

## **ТЕЧЕНИЕ ТУБЕРКУЛЕЗА У МЫШЕЙ ГАПЛОТИПА H2V, АССОЦИИРОВАННОГО СО СВЕРХВЫСОКОЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ВОСПРИИМЧИВОСТЬЮ К ИНФЕКЦИИ**

Байкузина П. Г. <sup>1, 2</sup>,

Горбачева Д. В. <sup>1, 3</sup>,

Апт А. С. <sup>1</sup>,

Коротецкая М. В. <sup>1, 3</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», г. Москва, Россия.

<sup>2</sup> Сколковский институт науки и технологий, г. Москва, Россия.

<sup>3</sup> Факультет Биоинформатики и Биоинженерии, МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, Россия.

**THE COURSE OF TUBERCULOSIS INFECTION IN HYPER-SUSCEPTIBLE MICE CARRYING THE H2V HAPLOTYPE**

Baikuzina P. G.<sup>a, b</sup>,

Gorbacheva D. V.<sup>a, c</sup>,

Apt A. S.<sup>a</sup>,

Korotetskaya M. V.<sup>a, c</sup>

<sup>a</sup> Central TB Research Institute, Department of immunology, Laboratory of Immunogenetics, Moscow, Russia.

<sup>b</sup> Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russia.

<sup>c</sup> Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia.

## Резюме

Генетические основы восприимчивости хозяина к патогену *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) и тяжесть течения инфекционного процесса изучены недостаточно. Поиск конкретных генов и зависимых от них иммунных реакций, влияющих на восприимчивость к туберкулезу, необходим для понимания механизмов патогенеза инфекционного процесса и определения мишеней для терапии инфекции, а также рационального конструирования новых вакцин. При работе с мышами линии B10.SM ( $H2^v$ ) мы показали, что эта линия проявляет очень высокую чувствительность к туберкулезной инфекции, при этом очень мало данных о структуре генома этой линии мышей, в том числе собственно гаплотипа  $H2^v$ . Мы подобрали генетические маркеры *Mit* с длиной пробега в электрофорезе продуктов ПЦР, которые отличны у мышей линии B10.SM и конгенной по хромосоме 17 линии B10 ( $H2^b$ ) гораздо более резистентной к инфекции. В модели инфекции, вызванной введением путем ингаляции двух разными доз *Mtb* (100 и 600 КОЕ/мышь), мы установили, что срок жизни животных двух линий достоверно короче у мышей B10.SM, а уровень размножения микобактерий в легких у них достоверно выше. Мы показали (внутриклеточное окрашивание и ELISA), что продукция легочными клетками CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$  у зараженных животных полностью соответствует данным по фенотипу самой инфекции. Более резистентные мыши B10 отличаются более высоким содержанием в легких IFN- $\gamma$ -положительных клеток и более высоким уровнем его секреции.

При изучении влияния генетики хозяина на течение инфекционного процесса важно знать, по какому типу наследуется чувствительность и резистентность к заражению. Полученные нами данные показывают, что по времени выживания, размножению микобактерий в легких и выработке IFN- $\gamma$  гибриды (B10x B10.SM) F1 имеют промежуточный фенотип, т.е. наследование идет по типу неполного доминирования. Эти данные были подтверждены сегрегационным анализом гибридов F2. Для более полного описания фенотипа линии B10.SM была проведена вакцинация животных BCG. Вакцинация достоверно снижала количество бактерий в легких после заражения и уровень легочной патологии, а также увеличивала продолжительность жизни животных, то есть высокая чувствительность к первичной инфекции не мешала эффективности вакцинации.

Генетический и иммунологический анализ сверхчувствительной к туберкулезу линии мышей B10.SM будет продолжен, поскольку экспериментальные данные о причинах таких серьезных нарушений в защите от инфекции необходимы для понимания причин широкого спектра проявления заболевания в популяциях человека и рационального поиска новых вакцин и лекарств против туберкулеза.

**Ключевые слова:** туберкулез, гаплотип, чувствительность, микобактерия, главный комплекс гистосовместимости, восприимчивость.

### Abstract

Genetic regulation of the host susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) and severity of tuberculosis (TB) infection remain incompletely investigated. Identification of particular genes and involved in TB control and immune reactions regulated by these genes is essential for our understanding of pathogenesis of the disease, discovery of drug targets and rational vaccine development. We have shown that mice of the B10.SM (*H2<sup>v</sup>*) strain are extremely TB susceptible; meanwhile, the general genome structure of this mouse strain and the *H2<sup>v</sup>* haplotype itself are poorly characterized. We selected a pool of *Mit* genetic markers differentiating B10.SM mice from Chr. 17-congenic mice of the B10 strain by the PCR products motility in the electrophoresis setting. TB susceptibility of B10 mice is much lower than that of B10.SM. In the model of infection triggered by two different doses of *Mtb* (100 and 600 CFU per mouse) administered via respiratory tract we demonstrated that B10.SM mice have significantly shorter survival time and significantly higher lung mycobacterial multiplication compared to B10 mice. We demonstrated (intracellular staining and ELISA) that IFN- $\gamma$  production in the lungs of infected mice of the two strains corresponds well to their disease phenotypes. Thus, more resistant B10 mice possess significantly more lung IFN- $\gamma$ -positive CD4<sup>+</sup> T cells and a higher level of IFN- $\gamma$  secretion.<sup>3</sup>

We have established (B10x B10.SM) F1 hybrids and demonstrated that the post-infection phenotypes of survival time, lung mycobacterial multiplication and IFN- $\gamma$  production in these mice are intermediate compared to parental mice. Thus, we deal with the genetic trait with incomplete dominance expression. These data were confirmed in F2 hybrids by segregation genetic analysis. To characterize the phenotype of B10.SM mice in more detail, we vaccinated these mice with the BCG vaccine before TB challenge. Vaccination significantly prolonged survival time, diminished mycobacterial multiplication in the lungs and the degree of lung tissue pathology. Thus, a high level of susceptibility to primary infection did not interfere with BCG vaccination efficacy.

