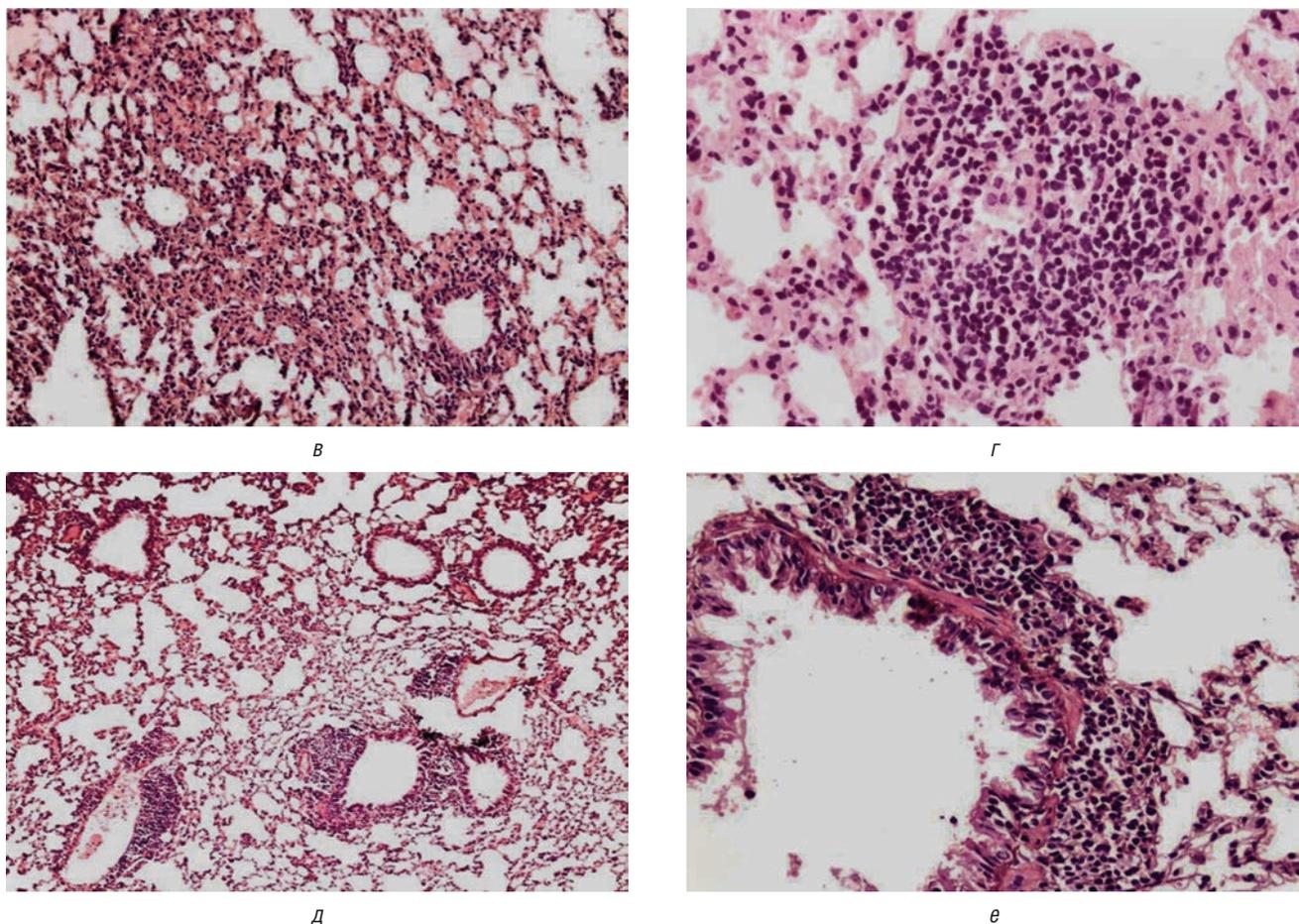


Рис. 2. Окончание. Репрезентативные микрофотографии гистологических срезов легких зараженных *M. tuberculosis* H37Rv мышей через 2,5 мес от начала терапии. Небольшие участки инфильтрации (а) и крупная гранулема с небольшим скоплением эпителиоидных клеток (б) в легких мышей, получавших терапию HR; в — утолщение межальвеолярных перегородок и выраженная лимфогистиоцитарная инфильтрация в легких мышей, леченной HR+Flu/ESAT-6; г — лимфоидные перибронхиальные гранулемы у мыши, леченной HR+Flu/ESAT-6. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 300$ (а, в, д) и $\times 600$ (б, г, е)

введении вакцины на фоне лечения четырьмя противотуберкулезными препаратами (АЕТррВq).

