

# РАЗЛИЧНАЯ ДИНАМИКА ЗАРАЖЕННОСТИ МИКОБАКТЕРИЯМИ КЛЕТОК В ГРАНУЛЕМАТОЗНЫХ ОБРАЗОВАНИЯХ МЫШЕЙ С ЛАТЕНТНОЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ И В ИНФИЦИРОВАННЫХ ВАКЦИНОЙ БЦЖ *IN VITRO* КУЛЬТУРАХ КОСТНОГО МОЗГА И ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ МЫШЕЙ

Е.Г. Уфимцева

ФГБУ НИИ биохимии СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

**Резюме.** Целью работы стало сравнение динамики зараженности микобактериями клеток в гранулематозных образованиях (гранулемах), полученных из костного мозга и селезенки мышей с латентной туберкулезной инфекцией, и в инфицированных вакциной БЦЖ *in vitro* культурах костного мозга и перитонеальных макрофагов интактных мышей. Анализ содержания кислотоустойчивых BCG-микобактерий в макрофагах гранулем мышей на латентном этапе туберкулезной инфекции спустя 20 дней, 1 и 2 месяца после заражения вакциной БЦЖ *in vivo* показал, что количество микобактерий в клетках варьировало как в индивидуальной гранулеме, так и между гранулемами как из одной мыши, так и из разных мышей. Однако в целом макрофаги гранулем мышей на разных стадиях латентной туберкулезной инфекции содержали единичные BCG-микобактерии в культуре *ex vivo*, тогда как при остром заражении вакциной БЦЖ культур костного мозга и перитонеальных макрофагов мышей наблюдали значительный рост числа микобактерий в клетках в процессе инфекции *in vitro*. Таким образом, макрофаги гранулем мышей на латентной стадии туберкулезной инфекции были неспособны уничтожить часть микобактерий, однако могли контролировать их размножение в клетках как *in vivo*, так и в культуре *ex vivo*, в отличие от макрофагов, полученных из разных органов интактных мышей и зараженных BCG-микобактериями *in vitro*.

**Ключевые слова:** латентная туберкулезная инфекция, вакцина БЦЖ, BCG-микобактерии, зараженность, макрофаги.

## Введение

Микобактерии туберкулеза — патогены, вызывающие как острую болезнь человека и животных, так и сохраняющие состояние латентности на протяжении многих лет жизни инфицированного хозяина. Микобактерии на латентной бессимптомной стадии инфекции могут внедряться в различные органы и ткани организма и персистировать в течение десятилетий до возможной реактивации туберкулез-

ного процесса [3, 6, 8]. Очагами латентной туберкулезной инфекции в организме человека и животных являются хронические гранулематозные воспалительные образования, называемые гранулемами и состоящие из клеток разных типов, прежде всего макрофагов [3, 6].

Макрофаги захватывают бактерии путем фагоцитоза с последующим их уничтожением в фаголизосомах в результате действия активных форм кислорода и азота, лизосомальных гидролаз и токсических пептидов в среде с низ-

---

### Автор:

Уфимцева Е.Г., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов межклеточных взаимодействий ФГБУ НИИ биохимии СО РАМН, г. Новосибирск, Россия.

### Адрес для переписки:

Уфимцева Елена Геннадьевна  
630117, Россия, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2, ФГБУ НИИ биохимии СО РАМН.  
Тел.: (913) 480-62-11. E-mail: ufim1@ngs.ru

поступила в редакцию 04.02.2014  
принята к печати 05.05.2014

© Уфимцева Е.Г., 2014

ким значением рН. Однако в модельных экспериментах с острым заражением клеток *in vitro* было показано, что микобактерии способны блокировать образование фаголизосом и выживать в клетках-хозяевах [8]. Интересно, что популяции микобактерий, растущих как в культурах макрофагов *in vitro*, так и в бесклеточной среде, были морфологически и функционально гетерогенны и содержали бактерии, устойчивые к действию различных химиотерапевтических препаратов [2, 4]. В культурах *in vitro* наблюдали различное поведение микобактерий вирулентных и авирулентных штаммов при заражении клеток [7, 11]. Микобактерии вирулентных штаммов активно размножались в клетках, тогда как аттенуированный штамм *Mycobacterium bovis* вакцины Кальметта–Герена (bacillus Calmette–Guérin, BCG, вакцина БЦЖ) и *M. tuberculosis* авирулентных штаммов обнаружили только в вакуольных компартментах клеток, где они подвергались разрушению в течение 2–7 дней наблюдения в культуре *in vitro*. Однако исследований, посвященных взаимоотношениям бактерий с клетками-хозяевами в организме животных, крайне мало [1, 9]. Следовательно, анализ содержания микобактерий в клетках гранулем до сих пор актуален для изучения развития туберкулезного процесса в различных органах и тканях животных, как на латентной стадии инфекции, так и в фазе ее реактивации.

Цель настоящей работы заключалась в сравнительном исследовании зараженности микобактериями клеток гранулем, выделенных из разных органов мышей с латентной туберкулезной инфекцией в культуре *ex vivo*, и клеток культур костного мозга и перитонеальных макрофагов, полученных от интактных мышей и инфицированных в культуре *in vitro*.

