

Лысенко А.П., доктор ветеринарных наук, профессор<sup>1</sup>

Кучвальский М.В., аспирант<sup>2</sup>

Якобсон Е.И., магистрант<sup>2</sup>

Красникова Е.Л., научный сотрудник<sup>1</sup>

Полоз А.И., ветеринарный врач<sup>3</sup>

Аникевич Н.Ю., студент<sup>2</sup>

<sup>1</sup>РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселеского», г. Минск

<sup>2</sup>Белорусский государственный университет, г. Минск

<sup>3</sup>Ветеринарная клиника «Главное Хвост», г. Минск

## НЕОПЛАСТИЧЕСКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ МЕЛКИХ ЖИВОТНЫХ И СКРЫТАЯ ТУБЕРКУЛЕЗНАЯ ИНФЕКЦИЯ

### Резюме

В опухолях мелких домашних животных обнаружены антигены микобактерий туберкулеза (МБТ), микрогранулемы с кислотоустойчивыми зёрнами, некислотоустойчивые (НКУ) МБТ с дефектной клеточной стенкой (СВД). Из опухолей во всех случаях выделены СВД МБТ. Изоляты по морфологии и антигенному составу не отличались как друг от друга, так и от изолятов из культур клеток опухолей человека (Kasumi, Jurkat, Hela), имели до 26 общих антигенов с типичными МБТ, были резистентны к антибиотикам, влияющим на синтез клеточной стенки. МБТ – универсальный внутриклеточный патоген с уникальной фильтруемостью и «бессмертностью» – может рассматриваться как наиболее вероятный этиологический агент онкогенеза исходя из гипотезы: поглощение ДНК стареющих и некротических нормальных клеток персистирующими микроорганизмами, гибридизация их ДНК с ДНК хозяина с последующей экспрессией гибридного генома превращает нормальные клетки в раковые.

**Ключевые слова:** латентный туберкулез, онкогенез, микобактерии туберкулеза, дефектная клеточная стенка.

### Summary

An antigens of tuberculosis mycobacteria (MTB), microgranulomas with acid-fast grains, cell wall deficient (CWD) MTB were found in tumors of small domestic animals. CWD MTB were isolated from tumor in all cases. The isolates did not differ in morphology and antigenic composition, either from each other or from isolates from human tumor cell cultures (Kasumi, Jurkat, Hela), had up to 26 common antigens with typical MTB, were resistant to antibiotics affecting cell wall synthesis. MTB as universal intracellular pathogen with unique filterability and «immortality» can be considered as the most likely etiological agent of oncogenesis based on the hypothesis following: DNA absorption of aging and necrotic normal cells by persistent microorganisms, hybridization of their DNA with host DNA with subsequent expression of the hybrid genome turns normal cells into cancer ones.

**Keywords:** latent tuberculosis, oncogenesis, mycobacterium tuberculosis complex, deficient cell wall.

Поступила в редакцию 08.04.2022 г.

### ВВЕДЕНИЕ

Выдающийся хирург Теодор Бильрот одним из первых высказал предположение о туберкулезной природе опухолей и твердых злокачественных лимфом в частности [1]. В конце XIX – начале XX века описаны случаи перехода туберкулезного процесса с клетками Langhans'a в карциному [2], а в опухолях обнаружены микобак-

терии туберкулеза (МБТ) и зёрна Much'a [3–6]. В современном обзоре 211 научных статей [7] сделан вывод о высокой вероятности ассоциации туберкулезной инфекции и опухолей. Однако, как и в начале XX века, дискуссионным остается вопрос, почему МБТ в одном случае вызывают туберкулез, а в другом могут быть вероятной причиной развития опухолей. Предпо-