We intend to continue genetic and immunologic analyses of TB-hyper-susceptible B10.SM mice. Experimental data regarding the cause of extreme disturbances in protection against infection are prerequisite for our better understanding causality of the wide spectrum of TB manifestations in human populations, as well as for rational search for novel vaccines and medications against TB infection.

**Keywords:** tuberculosis, haplotype, sensitivity, mycobacterium, major histocompatibility complex, susceptibility.

## 1 Введение

Туберкулез (ТБ) остается важной проблемой здравоохранения. По последним опубликованным данным ВОЗ около 25% населения планеты инфицированы *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). У 5-10% инфицированных в течение жизни может развиваться активная форма ТБ [10]. Восприимчивость хозяина к *Mtb* и тяжесть течения инфекции – это признаки со сложной и недостаточно изученной генетической регуляцией. Ответ организма хозяина на *Mtb* регулирует множество генов со сложными фенотипическими проявлениями [5]. Поиск конкретных генов и зависимых от них иммунных реакций, влияющих на восприимчивость к ТБ, необходим для понимания механизмов патогенеза туберкулеза и определения мишеней для терапии инфекции, а также рационального конструирования новых вакцин.

Модели туберкулезной инфекции на мышах важны для изучения генетического контроля восприимчивости к инфекции, поскольку позволяют обойти многие сложности исследования механизмов патогенеза болезни у человека. В частности, на животных гораздо проще применять прямой генетический подход, основанный на определении локализации генов, аллельные варианты которых определяют контрастные фенотипы проявлений заболевания. Носителей разных фенотипов скрещивают, и в расщепляющихся поколениях F2 или BC1 проверяют проявление интересующего фенотипа и сцепление с выбранными генетическими маркерами. Последующее получение набора рекомбинантных инбредных линий дает возможность охарактеризовать их фенотипы и определить, какая именно область генома связана с проявлением фенотипа.

Мыши линии B10.SM ( $H2^v$ ) проявляют очень высокую чувствительность к туберкулезной инфекции. Данная линия очень мало изучена, в частности из-за того, что в настоящее время она разводится только в виварии ФГБНУ «ЦНИИТ». Линия B10.SM имеет общую генетическую основу с линией B10 ( $H2^b$ ), гораздо более устойчивой к ТБ. Линии отличаются только большим участком 17-й хромосомы, включающим область *MHC* мыши, комплекс *H2*. Область *H2* содержит множество генов, регулирующих иммунный ответ, важнейшими из которых можно считать классические гены класса I и II. Большое количество иммунологически активных и высоко-полиморфных генов в составе *MHC* сильно затрудняет поиск значимых аллельных вариантов, влияющих на течение ТБ.

Кроме того, в 17-й хромосоме вызывает интерес и плохо изученный Т-комплекс. Некоторые мутации в генах Т-комплекса приводят к летальности эмбрионов, нарушениям эмбрионального развития хвостовой части позвоночника и стерильности самцов. Этот участок охватывает примерно треть 17-й хромосомы (35Mb) и фланкирует область *H2* с дистального участка. Из-за инверсий в Т-области возникают сложности с выведением мышей, рекомбинантных по этой части генома [3].

В области МНС вполне могут располагаться несколько генов, влияющих на течение ТБ. Во многих работах, выполненных на конгенных по области H2 линиях мышей и на разных популяциях человека, было показано участие генов МНС мыши и человека в определении уровня восприимчивости к ТБ и иммунного ответа на инфекцию [2]. Целью данной работы стала характеристика параметров иммунного ответа на инфекцию у мышей конгенных линий генотипов H2<sup>v</sup> и H2<sup>b</sup>, а также определение точных границ интервала хромосомы 17, по которому они отличаются

## 2 Материалы и методы

**Экспериментальные животные.** Для работы использовались инбредные линии мышей B10.SM/SnEgYCit (B10.SM, H2<sup>v</sup>) и B10/SnEgYCit (B10, H2<sup>b</sup>). Линии поддерживаются братско-сестринскими скрещиваниями в питомнике ФГБНУ «ЦНИИТ» в обычных условиях с доступом к корму и воде *ad libitum*. Использовались самки весом 20-22г в начале эксперимента.

**Генетическое типирование.** Определение генетических полиморфизмов внутри сегмента хромосомы 17, включающего комплекс H2 и прилежащие области, проводили методом ПЦР. Определяли либо замены одного нуклеотида (SNP), либо простые полиморфизмы длин некодирующих последовательностей (SSLP, или маркеры *Mit*). Праймеры для определения *Mit* были взяты из открытой базы данных [11]. Проводилось пробное типирование мышей B10 и B10.SM и для последующей работы отбирались те маркеры, которые давали четкие отличия между линиями по длине пробега ПЦР-продуктов в электрофорезе в 4% агарозном геле.