## Материалы и методы

**Животные.** В работе использовали самцов мышей линии Balb/c в возрасте двух месяцев к началу инфицирования или получения культур клеток. Мышей получили из питомника Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск, Россия) и содержали в виварии в соответствии со всеми нормами ухода за животными.

**Бактерии** вакцинного штамма *M. bovis* фабричного производства (вакцина БЦЖ-1, ООО «Аллерген», г. Ставрополь, ООО «Медгамал», Москва, Россия) использовали в дозе 0,5 мг на мышью в 0,9% растворе NaCl. Мышей инфицировали в хвостовую вену в количестве 100 мкл суспензии на мышью или, в случае 20 дней инфекции, в перитонеальную полость в количестве 200 мкл суспензии на мышью.

**Выделение гранул и культивирование *ex vivo*.** Гранулемы из костного мозга бедренных костей и/или селезенок мышей изолировали спу-

стя 20 дней, 1 и 2 месяца после инфицирования вакциной БЦЖ по методу, описанному в [10]. Все реактивы для выделения и культивирования клеток получены из «Биолот» (Санкт-Петербург, Россия).

**Получение культур клеток, их культивирование и инфицирование *in vitro*.** Культуры клеток костного мозга из бедренных костей и макрофагов из перитонеальной полости четырех интактных мышей, полученные по стандартным методикам, в течение суток культивировали в лунках ( $3 \times 10^5$  кл./лун.) 24-луночных планшетов (Orange Scientific, Бельгия) с покровными стеклами на дне в 0,5 мл ростовой среды, как и клетки гранулем мышей. После удаления среды к клеткам внесли вакцину БЦЖ-1 в количестве 0,04 мг/лун. в 200 мкл ростовой среды на 1 ч при +37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Клетки двукратно отмыли от вакцины в среде RPMI 1640 и культивировали в ростовой среде при +37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>.

**Окраска клеток на микобактерии.** После 2–5 суток в культуре *ex vivo* клетки гранулем на покровных стеклах после удаления ростовой среды фиксировали в 4% растворе формалина на фосфатном буфере (рН 7,4) в течение 10 мин при комнатной температуре. Аналогично поступали с клетками культур костного мозга и перитонеальных макрофагов мышей спустя 4, 24, 48, 72, 96 и 120 ч от начала инфицирования вакциной БЦЖ *in vitro*. Препараты с клетками стандартно окрашивали по методу Циля–Нильсена, докрашивали в 1% растворе метилового синего (Sigma, USA).

**Микроскопия.** Цитологические препараты исследовали в Центре коллективного пользования (ЦКП) микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН (г. Новосибирск, Россия) как описано в [1]. Клетки культур костного мозга и перитонеальных макрофагов мышей анализировали на 25–70 полях зрения.

**Статистическую обработку** результатов провели с использованием пакета программ MS Excel 2010 (Microsoft). Достоверность различий оценили по t-критерию Стьюдента и считали значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты

**Зараженность микобактериями клеток гранулем мышей с латентной туберкулезной инфекцией.** Состав и содержание клеток с микобактериями в гранулемах из селезенок мышей, выделенных спустя 1 месяц (3 мыши под номерами 3, 4, 5) и 2 месяца (9 мышей под номерами 4, 8, 9, 10, 13, 21, 22, 23, 24) после инфицирования вакциной БЦЖ, описаны в [1]. Клеточный состав гранулем из костного мозга и селезенок мышей спустя 20 дней после заражения *in vivo* (2 мыши под номерами 1 и 2) соответствовал ранее исследованным гранулемам [1] и был представ-

лен макрофагами, дендритными клетками, лимфоцитами и фибробластами. Для гранулем костного мозга было характерно присутствие большого числа нейтрофилов. Монослойные культуры, полученные *ex vivo* из индивидуальных гранулем, изолированных из органов мышей спустя 20 дней, 1 и 2 месяца после инфицирования вакциной БЦЖ, будем называть двадцатидневными, одномесячными и двухмесячными гранулемами (20д-Гран, 1м-Гран и 2м-Гран) соответственно. К моменту выделения гранулем ни у одной из мышей не наблюдали острой туберкулезной инфекции, следовательно, мыши находились на латентной стадии ее развития.