жили, что существуют разные формы МБТ [1], и вероятным онкогеном назван фильтрующий туберкулезный вирус [8]. Кроме того, из опухолей были выделены плеоморфные частично кислотоустойчивые (ЧКУ) бактерии, трансформирующиеся в процессе роста в коккоподобные, палочковидные, дрожжеподобные, спороподобные формы, способные проходить через стерилизующие фильтры [9, 10]. В 1926 г. Н. Swanу заметил, что такие изоляты («Cancer Bacteria») похожи на трансформированные под действием химических соединений не-кислотоустойчивые (НКУ) культуры МБТ [11]. Позже были установлены характерные свойства «Cancer Bacteria»: ЧКУ, вариабельность окраски по Граму, изменение морфологии при культивировании, необходимость специальных сред для первичной изоляции и интенсивный рост в пересевах, способность проходить через стерилизующие (0,22 мкм) фильтры, резистентность к прогреванию при температуре 90 °С и к пенициллину, общие антигены с МБТ, отсутствие индукции гиперчувствительности к туберкулину [12, 13, 14]. Микроорганизмы с такими свойствами выделяли не только из опухолей людей, но и при саркомах, аденокарциномах, лейкозах у крыс и мышей [15, 16, 17]. Для признания их этиологической роли по III постулату Коха было необходимо воспроизведение заболевания на животных. Изоляты из опухолей вызывали у взрослых мышей неопределенные пролиферативные процессы и только в 3–4 % – опухоли [16–18], т.е. традиционный подход воспроизведения инфекционных заболеваний не позволил получить убедительные результаты из-за медленного развития неопластических процессов. В связи с этим для биопробы стали использовать новорожденных мышей и вести наблюдение за ними в течение всей жизни. Такие исследования показали, что, в частности, изолят из переносимой саркомы мыши в 4,2 раза чаще вызывал развитие опухолей, чем они спонтанно появлялись у животных контрольной группы [18].

Оппоненты инфекционной природы опухолей или не замечали полученных ре-

зультатов, или считали, что многие микроорганизмы могут персистировать в опухолях, находя там благоприятные условия. Лишь в последние 10–15 лет благодаря появлению новых методов установлено, что персистенция МБТ в опухолях, чаще в L-форме (cell wall deficient – CWD), сопровождается интеграцией фрагментов их генома в геном хозяина [19–21], синтезом канцерогенного актиномина D и хориогонадотропного гормона (HCG), стимулирующего неконтролируемый рост клеток [22]. В эксперименте было доказано, что хроническая туберкулезная инфекция может индуцировать клеточную дисплазию и развитие плоскоклеточного рака легких. В неконтролируемом росте клеток играет роль повреждение ДНК и эпидермальный фактор роста, синтезируемый инфицированными макрофагами [23].

В 1967 г. McKay et al. сообщили о выделении из лимфатических узлов коров, больных лимфосаркомой, плеоморфных микроорганизмов с частичной и полной кислотоустойчивостью [24]. В настоящее время подтверждена не только персистенция CWD МБТ у лейкозных коров [25], но CWD МБТ выделены из культуральной жидкости клеток почки эмбриона овцы, инфицированных вирусом бычьего лейкоза (FLK-BLV) [26], из культур клеток миелобластов большого острого миелоидного лейкозом (Kasumi-1), Т-лимфоцитов человека с Т-лимфобластной лейкемией (Jurkat) [27], а также Hela [28]. Известно, что мыши, крысы, кошки, обладают достаточно высокой устойчивостью к туберкулезу [29] и у них чаще отмечается латентная туберкулезная инфекция. В связи с этим **целью работы** было исследование опухолей мелких домашних животных с использованием методов детекции CWD МБТ и сравнение изолятов с изолятами из культур опухолевых клеток.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали ткани аденокарциномы молочной железы кошки, крысы, самки хомяка, опухоли толстого кишечника крысы, отобранные при оперативном удале-

нии, а также взятую с соблюдением стерильности сыворотку крови кота, реагировавшую с ImmunoRun FeLV, для обнаружения вируса лейкемии кошек (FeLV+).

**Окраска отпечатков тканей и изолятов.** Мазки готовили общепринятым методом, окрашивали по Kinyoun и дифференцирующим иммунопероксидазным (ДИП) методом с использованием аффинно очищенных антител к *M. bovis* [30]. Микроскопию проводили на Olympus B51X.