При этом необходимо обратить внимание на замедленность инволюции лекарственно-устойчивого туберкулеза у мышей под действием терапии ПТП, подобранной с учетом спектра ЛЧ штамма МБТ и в соответствии с Национальными клиническими рекомендациями (2015). Так, 4-месячный курс АЕТррВq привел к снижению бактериальной нагрузки в легких животных только на 1,33 Ig КОЕ (рис. 3, а); при этом летальность мышей значительно уменьшилась с 70% у нелеченных мышей до 6,7% ($p=0,0105$, рис. 3, б), а поражение легких оставалось выраженным.

При гистологической оценке срезов легких в 50% случаев (у нелеченных мышей — в 100% случаев, рис. 4, а) в группе контроля терапии (HR) были выявлены сливные очаги инфильтрации без четкой пространственной ориентации клеток, в 50% остальных — не крупные с большим количеством пенистых макрофагов (рис. 4, д). У мышей, леченных только противотубер-

кулезными препаратами, сохранились и признаки альтерации (нейтрофильные лейкоциты), а в одном случае (у нелеченных мышей — в 50%, рис. 4, в) зафиксированы даже крупные очаги некроза в стадии организации (рис. 4, з). У всех мышей контроля терапии, как и у контроля заражения, отмечались крупные эпителиоидноклеточные гранулемы, что также указывает на сохраняющуюся активность воспалительного процесса.

Троекратная иммунизация Flu/ESAT-6 (4-недельный интервал), начатая через 2 нед от начала курса АЕТррВq, через 4 мес лечения значительно повысила эффективность терапии по клиренсу легких от МБТ (на 0,93 Ig КОЕ, $p<0,02$) в отличие от двукратной, проведенной на тех же сроках, но снизившей бактериовыделение только на 0,33 Ig КОЕ (рис. 3, а). Анализ пораженности ткани легких подтвердил результативность троекратной иммунотерапии Flu/ESAT-6. У троекратно иммунизированных Flu/ESAT-6 мышей в отличие от контроля терапии во всех случаях регистрировались только небольшие участки инфильтрации (рис. 4, ж), в их клеточном

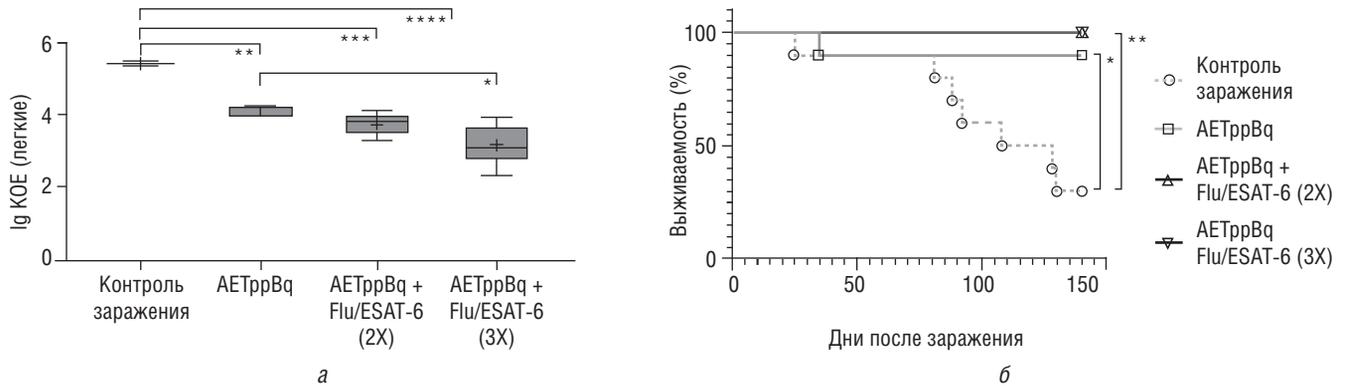


Рис. 3. Показатели тяжести течения лекарственно-устойчивого туберкулеза у мышей C57BL/6. АЕТppBq+ Flu/ESAT-6 (2X) — двукратное введение вакцины через 2 нед от начала курса ПТП, АЕТppBq +Flu/ESAT-6 (3X) — троекратное введение вакцины через 2 нед от начала курса ПТП: а — выживаемость *M. tuberculosis Beijing* из легких через 4 мес терапии; ** $p=0,0025$; *** $p=0,0002$; **** $p<0,0001$ (ANOVA тест множественных сравнений Тьюки); б — динамика выживаемости. Достоверность различий между группами рассчитывалась по Log Rank test (* $p=0,0105$; ** $p=0,0011$)