Содержание в клетках гранулем мышей кислотоустойчивых VCG-микобактерий с неповрежденной клеточной стенкой оценили с помощью окраски Циля–Нильсена (рис. 1а–в). Более половины всех исследованных 20д-Гран из селезенок мышей имели клетки с микобактериями: 62,5 и 58,3% (мыши 1 и 2 соответственно). Для гранулем, выделенных из костного мозга тех же мышей, этот показатель был выше: 90,9 и 75,2% соответственно. VCG-микобактерии обнаружили в  $14,9 \pm 2,1$  и  $14,55 \pm 1,5\%$  макрофагах 20д-Гран из селезенок и в  $4,91 \pm 0,42$  и  $4,7 \pm 0,5\%$  макрофагах 20д-Гран

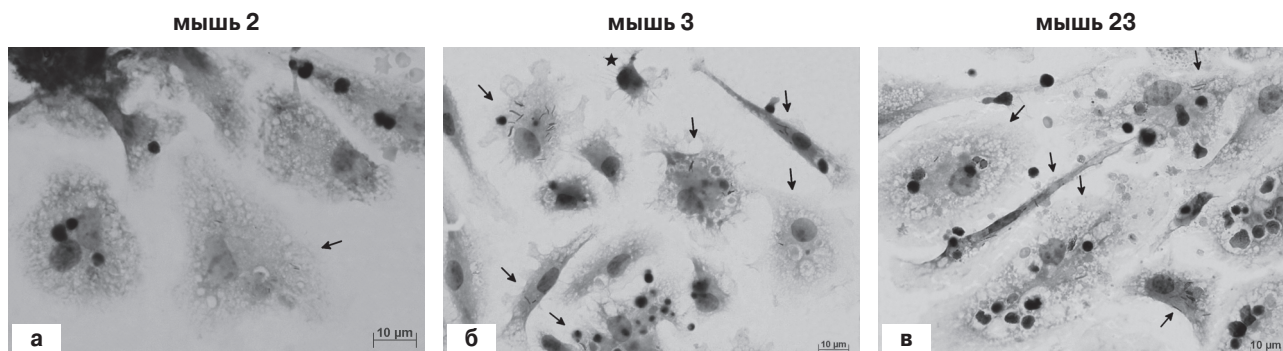
из костного мозга мышей 1 и 2 соответственно. В нейтрофилах 20д-Гран мышей кислотоустойчивых бацилл не наблюдали.

Анализ содержания VCG-микобактерий в макрофагах показал, что количество кислотоустойчивых микобактерий в клетках варьировало как в индивидуальной гранулеме, так и между гранулемами как из одной мыши, так и из разных мышей. В таблице представлены данные по количеству микобактерий в макрофагах гранулем мышей на разных сроках латентной инфекции. На рис. 2 и 3 суммированы данные, полученные при исследовании гранулем из костного мозга и селезенок мышей с двадцатидневной (2 мыши,  $n = 29$  и  $n = 62$  соответственно), одномесячной (3 мыши,  $n = 84$ ) и двухмесячной (9 мышей,  $n = 323$ ) инфекцией вакциной БЦЖ. В гранулемах наблюдали макрофаги как с одной VCG-микобактерией, так и с двумя или более микобактериями (до 100 бацилл), которые могли располагаться или поодиночке или в группах размножающихся бактерий (рис. 1а–в). Однако в целом гранулемы мышей на разных сроках латентной инфекции имели в основном клетки с единичными микобактериями (рис. 2). Аналогично, количество макрофагов с минимальным числом VCG-микобактерий в клетках (от одной до четырех)

**ТАБЛИЦА. КОЛИЧЕСТВО МАКРОФАГОВ С VCG-МИКОБАКТЕРИЯМИ (VCG) В ГРАНУЛЕМАХ (Гран), ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ КОСТНОГО МОЗГА (КМ) И СЕЛЕЗЕНОК МЫШЕЙ СПУСТЯ 20 ДНЕЙ (20д), 1 МЕСЯЦ (1м) И 2 МЕСЯЦА (2м) ПОСЛЕ ИНФИЦИРОВАНИЯ ВАКЦИНОЙ БЦЖ *IN VIVO***

Мыши	n*	Макрофаги с VCG-микобактериями					
		1_4 VCG		5_9 VCG		> 10 VCG	
		n**	%***	n**	%***	n**	%***
1 (20дКМ-Гран)	20	20	97,09±2,0	2	2,92±2,0	–	–
2 (20дКМ-Гран)	9	9	100,0	–	–	–	–
1 (20д-Гран)	20	20	95,83±2,64	3	4,17±2,64	–	–
2 (20д-Гран)	42	41	94,05±2,87	4	3,17±1,52	1	2,38±2,37
3 (1м-Гран)	34	32	72,4±5,02	19	12,43±2,3	15	15,32±4,5
4 (1м-Гран)	43	42	75,89±3,3	29	12,88±1,9	20	10,41±2,7
5 (1м-Гран)	7	6	76,51±13,1	3	20,6±13,5	–	–
4 (2м-Гран)	79	78	83,43±2,42	34	10,04±1,6	22	6,32±1,72
8 (2м-Гран)	34	29	76,61±6,04	15	18,19±5,5	7	5,34±3,0
9 (2м-Гран)	50	46	77,26±4,32	24	13,57±3,1	13	11,82±3,9
10 (2м-Гран)	27	26	72,49±5,81	13	12,66±3,4	10	12,49±4,4
13 (2м-Гран)	30	27	67,15±4,62	19	21,21±4,8	11	11,92±3,4
21 (2м-Гран)	9	9	74,54±6,68	6	22,68±6,6	1	2,78±2,69
22 (2м-Гран)	27	25	74,94±6,01	8	15,44±5,6	8	12,56±4,6
23 (2м-Гран)	52	52	74,68±1,73	49	17,11±1,6	40	8,3±0,96
24 (2м-Гран)	15	12	69,75±10,2	7	22,86±9,0	4	5,17±2,57

**Примечания.** \* Общее число гранулем с VCG-содержавшими макрофагами; \*\* количество гранулем с макрофагами, содержащими определенное число VCG-микобактерий; \*\*\* среднее число макрофагов с определенным количеством VCG-микобактерий в процентах от общего числа всех VCG-содержавших макрофагов гранулем с указанием стандартной ошибки.