**Культуры микобактерий, вакцинация и заражение.** В работе использовали штаммы *Mtb* H37Rv и *M. bovis* BCG (Pasteur) из коллекции лаборатории иммуногенетики ФГБНУ «ЦНИИТ». Микобактерии размножали в жидкой среде Дюбо и хранили аликвотами по 10<sup>8</sup> КОЕ/мл при -70°C. Подготовка культур и заражение мышей в аэрозольной камере «GlasCol» (США) описаны ранее [7, 8]. Вакцину BCG вводили однократно в дозе 5 x 10<sup>7</sup> КОЕ в 0,2 мл физиологического раствора с 0,05% Tween 20, подкожно в холку.

**Определение количества *Mtb* и BCG в органах.** Стерильно выделяли легкие и селезенки зараженных и/или вакцинированных животных, гомогенизировали в 2 мл физиологического раствора, а затем готовили серийные десятикратные разведения гомогенатов органов и высевали на чашки Петри с агаром Дюбо («Difco», США) по 50 мкл на чашку. Чашки инкубировали при 37°C, через 21 дней подсчитывали количество колоний на чашке и пересчитывали их количество на орган (КОЕ/орган).

**Приготовление суспензий клеток селезенки, лимфоузлов и легких.** Методика приготовления суспензий клеток детально описаны в более ранних работах из нашей лаборатории [6]. Для работы с первичными культурами клеток легкого, лимфоузлов или селезенки выделенные клетки помещали в

среду для культивирования (RPMI-1640, содержащая 5% FCS, 1 mM пируват, 4 mM L-глутамат, 50 мкг/мл смеси антибиотиков стрептомицина и пеницилина,  $5 \times 10^{-5}$  M  $\beta$ -меркаптоэтанола, 10 mM HEPES, все компоненты производства HiClone, Logan, UT, USA).

**Проточная цитофлуориметрия.** Клеточную суспензию из легких индивидуальных мышей ( $1-2 \times 10^6$  клеток) инкубировали 10 минут при  $4^{\circ}\text{C}$  с моноклональными антителами анти-CD16/CD32 (клон CT-17.1,17.2) для блокирования Fc-рецепторов, после чего 20 минут окрашивали моноклональными антителами анти-CD3e-FITC (BD Biosciences, клон 145-2C11), анти-CD44-PE (BioLegend, клон IM7), анти-CD8a-PerCp (BioLegend, клон 53-6.7), анти-CD62L-APC (BioLegend, клон MEL-14) и анти-CD4-Bv421 (BioLegend, клон GK1.5). Окрашенные клетки отмывали дважды и фиксировали 1% параформальдегидом, после чего анализировали на приборе BD FACSCanto II с помощью программного обеспечения FlowJo (Tree Star). Выявляли следующие фенотипы Т-клеток:  $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$ , активированные –  $\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD44}^{\text{high}}\text{CD62L}^{\text{low}}$ , неактивированные –  $\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD44}^{\text{low}}\text{CD62L}^{\text{high}}$  [6].

**Внутриклеточное окрашивание цитокинов антителами.**  $1,5 \times 10^6$  клеток легких инкубировали в присутствии убитых ультрафиолетом *Mtb* 72-часа, а затем на последние 12 часов добавляли блокатор аппарата Гольджи GolgiPlug (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; BD Biosciences). После отмывки у клеток легкого окрашивали поверхностные антигены антителами анти-CD4- и -анти-CD8a-PerCp. Окрашивание цитокинов в клетках проводили с использованием набора Cytofix/Cytoperm kit (BD Biosciences) антителами анти-IFN- $\gamma$ -APC (BD Biosciences, клон XMG1.2) с соблюдением рекомендаций фирмы производителя.

**Анализ продукции IFN- $\gamma$**  проводили в супернатантах культур клеток селезенки, лимфоузлов или легких после 72-часовой инкубации при  $37^{\circ}\text{C}$  и 5%  $\text{CO}_2$  методом ELISA с использованием набора DuoSet ELISA Development kit (R&D, DY485) с соблюдением рекомендаций фирмы производителя.

**Приготовление гистологических срезов и окрашивание препаратов.** Для определения степени воспаления и других патологических изменений в легких у исследуемых мышей среднюю долю правого легкого замораживали в режиме температурного градиента от  $-60^{\circ}\text{C}$  до  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение 10 минут в электронном криотоме (ThermoShandon, Великобритания). Получали срезы толщиной 8-10 мкм. Срезы высушивали на воздухе, фиксировали в этаноле и окрашивали гематоксилином и эозином.

**Статистическая обработка результатов.** Полученные данные обрабатывали с помощью программы GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc.) по методам корреляционного и вариационного анализа (ANOVA) и критерия Манна-Уитни. Достоверными считали различия при  $P < 0,05$ .