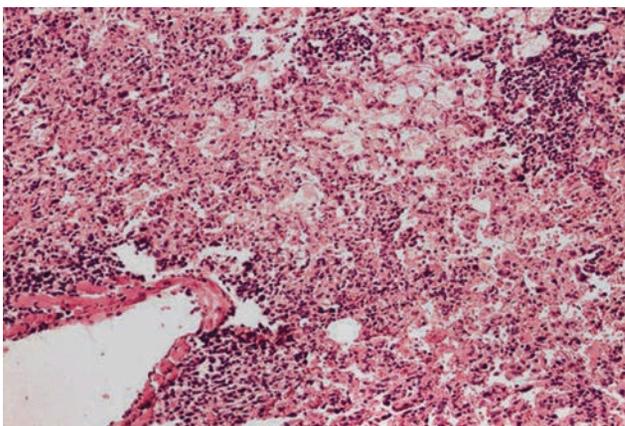
составе не обнаружено пенистых макрофагов и показателей активности альтерации — нейтрофильных гранулоцитов. Гранулемы у мышей, троекратно леченных Flu/ESAT-6, были не крупными, имели лимфоидный характер (рис. 4, з), в то время как в контроле терапии значимо чаще ($p=0,005$) регистрировали крупные гранулемы, и все гранулемы содержали скопления эпителиоидных клеток (рис. 4, е). У троекратно иммунизированных Flu/ESAT-6 мышей обнаружено также усиление перибронхиальной лимфогистиоцитарной инфильтрации, не отмеченной в контроле терапии ($p=0,005$), где крупные лимфогистиоцитарные инфильтраты выявлены только периваскулярно.

Обсуждение результатов

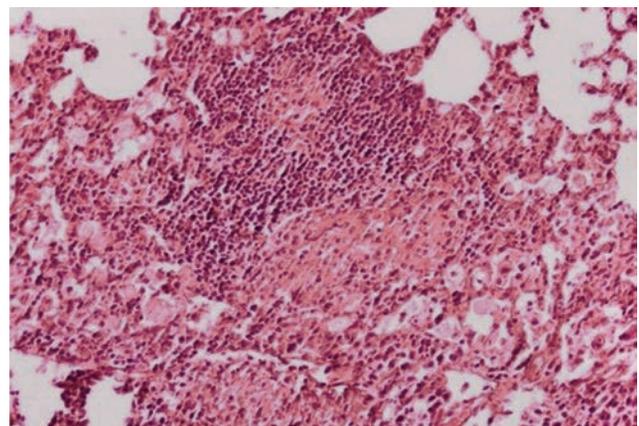
Проблема терапии туберкулеза с множественной и широкой лекарственной устойчивостью за счет неуклонной распространенности этих форм инфекции и

низкой эффективности их лечения становится одной из ключевых проблем в заявленной ВОЗ стратегии ликвидации туберкулеза к 2035 г. [4]. Эффективность лечения таких больных во всех странах не превышает 54% для туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью и 30% для туберкулеза с широкой лекарственной устойчивостью [2].

В нашем исследовании также зарегистрирована недостаточная эффективность этиотропной терапии лекарственно-устойчивого туберкулеза у мышей, инфицированных *M. tuberculosis* генотипа *Beijing*. В то время как при моделировании лекарственно-чувствительной инфекции, где использован вирулентный штамм *M. tuberculosis H37Rv*, после 2,5-месячного курса специфической химиотерапии отмечено снижение бактериальной нагрузки по сравнению с нелеченными животными на 3,38 Ig KOE, у мышей, инфицированных *M. tuberculosis Beijing*, 4-месячный курс лечения противотуберкулезными препаратами



а



б

Рис. 4. Репрезентативные микрофотографии гистологических срезов легких мышей C57BL/6 на 140-й день после инфицирования клиническим штаммом *M. tuberculosis* генотипа *Beijing*. Крупный сливной очаг специфической инфильтрации без четкой пространственной ориентации клеток (а), крупная преимущественно эпителиоидноклеточная гранулема (б) в легких зараженной не леченной мыши