**Посев тканей.** Гомогенаты тканей центрифугировали при 500g для осаждения крупных фрагментов. К части надосадочной жидкости добавляли равный объем 6%-ной щавелевой кислоты и центрифугировали при 3000g в течение 15 мин. Часть осадков суспендировали в 0,9%-ном растворе NaCl и высевали на среду Гельберга. Вторую часть осадков суспендировали в стимуляторе роста ВКГ (1:3) [31], инкубировали 24 ч при температуре 37 °С и высевали на среду MucCel DW [27, 28]. Часть гомогенатов последовательно фильтровали через Millex® GP 0.45 мкм и 0.22 мкм. Фильтраты (0.22 мкм), а также стерильно отобранную сыворотку крови смешивали со стимулятором роста ВКГ (1:3), инкубировали 24 ч при температуре 37 °С и высевали на пробирки со средой MucCel DW. Посевы инкубировали при температуре 37 °С. При отсутствии роста через 1–2 дня делали «слепые» пересевы на среду MucCel DW.

**Полимеразная цепная реакция (ПЦР).** Для выделения ДНК бактериальную массу изолятов (0,2–0,5 мг/мл) прогревали (5 мин, 95 °С) в лизирующем буфере. ДНК выделяли на колонках с сорбентом (ИБОХ НАНБ) и исследовали с праймерами к локусам, специфичным для видов рода *Mycobacterium*: 16s RNA, MPB64, MPB 70, dev, а также Is 6110 и gyrB в ПЦР-RT. Амплификацию проводили на C1000TM ThermoCycler (BioRad) и CFX96™ Real-Time System (BioRad).

**Антигенный состав** изолятов, дезинтегрированных на Bandelin Sonopuls 2400 (8х, 4 цикла по 5 мин) изучали в реакции иммунодиффузии (РИД) и в ракетном иммуноэлектрофорезе (РИЭФ, Axelsen N. et

al., 1977) с антисыворотками к соникатам CWD штаммов *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv, *M. bovis* 8, изолятов CWD МБТ «Is DchHO» (из крови человека, больного саркомой), «Is FLK-BLV 1.30» (из культуральной жидкости FLK-BLV серии 30) [26]. Контролями служили CWD *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv, изолят из крови лейкозной коровы («Is BLV+52») [25], CWD МБТ «Is Hela is 6» и «Is Hela 3 kDa» (из культуры клеток Hela [27, 28]), «Is HC ox» (из FLK-BLV серии HC) [26], CWD МБТ из лимфатического узла коровы, больной туберкулезом «Is *M. bovis* 24».

Для **иммуноблоттинга** бактериальную массу изолятов прогревали 7 мин при температуре 98 °С в буферном растворе для нанесения образцов (4х) и подвергали электрофорезу (ЭФ) в 10%-ном (15%-ном) ПААГ-ДСН (Laemmli, 1970). Перенос осуществляли на Trans-blot SD. Для иммуноблоттинга использовали антисыворотки к *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv, *M. bovis* 8, к CWD *M. tuberculosis*, а также 2 сыворотки крови коров (РИД BLV+), истощенные антигенами *Staph. aureus*, *Strept. epidermidis*, *E. coli*, *Salm. dublin*, *Klebs. pneumoniae*.

**Биологическая проба.** Изолятами из опухолей молочной железы кошки «Is cat 0.22», толстого кишечника крысы «Is rat 0.22», а также CWD *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv были подкожно (по 1 мг) заражены по 2 белые мыши. Через 1 месяц гомогенаты легких, печени, селезенки после деконтаминации 6%-ной щавелевой кислотой, инкубации в стимуляторе роста были посеяны на среду MucCel DW.