### 3 Результаты

По старым данным, приведенных в монографиях по биологии *МНС*, мыши В10.SM отличаются от мышей В10 только участком 17-й хромосомы, несущем комплекс *H2*. Однако эта линия была выведена во времена, когда генетическое картирование проводилось по отторжению трансплантатов кожи и было очень неточным [9]. Поэтому для выполнения задач исследования необходимо было в первую очередь точно определить границы перенесенного на генетическую основу В10 участка генома в миллионах пар оснований (Mbp) с помощью методов современного генетического типирования.

Размеры участка *H2<sup>v</sup>* был определен с помощью маркеров *Mit*, отличающих аллельные варианты *H2<sup>b</sup>* и *H2<sup>v</sup>* (см. таблицу 1 в приложении). Было показано, что линии В10 и В10.SM отличаются по очень большому содержащему сотни генов, участку 17-й хромосомы размером более 70 миллионов пар оснований, включающему область *H2* (Рис.1А).

Высокий уровень восприимчивости к ТБ мышей В10.SM проявляется в сильно сокращенном сроке выживания после заражения двумя разными дозами *Mtb* по сравнению с мышами В10 (Рис. 1Б, В) и достоверно более высоком уровне размножения микобактерий в легких (Рис. 1Г, Е). Примечательно, что специфическая (стимулированная антигенами возбудителя) продукция клетками легкого зараженных мышей двух линий IFN- $\gamma$ , то есть основного цитокина обеспечивающего активацию зараженных макрофагов и уничтожение внутриклеточных микобактерий [4], оказалась достоверно выше у более резистентных мышей В10, несмотря на меньшее количество микобактерий в их легких (Рис. 1Д, Ж)

Анализ клеточного состава легкого после заражения показал, что общая инфильтрация органа Т-клетками CD4<sup>+</sup> была выше у мышей В10.SM, но процент активированных клеток с фенотипом CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> в этой популяции оказался достоверно ниже, чем у мышей линии В10 (Рис. 2А, Б). Такая же разница выявилась по количеству Т-клеток CD4<sup>+</sup>, продуцирующих IFN- $\gamma$  (внутриклеточное окрашивание, Рис. 2В), что соответствует картине общей продукции этого цитокина (Рис. 2Г). Разницы по количеству и уровню активации других типов клеток иммунной системы (Т-лимфоцитов CD8<sup>+</sup>, В-лимфоцитов CD19<sup>+</sup>, нейтрофилов Ly-6G<sup>+</sup> и макрофагов F4/80<sup>+</sup>) нами найдено не было.

Мыши конгенных по *H2* линий отличаются не только по тяжести течения первичного ТБ, но и по эффективности вакцинации BCG, причем между этими параметрами не всегда наблюдается корреляция [1]. Для более полного описания фенотипа мышей В10.SM мы провели вакцинацию этих мышей и через 5 недель заразили вакцинированных и не вакцинированных животных. По кривой выживаемости, количеству микобактерий в легких и картине патологии оказалось, что вакцинация BCG вполне эффективна (Рис.2Д-Ж). У предварительно вакцинированных животных достоверно снизилось

размножение микобактерий в легких (Рис. 2Д) и повысилось время выживания (Рис. 2Е). У не вакцинированных мышей наблюдалось диффузное воспаление легочной ткани, тогда как у вакцинированных мышей очаги воспаления были более четко отделены от здоровой ткани (Рис. 2Ж). Таким образом, сверхвысокая чувствительность мышей B10.SM к *Mtb* не мешает эффективности иммунного ответа на вакцину BCG.

Для последующей работы по сужению генетического интервала, определяющего высокую восприимчивость к инфекции, и началу поиска генов-кандидатов, важно было выяснить тип наследования высокой чувствительности к ТБ. С этой целью мы получили гибридов, между двумя линиями. У гибридов (B10 x B10.SM) F1 наблюдается промежуточный фенотип по выживаемости (Рис. 3А), размножению *Mtb* в легких (Рис. 3Б) и продукции IFN- $\gamma$  (Рис. 3В), что соответствует наследованию по типу неполного, или промежуточного, доминирования. Такая картина наследования не характерна для генов *MHC* класса I и II, для которых чаще всего наблюдается ко-доминирование.

Более надежным источником данных о типе наследования являются гибриды F2. Получив таких гибридов, мы провели генетическое типирование на носительство генотипов  $H2^{v/v}$ ,  $H2^{v/b}$  и  $H2^{b/b}$  и заразили животных *Mtb*. Среднее время выживания мышей с генотипом  $H2^{v/v}$  не отличалось от мышей родительской линии B10.SM, гибриды с гетерозиготным вариантом имели промежуточный фенотип, а носители генотипа  $H2^{b/b}$  не отличались от мышей B10 (Рис. 3Г). Таким образом, наследование резистентности по типу промежуточного доминирования было подтверждено сегрегационным анализом (Рис. 3Г).

#### 4 Обсуждение результатов

Мы получили подробную картину фенотипов мышей линии B10.SM с мало изученным гаплотипом  $H-2^v$  в отношении тяжести течения ТБ. Помимо фенотипов мы смогли уточнить размер участка гаплотипа  $H-2^v$ , который был перенесен на генетическую основу линии мышей B10 в период выведения линии B10.SM. Область поиска гена-кандидата составляет чуть больше 70 миллионов пар оснований. Новые рекомбинантные линии, выведением которых мы занимаемся в настоящее время, дадут нам возможность сократить участок поиска генов на 17-й хромосоме и соотнести их с фенотипическими проявлениями. Следующим этапом станет поиск генов-кандидатов и определение того, какие регуляторные пути нарушены у сверхчувствительных к ТБ рекомбинантных конгенных мышей.