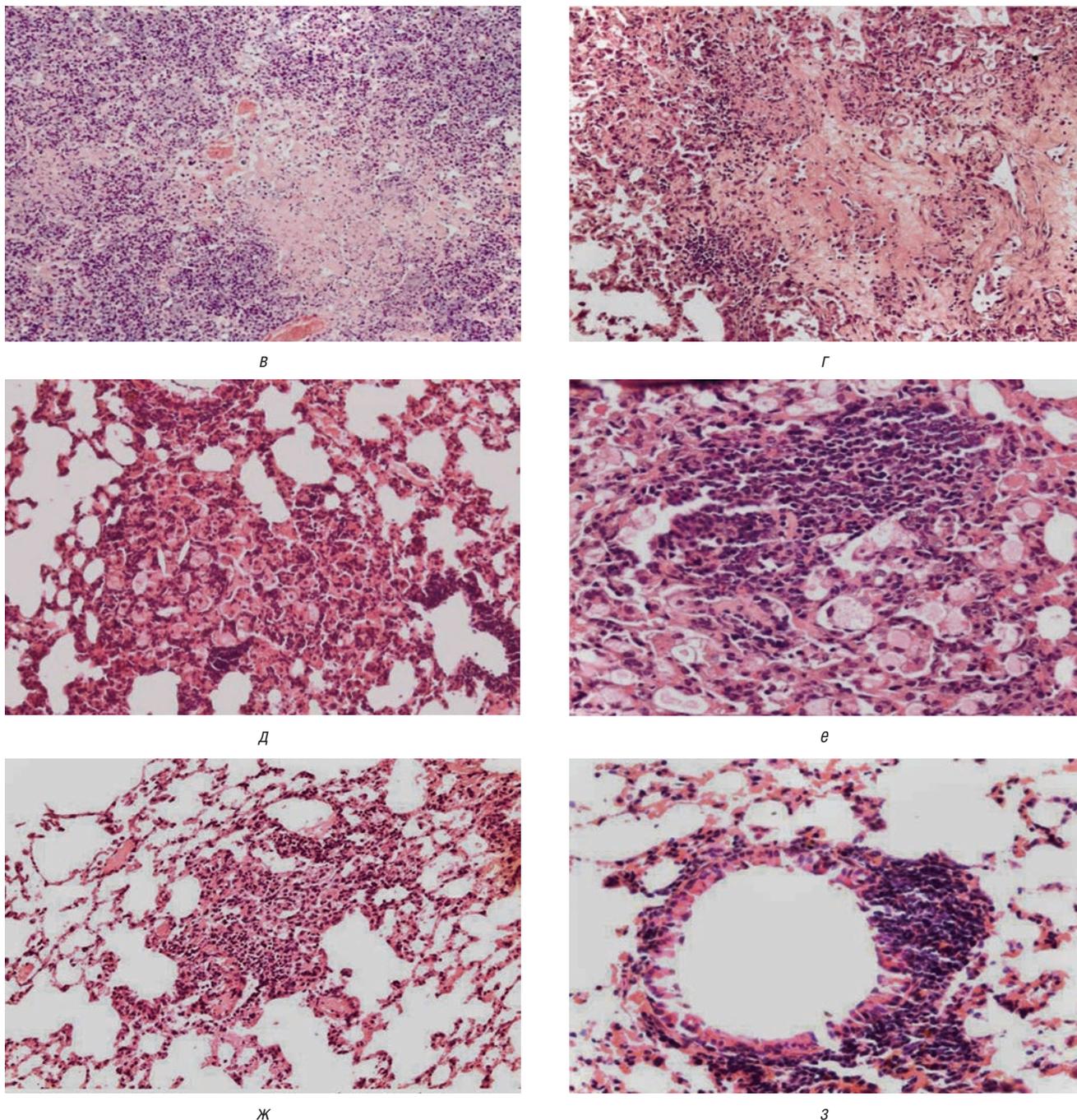


Рис. 4. Окончание. Крупный очаг некроза (а) в легких зараженной нелеченной мыши; очаг некроза в стадии организации (б), очаг специфической инфильтрации (в) и гранулема с небольшим скоплением эпителиоидных клеток (д) в легких мышей, леченных только противотуберкулезными препаратами в течение 4 мес; небольшой участок специфической инфильтрации (е) и лимфоидная перибронхиальная гранулема (з) в легких мышей, троекратно иммунизированных Flu/ESAT-6 через 2 нед от начала противотуберкулезной терапии. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 300$ (а-д, ж), $\times 600$ (е, з)

уменьшил бактериовыделение из легких лишь на 1,33 Ig КОЕ. При этом необходимо отметить, что в состав противотуберкулезной терапии (АЕТррВq), подобранной с учетом чувствительности МБТ, входили бедаквилин и тиоуреидоиминометилпиридиния перхлорат (перхлозон), которые относятся к новому поколению противотуберкулезных препаратов, существенно по-

вышающих эффективность лечения больных лекарственно-устойчивым туберкулезом [12].