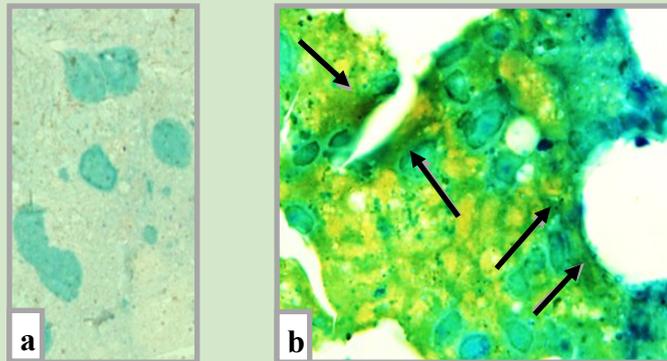
**Лекарственную чувствительность изолятов** определяли в диффузионном тесте на среде MucCel DW с использованием стандартных дисков с антибиотиками (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В отпечатках опухолевых тканей, окрашенных ДИП-методом, во всех случаях были обнаружены участки и клетки коричневого цвета, что указывало на связывание антител к *M. bovis*, т.е. на присут-

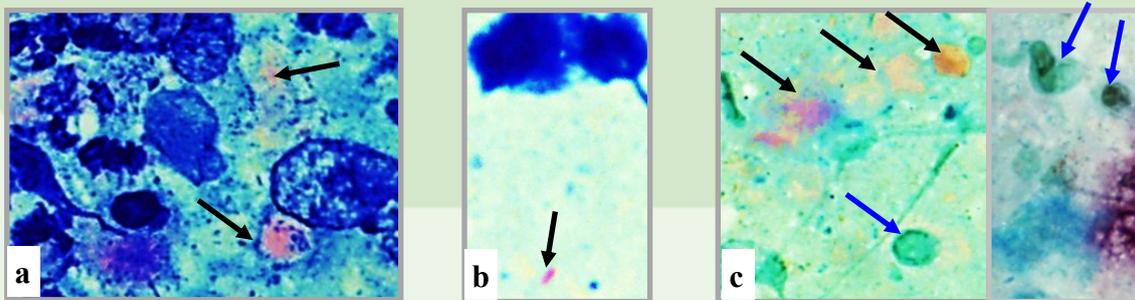
ствии в них антигенов МБТ (рисунки 1–4). В отпечатках опухолей кишечника и молочной железы крыс обнаружены микрогранулемы с КУ зернистостью (рисунки 2а, 3а), единичные КУ палочки (рисунки 2б), а

также много НКУ палочковидных форм, которые реагировали с антителами к *M. bovis*, что позволяло считать их некислотоустойчивыми (НКУ) CWD формами МБТ (рисунки 3б, с).



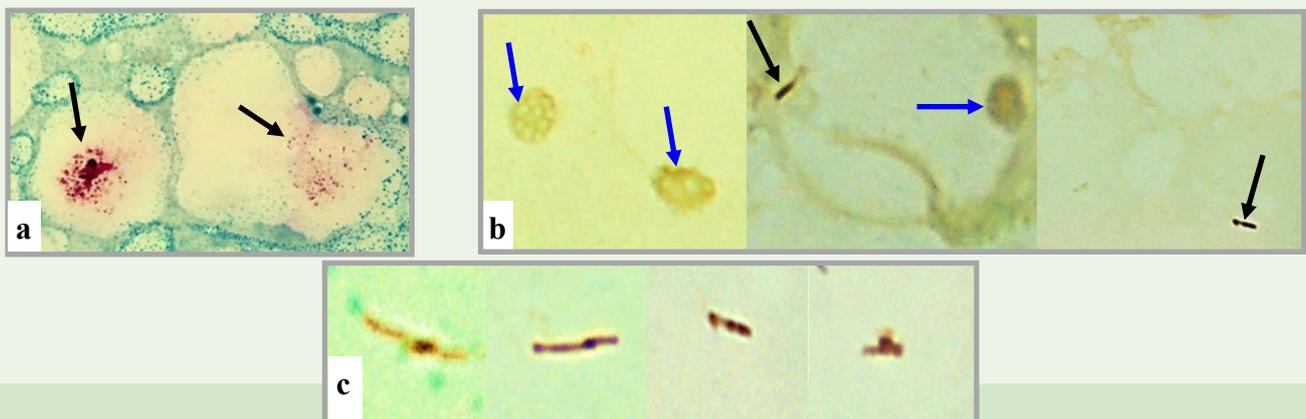
а – контроль инактивации ЭП; б – ДИП-окраска, стрелки – участки связывания антител к *M. bovis*