#### Благодарности

Исследование поддержано грантом РФФИ № 23-14-00030.

## ТАБЛИЦЫ

**Таблица.1.** Список маркеров Mit, которые давали продукт, имеющий отличие у линий B10 и B10.SM по весу, а значит отличающийся по набору последовательности нуклеотидов.

**Table 1.** Mit markers list with different weights of PCR products between strains of mice B10 and B10.SM.

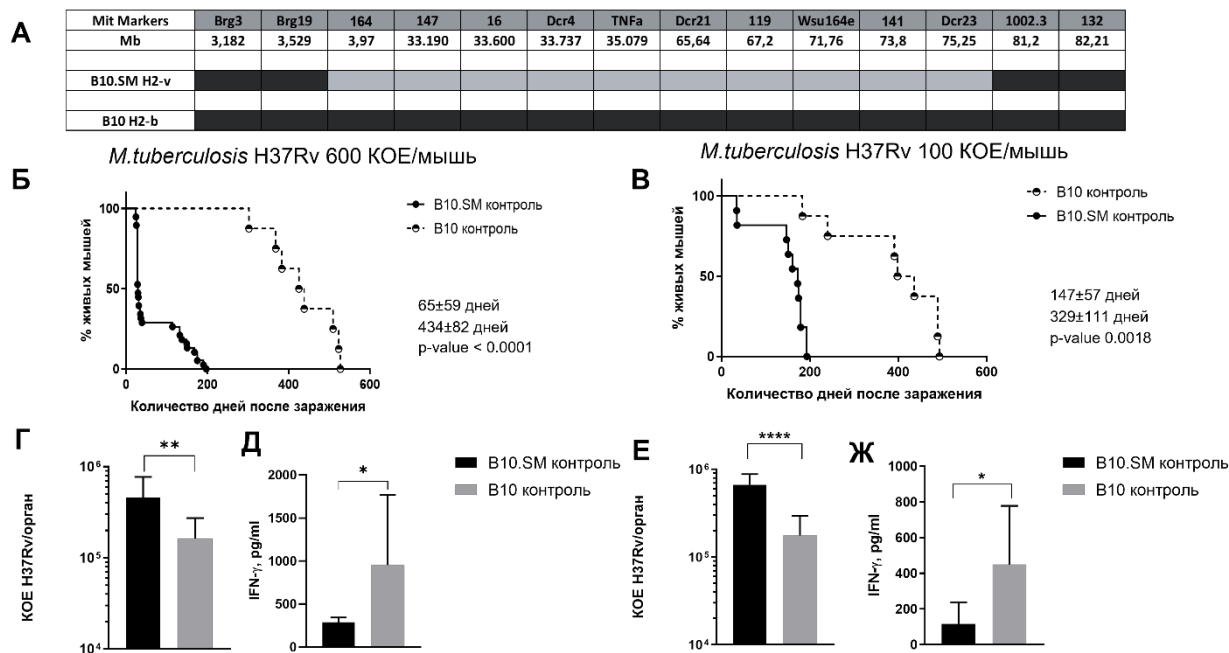
| Маркеры/<br>Mit<br>markers | Геномная позиция<br>на 17 хромосоме в<br>миллионах пар<br>оснований/<br>Genomic position on<br>17 chromosome in<br>millions of base<br>pairs |
|----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| D17Mit<br>164              | 3,97                                                                                                                                         |
| D17Brg125                  | 4,33                                                                                                                                         |
| D17Mit<br>172              | 6,14                                                                                                                                         |
| D17Mit<br>195              | 7,24                                                                                                                                         |
| D17Mit<br>133              | 24,99                                                                                                                                        |
| D17Mit<br>198              | 27,79                                                                                                                                        |
| D17Mit 16                  | 33,6                                                                                                                                         |
| D17Dcr4                    | 33,737                                                                                                                                       |
| D17Mit62                   | 33,874                                                                                                                                       |
| D17Mit82                   | 33,81                                                                                                                                        |
| D17Dcr6                    | 34,75                                                                                                                                        |
| D17Mit28                   | 34                                                                                                                                           |
| D17Mit13                   | 35,298                                                                                                                                       |
| D17Mit47                   | 36,35                                                                                                                                        |
| D17Mit148                  | 36,94                                                                                                                                        |
| D17Mit234                  | 38,66                                                                                                                                        |
| D17Mit263                  | 41,22                                                                                                                                        |
| D17Mit11                   | 22 cM*                                                                                                                                       |
| D17Mit49                   | 44,77                                                                                                                                        |
| D17Mit177                  | 48,02                                                                                                                                        |
| D17Mit87                   | 54,88                                                                                                                                        |
| D17Mit152                  | 65,24                                                                                                                                        |
| D17Mit141                  | 73,8                                                                                                                                         |