Одним из возможных путей решения проблемы низкой эффективности терапии лекарственно-устойчивого туберкулеза является стимуляция иммунной системы макроорганизма. Нарушения иммунного ответа при МЛУ/ШЛУ обусловлены как индукцией дис-

функции Т-клеток персистирующими микобактериями, вызывающими затяжное течение и хронизацию туберкулезного процесса [6], так и иммунодепрессивным эффектом противотуберкулезных препаратов при массивной, длительной полихимиотерапии, необходимой при полирезистентном туберкулезе [7]. Перспективность использования вакцинотерапии в лечении инфекции в качестве иммунотерапевтических средств показана на экспериментальной модели лекарственно-чувствительного туберкулеза [8–10, 13].

В нашем исследовании векторная вакцина, экспрессирующая ESAT-6 (Flu/ESAT-6), повысила эффективность этиотропной терапии как при лекарственно-чувствительной, так и при лекарственно-устойчивой форме инфекции. При этом выявлена зависимость эффекта вакцинации от схемы иммунизации и определены оптимальные режимы введения вакцины. Степень снижения бактериальной нагрузки в легких под действием терапии Flu/ESAT-6 в оптимальной схеме была значимой и составила при инфицировании мышью *M. tuberculosis H37Rv* — на 1,8 Ig КОЕ, а при лекарственно-устойчивом туберкулезе — на 0,93 Ig КОЕ. Для терапии лекарственно-устойчивого туберкулеза, где уменьшение МБТ за 4-месячный курс терапии составило лишь 1,33 Ig КОЕ, такой прирост эффективности можно считать весьма существенным.

При обеих формах инфекции оптимальные схемы применения иммунотерапии Flu/ESAT-6 на тех же сроках, что и повышение клиренса легких от МБТ, привели к стимуляции лимфоидной составляющей клеточного иммунного ответа легких, зафиксированной по перестройке клеточного состава гранулем на лимфоидный и по образованию перибронхиальных лимфогистиоцитарных инфильтратов. Также отмечено уменьшение распространенности специфического воспаления, выраженности экссудативного, а при лекарственно-устойчивом туберкулезе и альтеративного его компонентов под действием иммунизации.

Характеристики клеточного состава очагов специфической инфильтрации и гранулем непосредственно связаны со стадиями развития и инволюции туберкулезной инфекции [14]. В нашем исследовании у нелеченных инфицированных как *M. tuberculosis H37Rv*, так и *M. tuberculosis* генотипа *Beijing* мышей на фоне распространенной сливной инфильтрации (на обеих моделях) с очагами некроза (при лекарственно-устойчивом туберкулезе) зарегистрированы крупные гранулемы со скоплениями эпителиоидных клеток (преимущественно эпителиоидно-клеточные гранулемы), что полностью соответствует представлениям о гранулеме при прогрессирующей инфекции как о структуре, способствующей межклеточному распространению микобактерий, предоставляющей им возможность для расширения инфекционной ниши [14–

16]. Длительная антибактериальная терапия на обеих моделях параллельно снижению площади воспаления обеспечила уменьшение размеров гранулем, увеличение зоны скопления лимфоцитов и, соответственно, уменьшение очаговых скопления эпителиоидных клеток, то есть смещение клеточного баланса в сторону защитных процессов, характерных для гранулемы при инволюции туберкулеза [17]. В то же время остающиеся в составе гранулем эпителиоидные клетки указывают на недостаточную эффективность иммунного ответа и сохранение резервуара внутриклеточной инфекции [18]. Регистрация в клеточном составе очагов инфильтрации в этой группе мышей большого количества пенистых макрофагов позволяет предположить хронизацию инфекции после 4 мес лечения только противотуберкулезными препаратами. Показано, что именно в пенистых макрофагах за счет дисрегуляции метаболизма липидов вследствие влияния МБТ на фермент acyl CoA:cholesterol ацилтрансферазу (ACAT) образуется сплав между микобактериесодержащими фагосомами и телами липида, что позволяет возбудителю переключиться в дормантное состояние и обеспечивает защиту от бактерицидных механизмов дыхательного взрыва [19].

Отсутствие у мышей, получавших Flu/ESAT-6, эпителиоидных клеток в гранулемах и пенистых макрофагов в инфильтратах подтверждает эффективность иммунотерапии по очищению легких от возбудителя, а лимфоидный характер гранулем и стимуляция образования перибронхиальных лимфогистиоцитарных инфильтратов (индуцибельной лимфатической ткани — iBALT) отражают стимуляцию клеточного компонента местного иммунитета легких и по некоторым данным непосредственно связаны с эффектом иммунизации и со снижением активности туберкулезной инфекции под влиянием иммунотерапии [8].