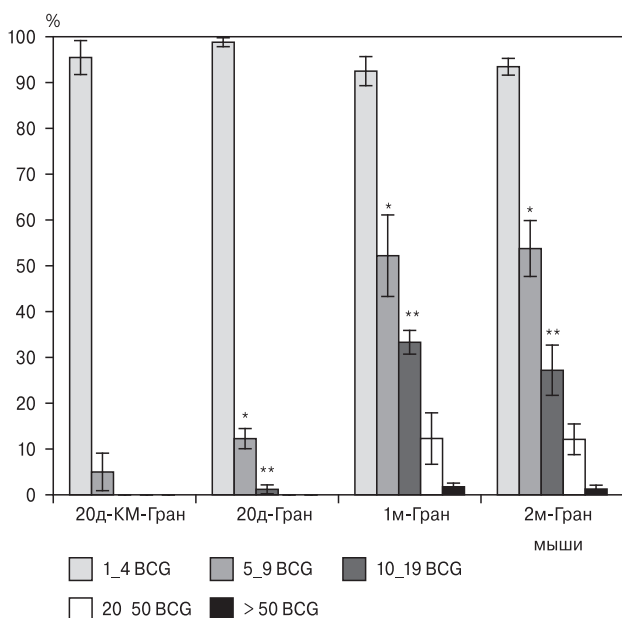
**Рисунок 1. Клетки в гранулемах из селезенок мышей спустя 20 дней (а), 1 месяц (б) и 2 месяца (в) после заражения *in vivo* в культуре *ex vivo***

Окраска Циля–Нильсена. Макрофаги, дендритные клетки с BCG отмечены черными стрелками и звездочками соответственно. Масштабная черта 10 мкм.

было подавляющим в гранулемах исследованных животных (рис. 3). Если 20д-Гран мышей с клетками, содержащими повышенное количество микобактерий (пять и больше), были редки, то в мышях с одномесечной и двухмесечной инфекцией количество таких гранулем значительно увеличилось (рис. 2). В 1м-Гран и 2м-Гран также выявили повышение числа макрофагов с 5–9 BCG-микобактериями в клетках по сравнению с 20д-Гран (рис. 3). Однако клетки с 10 и более микобактериями в гранулемах исследованных мышей были относительно редкими (табл., рис. 3). Макрофаги с 50–100 бациллами наблюдали крайне редко в единичных гранулемах (рис. 2 и 3). Интересно, что

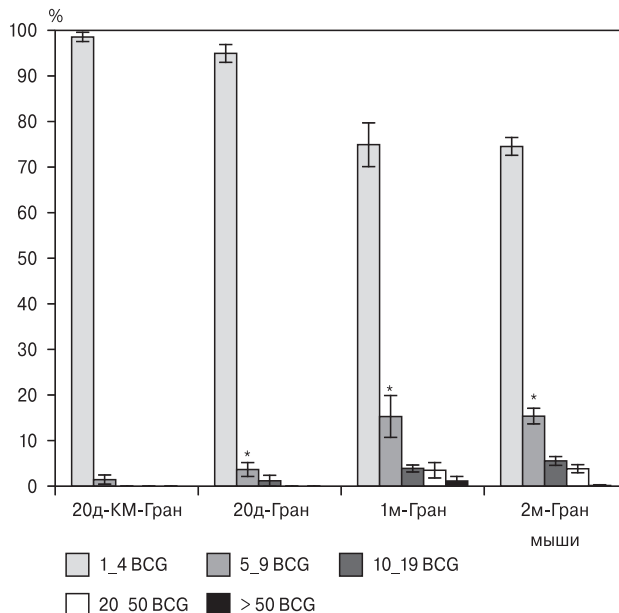
при индивидуальной вариабельности изученных показателей по гранулемам разных мышей с одно- и двухмесечной инфекцией (табл.), их суммарные распределения оказались однотипными для исследованных групп животных (рис. 2 и 3).