## РИСУНКИ

**Рисунок 1.** Отличия между линиями мышей B10 и B10.SM.

**Figure 1.** Differences between the B10 and B10.SM mouse strains.

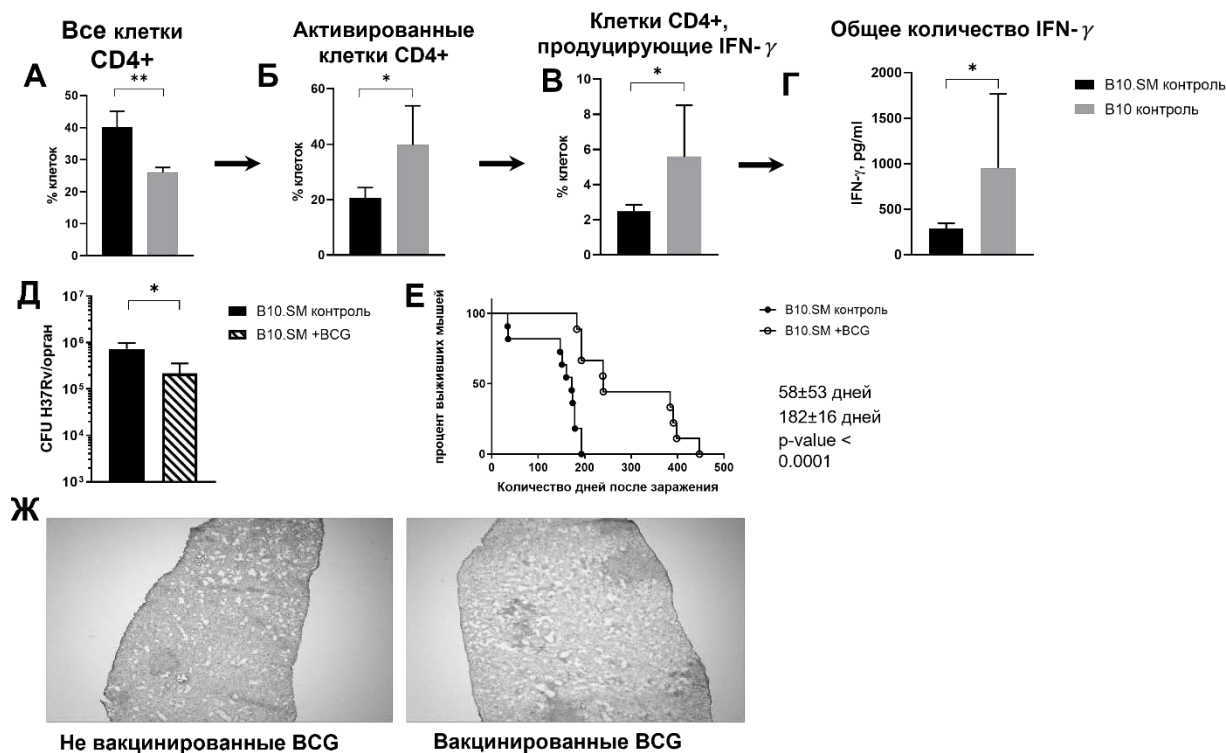


(A) Участок гаплотипа  $H2^v$  (серый) на генетической основе гаплотипа  $H2^b$  (черный) 17-й хромосомы, определенный с помощью метода ПЦР-анализа с набором маркеров *Mit*. Кривые выживания мышей двух линий после заражения *Mtb* в дозе 600 (Б) и 100 (В) КОЕ через респираторный тракт. Размножение *Mtb* в легких после заражения высокой (Г) и низкой (Е) дозой. Продукция  $IFN-\gamma$  клетками легкого мышей, зараженных высокой (Д) и низкой (Ж) дозой возбудителя, после стимуляции *in vitro* поли-антигеном *Mtb*. \*, \*\*\*\* =  $P < 0,05$  и  $< 0,0001$ , соответственно.

(A) Mice B10.SM carry region of  $H2^v$  (gray color) haplotype on  $H2^b$  background (black color) of 17 chromosome determined using PCR analysis with *Mit* markers. Survival curves of strains B10.SM and B10 after aerosol *Mtb* infection with dose of 600 (B) and 100 (C) CFU. Reproduction of *Mtb* in the lungs after high (H) and low (E) dose infection. Production of  $IFN-\gamma$  by lung cells of mice infected with a high (D) and low (L) dose of the pathogen after stimulation *in vitro* with *Mtb* poly-antigen. \*, \*\*, \*\*\*\* =  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  and  $< 0.0001$ , respectively.

**Рисунок 2.** Количество и уровень активации Т-клеток CD4<sup>+</sup> у мышей двух линий после заражения и ответ на вакцинацию BCG мышей B10.SM.

**Figure 2.** Communication between the number and level of activation of CD4<sup>+</sup> T cells with the susceptibility of mice strain B10.SM, and response to BCG vaccination.