Иммуностимулирующие свойства Flu/ESAT-6 обусловлены формированием при введении вакцины выраженного антиген-специфического Тх-1 клеточного ответа на системном уровне [20] и иммуноадьювантными свойствами самого гриппозного вектора, что позволило Flu/ESAT-6 обеспечить протективный эффект при профилактической вакцинации экспериментального туберкулеза [21]. Кроме того, за счет интраназального введения гриппозные векторы, как и все мукозальные вакцины, обеспечивают экспрессию антигенов МБТ в эпителиальных и антиген-презентирующих клетках респираторного тракта, формируя иммунный ответ на уровне слизистых оболочек верхних и нижних отделов дыхательных путей [22].

Суммируя вышеизложенное, можно заключить, что специфическая терапевтическая иммунизация вакциной Flu/ESAT-6 существенно повышает эффективность противотуберкулезной терапии экспериментального

туберкулеза и способна сократить сроки антибактериальной терапии, что особенно важно для лекарственно-устойчивого туберкулеза, характеризующегося замедленной инволюцией специфического воспаления в легких.

Работа выполнена в рамках Государственного задания МЗ РФ «Комплексная доклиническая оценка новых противотуберкулезных агентов, кандидатных вакцин, клеточных продуктов и наноструктурированных материалов для лечения туберкулеза» (2018–2020).

Выводы

1. Для лекарственно-устойчивого туберкулеза у мышей C57BL/6, инфицированных клиническим штаммом *M. tuberculosis* генотипа *Beijing*, после 4-месячного курса противотуберкулезной терапии (АЕТррВq), подобранной с учетом чувствительности МБТ, характерна замедленная инволюция специфического воспаления с сохранением выраженных признаков экссудативного и альтеративного компонентов специфического воспаления, а также эпителиоидно-клеточных гранулем.
2. Включение вакцинотерапии Flu/ESAT-6 (двукратно с интервалом 3 нед, интраназально, с началом курса ПТП) в комплексное лечение (HR) мышей с лекарственно-чувствительным туберкулезом (инфицированы *M. tuberculosis H37Rv*) через 2,5 мес терапии значимо повысило ее эффективность,

снизив обсемененность легких МБТ (на 1,83 Ig КОЕ), распространенность туберкулезного воспаления в легких и его экссудативного компонента.

3. Присоединение вакцинотерапии Flu/ESAT-6 (троекратно с интервалом 4 нед, интраназально, через 2 нед от начала курса ПТП) к комплексному лечению (АЕТррВq) мышей с лекарственно-устойчивым туберкулезом (инфицированы *M. tuberculosis Beijing*) существенно повысило результативность лечения этой формы инфекции. Через 4 мес терапии уменьшилась бактериальная нагрузка на легкие мышей (на 0,93 Ig КОЕ), снизилась распространенность поражения легких и изменился характер специфического воспаления за счет уменьшения степени выраженности его альтеративного и экссудативного компонентов.
4. Как при лекарственно-чувствительной, так и при лекарственно-устойчивой форме инфекции оптимальные схемы применения иммунотерапии Flu/ESAT-6 привели к стимуляции лимфоидной составляющей клеточного иммунного ответа легких, зафиксированной по перестройке клеточного состава гранулем на лимфоидный и по образованию перибронхиальных лимфогистиоцитарных инфильтратов.
5. Способность терапевтической вакцинации изменять результативность терапии отчетливо зависит от схем иммунизации.