Инфицированность микобактериями клеток культур костного мозга и перитонеальных макрофагов мышей проанализировали на разных сроках от начала заражения вакциной БЦЖ *in vitro* (рис. 4а–б и 5а–б). Если на 4 ч инфекции клетки-предшественники макрофагов костного мозга содержали в среднем по две микобактерии, то в дальнейшем наблюдали снижение числа таких клеток с постепенным увеличением количества макрофагов с числом



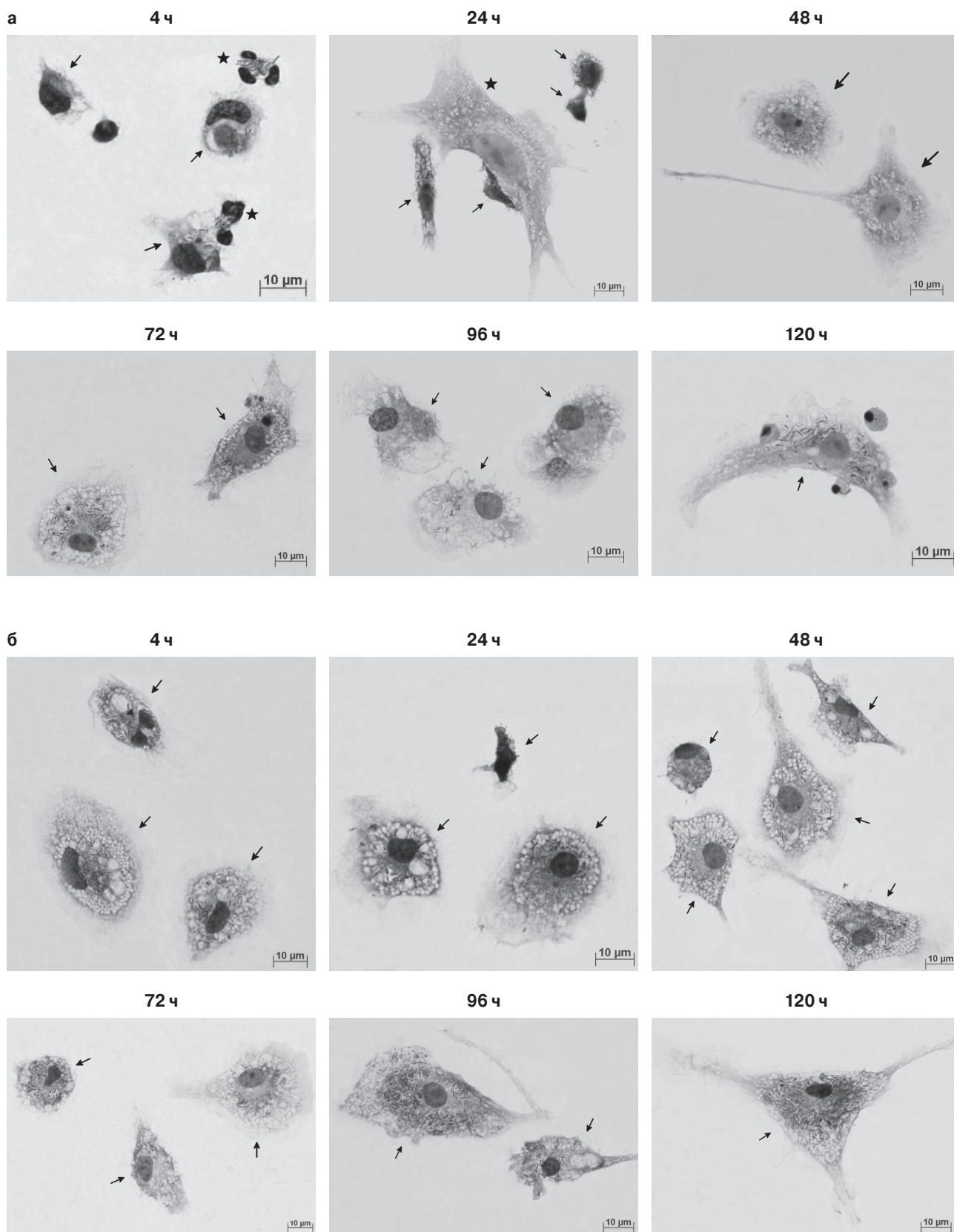
**Рисунок 2. Среднее число гранулем (Гран), полученных из костного мозга (КМ) и селезенок мышей спустя 20 дней (20д), 1 месяц (1м) и 2 месяца (2м) после заражения *in vivo*, с макрофагами с определенным числом BCG-микобактерий (BCG)**

\*P < 0,01, \*\*P < 0,001.