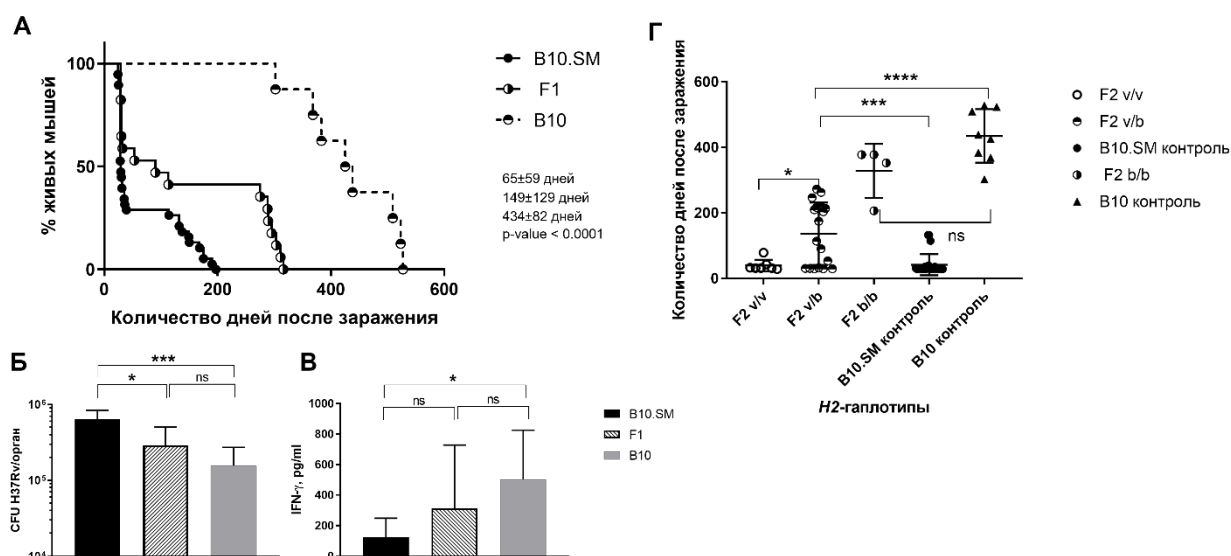


Общий процент (А), доля активированных (Б) количество продуцентов IFN-γ среди Т-клеток CD4<sup>+</sup> (В) и общая секреция всеми клетками легких IFN-γ *in vitro* (Г) после заражения туберкулезом. (Д) – количество *Mtb* в легких у мышей после вакцинации и последующего заражения H37Rv в дозе 600 КОЕ/мышь; (Е) – кривая выживаемости мышей после вакцинации и последующего заражения; (Ж) – патология легких у вакцинированных и не вакцинированных животных после заражения, окрашивание гематоксилином -эозином, увеличение x 25.

Total percentage CD4<sup>+</sup> by all lung cells (A), proportion activated T-cells (B), number of IFN-γ producers among CD4<sup>+</sup> T cells (C) and total secretion of IFN-γ by all lung cells *in vitro* (D) after tuberculosis infection. (E) – the number of *Mtb* in the lungs of mice after vaccination and subsequent infection with H37Rv at a dose of 600 CFU/mouse; (F) – survival curve of mice after vaccination and subsequent infection; (G) – pathology of the lungs in vaccinated and unvaccinated animals after infection, staining with hematoxylin-eosin, magnification x 25.

**Рисунок 3.** Промежуточная восприимчивость к инфекции гибридов (B10.SM х B10) F1 и F2.

**Figure 3.** Intermediate susceptibility to infection of hybrids (B10.SM х B10) F1 and F2.



(A) – survival curves after infection with a dose of 600 CFU/mouse. (B) – reproduction of *Mtb* in the lungs. (В) – Specific production of IFN-γ by lung cells. (D) – segregation genetic analysis of F2 hybrids.

## ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ\_МЕТАДАННЫЕ

### Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

**Коротецкая Мария Валерьевна** – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики отдела иммунологии федерального государственного бюджетного научного учреждения «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», преподаватель Факультета Биоинформатики и Биоинженерии, МГУ имени М.В. Ломоносова;

адрес: 107564 г. Москва, Яузская аллея, д.2;

телефон: 8(499)785-90-72;

факс: 8(499)785-91-08;

e-mail: [mkorotetskaya@gmail.com](mailto:mkorotetskaya@gmail.com)

**Korotetskaya M. V.** – PhD, Senior Staff Scientist, Laboratory for Immunogenetics, Department of immunology, Central TB Research Institute; Tutor, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, M.V. Lomonosov Moscow State University;

address: 107564, Moscow, Yauza alley, 2;

telephone: 8(499)785-90-72;

fax: 8(499)785-91-08;

e-mail: [mkorotetskaya@gmail.com](mailto:mkorotetskaya@gmail.com)

### Блок 2. Информация об авторах

**Байкузина П. Г.** – лаборант-исследователь лаборатории иммуногенетики отдела иммунологии ФГБНУ «Центральный НИИ туберкулеза», лаборант Сколковского институт науки и технологий;

**Baikuzina P. G.** – Research Assistant, Laboratory for Immunogenetics, Department of Immunology, Central TB Research Institute; Technician, Skolkovo Institute of Science and Technology;

**Горбачева Д. В.** – лаборант-исследователь лаборатории иммуногенетики отдела иммунологии ФГБНУ «Центральный НИИ туберкулеза», студентка 6-го курса Факультета Биоинформатики и Биоинженерии, МГУ имени М.В. Ломоносова;

**Gorbacheva D. V.** – Research Assistant, Laboratory for Immunogenetics, Department of Immunology, Central TB Research Institute; Undergraduate Student, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, M. V. Lomonosov Moscow State University;

**Апт А. С.** – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией иммуногенетики отдела иммунологии ФГБНУ «Центральный НИИ туберкулеза»;

**Apt A. S.** – PhD, Professor and Head, Laboratory for Immunogenetics, Department of Immunology, Central TB Research Institute.