Список литературы

1. Dean A.S., Zignol M., Cabibbe A.M., Falzon D., Glaziou P., Cirillo D.M., Köser C.U., Gonzalez-Angulo L.Y., Tosas-Auget O., Ismail N., Tahseen S., Ama M.C.G., Skrahina A., Alikhanova N., Kamal S.M.M., Floyd K. Prevalence and genetic profiles of isoniazid resistance in tuberculosis patients: A multicountry analysis of cross-sectional data. *PLoS Med.* 2020; 17 (1): e1003008. doi: 10.1371/journal.pmed.1003008.
2. Matteelli A., Rendon A., Tiberi S., Al-Abri S., Voniatis C., Carvalho A.C.C., Centis R., D'Ambrosio L., Visca D., Spanevello A., Battista Migliori G. Tuberculosis elimination: where are we now? *Eur. Respir. Rev.* 2018; 27 (148): 180035. doi: 10.1183/16000617.0035-2018.
3. Rudgard W.E., Evans C.A., Sweeney S., Wingfield T., Lönnroth K., Barreira D., Boccia D. Comparison of Two Cash Transfer Strategies to Prevent Catastrophic Costs for Poor Tuberculosis-Affected Households in Low- And Middle-Income Countries: An Economic Modelling Study. *PLoS Med.* 2017; 14 (11): e1002418. doi: 10.1371/journal.pmed.1002418.
4. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2018. Geneva: World Health Organization. 2018: 267.
5. Wang J., Zhou M., Chen Z., Chen C., Wu G., Zuo Y., Ren X., Chen Z., Wang W., Pang Y. Survival of patients with multidrug-resistant tuberculosis in Central China: a retrospective cohort study. *Epidemiol Infect.* 2020; 148: e50. doi: 10.1017/s0950268820000485.
6. Liu X., Li F., Niu H., Ma L., Chen J., Zhang Y., Peng L., Gan C., Ma X., Zhu B. IL-2 Restores T-Cell Dysfunction Induced by Persistent *Mycobacterium tuberculosis* Antigen Stimulation. *Front Immunol.* 2019; 10: 2350. doi: 10.3389/fimmu.2019.02350.
7. Tousif S., Singh D.K., Ahmad S., Moodley P., Bhattacharyya M., Van Kaer L., Das G. Isoniazid induces apoptosis of activated CD4⁺ T cells: implications for post-therapy tuberculosis reactivation and reinfection. *J. Biol. Chem.* 2014; 289 (44): 30190–30195. doi: 10.1074/jbc.c114.598946.
8. Larsen S.E., Baldwin S.L., Orr M.T., Reese V.A., Pecor T., Granger B., Cauwelaert N.D., Podell B.K., Cole R.N. Enhanced Anti-*Mycobacterium tuberculosis* Immunity over Time with Combined Drug and Immunotherapy Treatment. *Vaccines (Basel).* 2018; 6 (2): 30. doi: 10.3390/vaccines6020030.
9. Su H., Zhu S., Zhu L., Kong C., Huang Q., Zhang Z., Wang H., Xu Y. *Mycobacterium tuberculosis* Latent Antigen Rv2029c from the Multistage DNA Vaccine A39 Drives TH1 Responses via TLR-mediated Macrophage Activation. *Front Microbiol.* 2017; 8: 2266–2293. doi: 10.3389/fmicb.2017.02266.
10. Billeskov R., Lindenstrøm T., Woodworth J., Vilaplana C., Cardona P.J., Cassidy J.P., Mortensen R., Agger E.M., Andersen P. High Antigen Dose Is Detrimental to Post-Exposure Vaccine Protection against Tuberculosis. *Front Immunol.* 2017; 8: 1973. doi: 10.3389/fimmu.2017.01973.
11. Vasilyev K.A., Yukhneva M.A., Shurygina A.-P.S., Stukova M.A., Egorov A.Y. The enhancement of influenza A virus immunogenicity by the inhibition of the immunosuppressive function of NS1 protein. *MIR J.* 2018; 5 (1): 48–58. doi.org/10.18527/2500-2236-2018-5-1-48-58.