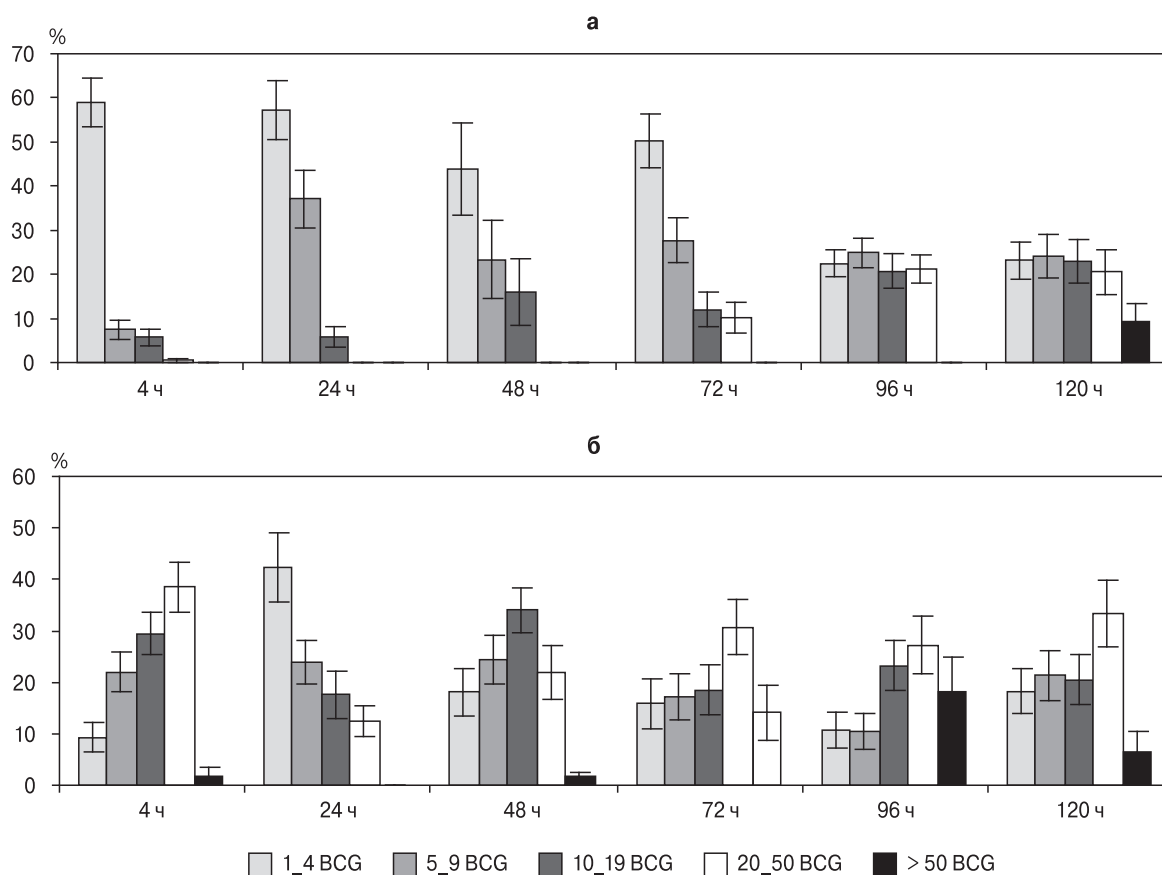
**Рисунок 3. Среднее число макрофагов с определенным числом BCG-микобактерий (BCG) в гранулемах (Гран), полученных из костного мозга (КМ) и селезенок мышей спустя 20 дней (20д), 1 месяц (1м) и 2 месяца (2м) после заражения *in vivo***

\*P < 0,01.



**Рисунок 4. Клетки с BCG-микобактериями в культурах костного мозга (а) и перитонеальных макрофагов (б) мышей на разных сроках инфекции вакциной БЦЖ *in vitro***

Окраска Циля–Нильсена. На макрофаги с BCG указывают черные стрелки. (а) Нейтрофилы с BCG (4 ч) и фибробласт без BCG (24 ч) отмечены черными звездочками. Масштабная черта 10 мкм.



**Рисунок 5. Среднее число макрофагов костного мозга (а) и перитонеальных макрофагов мышей (б) с определенным числом BCG-микобактерий (BCG) на разных сроках инфекции вакциной БЦЖ *in vitro***

бацилл больше 10. На 120 ч анализа значительное число макрофагов в популяции клеток костного мозга характеризовалось повышенной зараженностью микобактериями (рис. 4а и 5а). Параллельно обнаружили снижение числа макрофагов с одиночными бациллами.

В культурах костного мозга на 4 ч инфекции в  $33,07 \pm 5,24$ ,  $13,36 \pm 3,51$  и  $2,14 \pm 0,26\%$  нейтрофилов обнаружили от 1 до 4, от 5 до 9 и от 10 до 19 BCG-микобактерий, соответственно (рис. 5а). Начиная с 24 ч анализа, нейтрофилов в культурах костного мозга почти не наблюдали. Единичные выявленные нейтрофилы кислотоустойчивых бацилл не имели. Популяции клеток костного мозга на 24–120 ч инфекции *in vitro* были представлены в основном макрофагами с разным числом микобактерий, в значительно меньшем количестве — фибробластами, изредка содержащими единичные бациллы, и дендритными клетками без BCG-микобактерий.

В культурах перитонеальных макрофагов мышей, инфицированных вакциной БЦЖ *in vitro*, повышенную зараженность большого числа клеток кислотоустойчивыми бациллами обнаружили сначала на 4 ч анализа (рис. 4б и 5б). Однако на 24 ч инфекции количество таких клеток значительно снизилось, вероятно

в результате их гибели путем некроза, на что указывала характерная морфология некоторых клеток, выявленных в исследуемой популяции на 4 ч инфекции. В процессе дальнейшего анализа (48–96 ч) наблюдали постепенное увеличение числа жизнеспособных макрофагов с повышенным содержанием микобактерий параллельно со снижением количества клеток с единичными бациллами (рис. 4б и 5б). Некоторые фибробласты в популяциях перитонеальных макрофагов на 96 и 120 ч анализа содержали единичные бактерии. В дендритных клетках всех исследованных культур BCG-микобактерий не обнаружили.