**Блок 3. Метаданные статьи**

ТЕЧЕНИЕ ТУБЕРКУЛЕЗА У МЫШЕЙ ГАПЛОТИПА H2V,  
АССОЦИИРОВАННОГО СО СВЕРХВЫСОКОЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ  
ВОСПРИИМЧИВОСТЬЮ К ИНФЕКЦИИ

THE COURSE OF TUBERCULOSIS INFECTION IN HYPER-SUSCEPTIBLE  
MICE CARRYING THE H2V HAPLOTYPE

**Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:**

ТУБЕРКУЛЕЗ У МЫШЕЙ ГАПЛОТИПА H2<sup>V</sup>

TUBERCULOSIS OF MICE WITH THE H2<sup>V</sup> HAPLOTYPE

**Ключевые слова:** туберкулез, гаплотип, чувствительность, микобактерия, главный комплекс гистосовместимости, восприимчивость.

**Keywords:** tuberculosis, haplotype, sensitivity, mycobacterium, major histocompatibility complex, susceptibility.

Объединенный иммунологический форум 2024.

Количество страниц текста – 5,

Количество таблиц – 1,

Количество рисунков – 3.

20.03.2024

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

| Порядк<br>овый<br>номер<br>ссылки | Авторы, название публикации и источника, где она<br>опубликована, выходные данные                                                                                                                                                                      | ФИО, название<br>публикации и<br>источника на<br>английском | Полный интернет-адрес<br>(URL) цитируемой статьи или<br>ее doi. |
|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| 1                                 | Apt A.S., Avdienko V.G., Nikonenko B.V., Kramnik I.B., Moroz A.M., Skamene E. Distinct H-2 complex control of mortality, and immune responses to tuberculosis infection in virgin and BCG-vaccinated mice. Clin Exp Immunol. 94, 1993, T. 2, pp 322-9. |                                                             | DOI: 10.1111/j.1365-2249.1993.tb03451.x.                        |
| 2                                 | Apt A.S., Logunova N.N., Kondratieva T.K. Host genetics in susceptibility to and severity of mycobacterial diseases. Tuberculosis (Edinb), 2017 Sep, T. 106, pp. 1-8.                                                                                  |                                                             | DOI: 10.1016/j.tube.2017.05.004                                 |
| 3                                 | Artzt K. Relationship of the murine t-haplotypes and the H-2 complex Survey of Immunologic Research, 1983, Vol.2, no 3, pp278-280.                                                                                                                     |                                                             | DOI: 10.1007/BF02918431.                                        |

|   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |  |                                             |
|---|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|---------------------------------------------|
| 4 | Cooper A.M. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. Annu Rev Immunol, 2009,27, pp 393-422.                                                                                                                                                                                                                                                                      |  | DOI: 10.1146/annurev.immunol.021908.132703. |
| 5 | Kramnik I. B., Dietrich W.F., Demant P., Bloom B.R. Genetic control of resistance to experimental infection with virulent Mycobacterium tuberculosis. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, no Jul, Vol 18, 97(15), pp 8560-5.                                                                                                                                                  |  | DOI: 10.1073/pnas.150227197.                |
| 6 | Lyadova I.V., Eruslanov E.B., Khaidukov S.V., Yermeev V.V., Majorov K.B., Pichugin A.V., Nikonenko B.V., Kondratieva T.K., Apt A.S. Comparative analysis of T lymphocytes recovered from the lungs of mice genetically susceptible, resistant, and hyperresistant to Mycobacterium tuberculosis-triggered disease. J Immunol, 2000 Nov 15, Vol 165, no 10, pp. 5921-31. |  | DOI: 10.4049/jimmunol.165.10.5921.          |
| 7 | Radaeva T.V., Kondratieva E.V., Sosunov V.V., Majorov K.B., Apt A.S. A human-like TB in genetically susceptible mice followed by the true dormancy in a Cornell-like model. Tuberculosis (Edinb), 2008 Nov, Vol. 88, no 6, pp. 576-85.                                                                                                                                  |  | DOI: 10.1016/j.tube.2008.05.003             |

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                             |  |                                                                                                                                                                                                                     |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 8  | Radaeva T.V., Nikonenko B.V., Mischenko V.V., Averbakh M.M.Jr, Apt A.S. Direct comparison of low-dose and Cornell-like models of chronic and reactivation tuberculosis in genetically susceptible I/St and resistant B6 mice. Tuberculosis (Edinb), 2005 Jan-Mar, Vol 85 no 1-2, pp. 65-72. |  | DOI: 10.1016/j.tube.2004.09.014                                                                                                                                                                                     |
| 9  | Snell G. D. Congenic resistant strains of mice. In: Origins of Inbred Mice, Morse, H. C., eds., Academic Press, New York , 1978.                                                                                                                                                            |  | <a href="http://www.informatics.jax.org/morsebook/chapters/snell.shtml">http://www.informatics.jax.org/morsebook/chapters/snell.shtml</a>                                                                           |
| 10 | Wolrd Health Organization. Global tuberculosis report 2023. 2023 г.                                                                                                                                                                                                                         |  | <a href="https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2023">https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2023</a> |
| 11 | <a href="http://www.jax.com">www.jax.com</a>                                                                                                                                                                                                                                                |  | <a href="http://www.jax.com">www.jax.com</a>                                                                                                                                                                        |