**Рисунок 1. – Опухоль молочной железы кошки, 10×100**



а – микрогранулемы с КУ зернистостью (стрелки); б – ЧКУ (красная) палочка; с – коричневые участки связывания антител к *M. bovis* (синие стрелки), микрогранулемы с КУ зернистостью (черные стрелки); а, б – контроль инактивации ЭП; с – ДИП-окраска

**Рисунок 2. – Опухоль кишечника крысы, 10×100**



а – контроль инактивации ЭП, КУ зернистость (стрелки); б – коричневые участки связывания антител к *M. bovis* (синие стрелки), коричневые палочки (черные стрелки); с – коричневые палочки в разных участках опухоли

**Рисунок 3. – Опухоль молочной железы крысы, ДИП-окраска**

При посеве гомогенатов тканей, пропущенных через фильтры 0.22 мкм, рост колоний был получен в 2 случаях из 2 (100 %), причем в одном случае (50 %) – в первичном посеве и в одном случае – в I «слепом» пересеве (таблица 1).

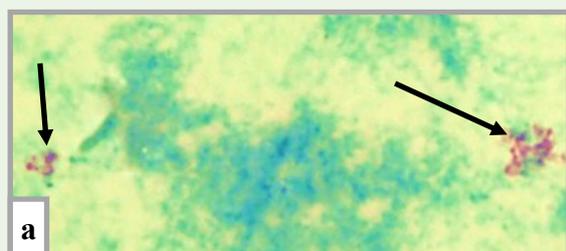
При посеве проб, деконтаминированных 6%-ной щавелевой кислотой, рост колоний был получен в 4 случаях из 4 (100 %), причем в одном случае (25 %) – в первичном посеве, в двух случаях (50 %) – в I и в одном случае – во II «слепом» пересеве (таблица 1). На время появления коло-

ний явно влиял способ деконтаминации проб. Раньше всех, на 4-й день, рост был получен в посеве стерильно взятой сыворотки кота FeLv+. Пробы, пропущенные через фильтр 0.22 мкм, давали рост через 6–7 дней. После более жесткой деконтаминации 6%-ной щавелевой кислотой рост чаще наблюдался через 14–18 дней (таблица 1). При посеве тканей на среду Гельберга по рутинной методике бактериологической диагностики туберкулеза роста колоний не отмечено.

Таблица 1. – Результаты посева на среду MusCel DW, названия изолятов, результат ПЦР

Опухоли, деконтаминация		День появления роста, № «слепого» пересева, результат ПЦР			
		первичный	I	II	III
Молочная железа кошки	OX <sup>X</sup>	14, «Is cat ox» gyrB 34.03+ Is 6110 35.08+	-	-	-
	0.22 <sup>XX</sup>	7, «Is cat» 0.22 gyrB 34.10+ Is 6110 33.50+	2	1	-
Толстый кишечник крысы	OX	нет	16, «Is rat ox» gyrB 34.75+ Is 6110 34.57+	нет	13
	0.22	нет	нет	нет	5, «Is rat» 0.22 gyrB 34.13+ Is 6110 34.57+
Молочная железа крысы	OX	нет	нет	6 «Is ratm ox»	-
Молочная железа хомяка	OX	нет	18 «Is hamm ox»	-	-
Кровь кота FeLv+	взята стерильно	4 «Is FeLv»	2	-	-