В целом совокупность полученных данных указывает на активный и, вероятно, репликативный рост числа кислотоустойчивых микобактерий в макрофагах популяций клеток костного мозга и перитонеальных макрофагов мышей в течение 120 ч инфекции *in vitro*. Таким образом, макрофаги гранулем мышей с латентной туберкулезной инфекцией хотя и были неспособны уничтожить часть микобактерий в клетках, но могли контролировать их размножение как *in vivo*, так и в культуре *ex vivo*, в отличие от макрофагов, зараженных BCG-микобактериями *in vitro*.

## Обсуждение

Исследование содержания VCG-микобактерий в макрофагах гранулем мышей на латентном этапе туберкулезной инфекции показало, что при индивидуальной вариабельности количества бактерий в клетках гранулем из разных мышей они имели в основном единичные бациллы. В то же время при заражении вакциной БЦЖ *in vitro* клеток культур костного мозга и перитонеальных макрофагов мышей наблюдали, наоборот, значительный рост числа бацилл в течение 5 суток инфекции. Следовательно, макрофаги гранулем мышей могли контролировать размножение микобактерий в клетках, в отличие от макрофагов интактных мышей, которые оказались не способны ограничить прогресс инфекции при заражении *in vitro*. Известно, что провоспалительные цитокины IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  и IL-1, синтезируемые макрофагами, лимфоцитами и другими клетками иммунной системы животных, осуществляют контроль туберкулезной инфекции [3, 6, 8]. Возможно, анализ их продукции позволит определить факторы, влияющие на инфекционный процесс в разных клеточных системах.

Распределение как по количеству гранулем с макрофагами, содержащими определенное число VCG-микобактерий, так и по количеству макрофагов с разным количеством микобактерий в клетках, отличалось между мышами с двадцатидневной и мышами с одно- и двухмесячной инфекцией вакциной БЦЖ *in vivo*. Однако эти распределения были однотипными для гранулем, изолированных из селезенок мышей спустя 1 и 2 месяца после инфицирования. Полученные данные согласуются с исследованиями на основе бактериологического метода определения содержания бацилл в различных органах и тканях мышей [9], в которых установили стабилизацию количества бацилл к четвертой неделе после заражения животных и сохранение его на постоянном уровне в последующие месяцы латентной инфекции. Причины роста и стабилизации числа микобактерий на разных сроках туберкулезной инфекции мышей пока не известны.

В исследованиях [7, 11] обнаружили элиминацию VCG-микобактерий в клетках различных миелоидных линий мыши и человека в течение 2–7 суток анализа после их инфицирования *in vitro*, тогда как микобактерии вирулентных

штаммов, наоборот, активно размножались в зараженных клетках. В результате предположили [10, 11], что для внутриклеточного размножения микобактерий необходим RD1 локус генов, кодирующий белки ESX-1 секреторной системы. Атенуированный фенотип VCG-микобактерий также связывают с делецией района RD1, характерного для ДНК вирулентных *M. bovis* и *M. tuberculosis*, но отсутствующего в геноме всех известных вакцинных штаммов VCG [5, 11]. Однако в проведенном нами исследовании VCG-микобактерии вакцинного штамма БЦЖ-1, как известно [5], с делецией RD1 локуса активно размножались в некоторых макрофагах гранулем мышей с латентной туберкулезной инфекцией и в большинстве клеток культур, инфицированных *in vitro*. Заметим, что макрофаги с повышенным содержанием бацилл в основном не имели морфологических признаков гибели ни по пути некроза, ни по механизмам апоптоза. Необходим поиск факторов, влияющих на рост и выживаемость микобактерий, в том числе вакцинных штаммов, как в клетках культур *in vitro*, так и в организме-хозяине с латентным туберкулезным процессом.

В заключение отметим, что исследованная нами внутриклеточная персистенция VCG-микобактерий в макрофагах гранулем зараженных *in vivo* мышей и в инфицированных *in vitro* клетках из разных органов мышей представляет интересный пример специфических взаимодействий между микро- и макроорганизмом как на стадии латентной инфекции, так и при остром заражении клеток. Предложенные экспериментальные модели на основе использования микобактерий вакцины БЦЖ, при работе относительно безопасной для человека, перспективны не только для исследования взаимоотношений внутриклеточных патогенов с клетками-хозяевами туберкулезной инфекции на разных ее стадиях, но и, вероятно, для оценки действия антимикобактериальных препаратов на клетки с различной динамикой зараженности VCG-микобактериями.

## Благодарности

Автор выражает благодарность сотрудникам ЦКП ИЦиГ СО РАН С.И. Байбородину и Т.Е. Алешинной за помощь в работе, академику РАМН Л.Е. Панину за внимание и поддержку данного исследования.