12. Павлова М.В., Ершова Е.С., Виноградова Т.И., Сапожникова Н.В., Заболотных Н.В., Гришко А.Н. Современные тенденции в лечении лекарственно устойчивого туберкулеза. Медицинский альянс. 2017; (4): 23–29. [Pavlova M.V., Ershova E.S., Vinogradova T.I., Sapozhnikova N.V., Zabolotnyh N.V., Grishko A.N. Sovremennye tendencii v lechenii lekarstvenno ustojchivogo tuberkuleza. Medicinskij al'jans 2017; (4): 23–29 (In Russ.)].
13. Shanley C.A., Ireton G.C., Baldwin S.L., Coler R.N., Reed S.G., Basaraba R.J., Orme I.M. Therapeutic vaccination against relevant high virulence clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis. Tuberculosis (Edinb). 2014; 94 (2): 140–147. doi: 10.1016/j.tube.2013.08.010.
14. Warsinske H.C., DiFazio R.M., Linderman J.J., Flynn J.A.L., Kirschner D.E. Identifying mechanisms driving formation of granuloma-associated fibrosis during Mycobacterium tuberculosis infection. J. Theor. Biol. 2017; 429: 1–17. doi: 10.1016/j.jtbi.2017.06.017.
15. Ehlers S., Schaible U.E. The granuloma in tuberculosis: dynamics of a host-pathogen collusion. Front Immunol. 2013; 3: 411. doi: 10.3389/fimmu.2012.00411.
16. Pagán A.J., Ramakrishnan L. Immunity and Immunopathology in the Tuberculous Granuloma. Cold Spring Harb Perspect Med. 2014; 5 (9): 018499. doi: 10.1101/cshperspect.a018499.
17. Marino S., El-Kebir M., Kirschner D. A hybrid multi-compartment model of granuloma formation and T cell priming in tuberculosis. J. Theor. Biol. 2011; 280 (1): 50–62. doi: 10.1016/j.jtbi.2011.03.022.
18. Carow B., Hauling T., Qian X., Kramnik I., Nilsson M., Rottenberg M.E. Spatial and temporal localization of immune transcripts defines hallmarks and diversity in the tuberculosis granuloma. Nat. Commun. 2019; 10: 1823. doi: 10.1038/s41467-019-09816-4.
19. Genoula M., Franco J.L.M., Dupont M., Kviatcovsky D., Milillo A., Schierloh P., Moraña E.J., Poggi S., Palmero D., Mata-Espinoza D., González-Domínguez E., Contreras J.C.L., Barrionuevo P., Rearte B., Moreno M.O.C., Fontanals A, Asis A.C., Gago G., Cougoule C., Neyrolles O., Maridonneau-Parini I., Sánchez-Torres C., Hernández-Pando R., Vérolet C., Lugo-Villarino G., Sasiain M.D.C., Balboa L. Formation of Foamy Macrophages by Tuberculous Pleural Effusions Is Triggered by the Interleukin-10/Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Axis through ACAT Upregulation. Front Immunol. 2018; 9: 459. doi: 10.3389/fimmu.2018.00459.
20. Vasilyev K.A., Shurygina A.-P.S., Stukova M.A., Egorov A.Y. Enhanced CD8+ T-cell response in mice immunized with NS1-truncated influenza virus. MIR J. 2020; 7 (1): 24–33. doi: 10.18527/2500-2236-2020-7-1-24-33.
21. Stukova M.A., Sereinig S., Zabolotnyh N.V., Ferko B., Kittel C., Romanova J., Vinogradova T.I., Katinger H., Kiselev O.I., Egorov A. Vaccine potential of influenza vectors expressing Mycobacterium tuberculosis ESAT-6 protein. Tuberculosis (Edinb.) 2006; 86 (3–4): 236–246. doi: 10.1016/j.tube.2006.01.010.
22. Jeyanathan M., Yao Y., Afkhami S., Smaill F., Xing Z. New Tuberculosis Vaccine Strategies: Taking Aim at Un-Natural Immunity. Trends in immunology 2018; 39: 419–433. doi.org/10.1016/j.it.2018.01.006.

Поступила в редакцию 07.10.2020 г.

Сведения об авторах:

Заболотных Наталья Вячеславовна — доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник Санкт-Петербургского научно-исследовательского института фтизиопульмонологии; 191036, Санкт-Петербург, Лиговский пр., д. 2-4; e-mail: zabol-natal@yandex.ru; ORCID 0000-0002-2946-2415;

Виноградова Татьяна Ивановна — доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник Санкт-Петербургского научно-исследовательского института фтизиопульмонологии; 191036, Санкт-Петербург, Лиговский пр., д. 2-4; e-mail: vinogradova@spbniif.ru; ORCID 0000-0002-5234-349X;

Догонадзе Марине Зауриевна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Санкт-Петербургского научно-исследовательского института фтизиопульмонологии; 191036, Санкт-Петербург, Лиговский пр., д. 2-4; e-mail: marine-md@mail.ru; ORCID 0000-0002-9161-466X;

Витовская Мария Львовна — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник Санкт-Петербургского научно-исследовательского института фтизиопульмонологии; 191036, Санкт-Петербург, Лиговский пр., д. 2-4; e-mail: mariavit72@mail.ru; ORCID 0000-0003-4057-5741;

Ариэль Борис Михайлович — доктор медицинских наук, профессор, научный консультант Санкт-Петербургского научно-исследовательского института фтизиопульмонологии; 191036, Санкт-Петербург, Лиговский пр., д. 2-4; e-mail: arielboris@rambler.ru; ORCID 0000-0002-7243-8621;

Васильев Кирилл Александрович — научный сотрудник Научно-исследовательского института гриппа им. А.А. Смородинцева; 197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 15-17; e-mail: kirillv5@yandex.ru; ORCID 0000-0002-7750-9652;

Шурыгина Анна-Полина Сергеевна — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник Научно-исследовательского института гриппа им. А.А. Смородинцева; 197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 15-17; e-mail: ann-polin@yandex.ru; ORCID 0000-0003-3685-7068;

Бузицкая Жанна Валерьевна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Научно-исследовательского института гриппа им. А.А. Смородинцева; 197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 15-17; e-mail: janna.buzitskaya@influenza.spb.ru; ORCID 0000-0002-8394-102X;

Стукова Марина Анатольевна — кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией векторных вакцин Научно-исследовательского института гриппа им. А.А. Смородинцева; 197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 15-17; e-mail: marina.stukova@influenza.spb.ru; ORCID 0000-0002-2127-3820.