**DIFFERENT CHARACTERISTICS OF INFECTION WITH MYCOBACTERIA IN GRANULOMA CELLS FROM MICE WITH LATENT TUBERCULOSIS INFECTION AND IN BONE MARROW AND PERITONEAL MACROPHAGES AFTER BCG VACCINE APPLICATION *IN VITRO***

Ufimtseva E.G.

*Institute of Biochemistry, SB RAMS, Novosibirsk, Russian Federation*

**Abstract.** The aim of the study was to compare the content of BCG-mycobacteria in granulomas obtained from various organs of BALB/c mice with latent tuberculosis after *in vivo* exposure to BCG vaccine and in mouse bone marrow and peritoneal macrophages after BCG infection *in vitro*. The granuloma cells obtained from mice through 20 days, one and two months after their BCG-infecting *in vivo* were differed with respect to both the number of granulomas with macrophages containing the defined numbers of BCG-mycobacteria and the quantity of cells with the defined numbers of bacilli in granulomas. However, in the preparations obtained from each mice, granuloma macrophages contained solitary BCG-mycobacteria. At the same time, a shorter acute infection of mouse peritoneal and bone marrow macrophages by BCG vaccine resulted in considerable growth of bacilli in the host cells for 5 days in the culture *in vitro*. Therefore, granuloma macrophages could control BCG infection both in mice with latent tuberculosis *in vivo* and in the *ex vivo* culture, on the contrary, the bone marrow and peritoneal macrophages were not capable to control the BCG infection in the culture *in vitro*.

**Key words:** latent tuberculosis infection, *Bacillus Calmette–Guérin* vaccine, infectiousness of cells with BCG-mycobacteria, macrophages.

**Author:**

**Ufimtseva E.G.** ✉, PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Mechanisms of Cell-Cell Interactions, Institute of Biochemistry, RAMS, Siberian Branch.  
630117, Russian Federation, Novosibirsk, Timakova str., 2, Institute of Biochemistry of the Siberian Branch of the RAMS.  
Phone: (913) 480-62-11. E-mail: ufim1@ngs.ru.

Received 04.02.2014

Accepted 05.05.2014

**Список литературы/References**

1. Уфимцева Е.Г. Клетки с микобактериями в гранулематозных образованиях мышей на латентной стадии туберкулезной инфекции в культуре *ex vivo* // Инфекция и иммунитет. 2013. Т. 3, № 3. С. 229–234. [Ufimtseva E.G. Kletki s mikobakteriyami v granulematoznykh obrazovaniyakh myshei na latentnoi stadii tuberkuleznoi infektsii v kul'ture *ex vivo* [The cells with mycobacteria in granulomatous inflammatory aggregates from mice with latent tuberculous infection in *ex vivo* culture]. *Infektsiya i immunitet = Infection and Immunity*, 2013, vol. 3, no. 3, pp. 229–234.]
2. Adams K.N., Takaki K., Connolly L.E., Wiedenhoft H., Winglee K., Humbert O., Edelstein P.H., Cosma C.L., Ramakrishnan L. Drug tolerance in replicating mycobacteria mediated by a macrophage-induced efflux mechanism. *Cell*, 2011, vol. 145, no. 1, pp. 39–53.
3. Ahmad S. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin. Develop. Immun.*, 2011, vol. 2011, 17 p.
4. Aldridge B.B., Fernandez-Suarez M., Heller D., Ambravaneswaran V., Irimia D., Toner M., Fortune S.M. Asymmetry and aging of mycobacterial cells lead to variable growth and antibiotic susceptibility. *Science*, 2012, vol. 335, no. 6064, pp. 100–104.
5. Behr M.A., Wilson M.A., Gill W.P., Salamon H., Schoolnik G.K., Rane S., Small P.M. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science*, 1999, vol. 284, no. 5419, pp. 1520–1523.
6. Flynn J.L., Chan J., Lin P.L. Macrophages and control of granulomatous inflammation in tuberculosis. *Mucos. Imm.*, 2011, vol. 4, no. 3, pp. 271–278.
7. Gutierrez M.G., Master S.S., Singh S.B., Taylor G.A., Colombo M.I., Deretic V. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell*, 2004, vol. 119, no. 6, pp. 753–766.
8. Jordao L., Vieira O.V. Tuberculosis: new aspects of an old disease. *Int. J. Cell Biol.*, 2011, vol. 2011, 13 p.
9. Mucoz-Elnas E.J., Timm J., Botha T., Chan W.-T., Gomez J.E., McKinney J.D. Replication dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* in chronically infected mice. *Infect. Immun.*, 2005, vol. 73, no. 1, pp. 546–551.
10. Tobin D.M., Ramakrishnan L. Comparative pathogenesis of *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell. Microbiol.*, 2008, vol. 10, no. 5, pp. 1027–1039.
11. Van der Wel N., Hava D., Houben D., Fluitsma D., van Zon M., Pierson J., Brenner M., Peters P.J. *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell*, 2007, vol. 129, no. 7, pp. 1287–1298.