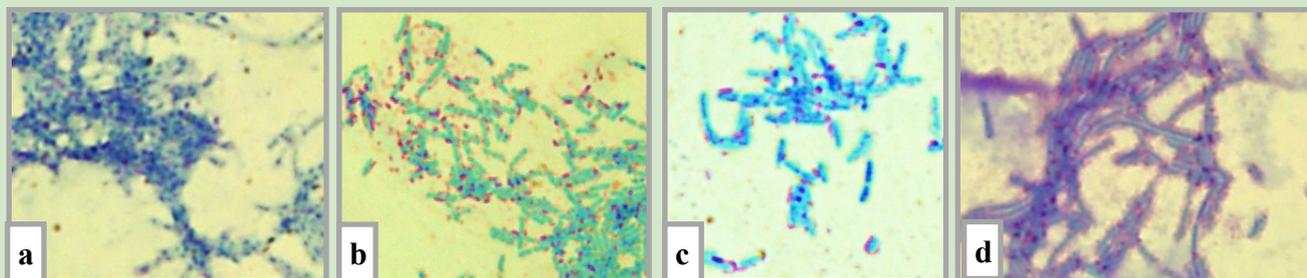
Примечание – <sup>X</sup> 6%-ная щавелевая кислота; <sup>XX</sup> фильтрация через «Millex® GP 0.22 μm»



а – контроль инактивации ЭП, видна КУ зернистость (стрелки);  
 б – коричневые участки связывания антител к *M. bovis* (красная стрелка)  
 Рисунок 4. – Опухоль молочной железы хомяка, ДИП-окраска, 10×100

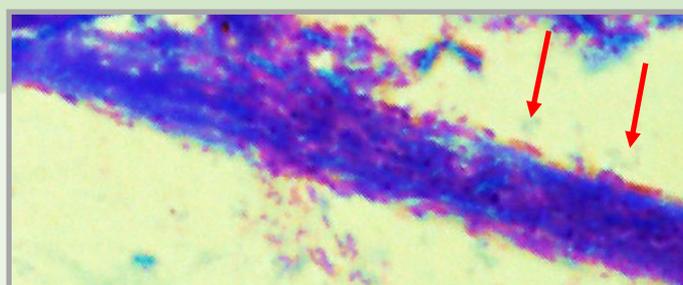
Достаточно часто рост начинался с появления своеобразных форм с характерной, часто КУ (красного цвета) зернистостью (рисунок 5). Далее формировались палочковидные формы с КУ фрагментами

(рисунок 5). Иногда появлялись мицелиеподобные формы, в которых формировались подобия КУ палочек (рисунок 6) и НКУ палочковидные формы (рисунок 7).

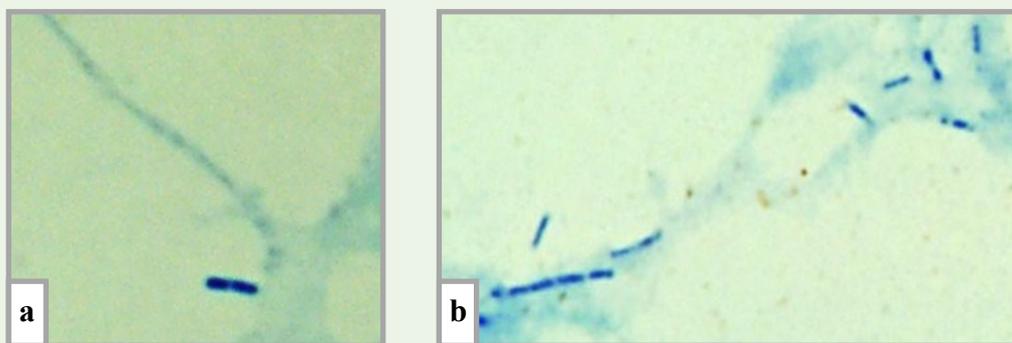


a – молочная железа кошки («Is cat 0.22»); b – толстый кишечник крысы («Is rat 0.22»); c – молочная железа крысы («Is ratm ox»); d – сыворотка крови кота FeLv+ («Is FeLv»)

**Рисунок 5. – Рост в посевах гомогенатов опухолей, Kinyoun, 10×100**



**Рисунок 6. – Рост в посевах сыворотки крови кота FeLv+ («Is FeLv»), мицелиеподобная форма с КУ фрагментами, включая КУ палочковидные формы (стрелки), Kinyoun, 10×100**

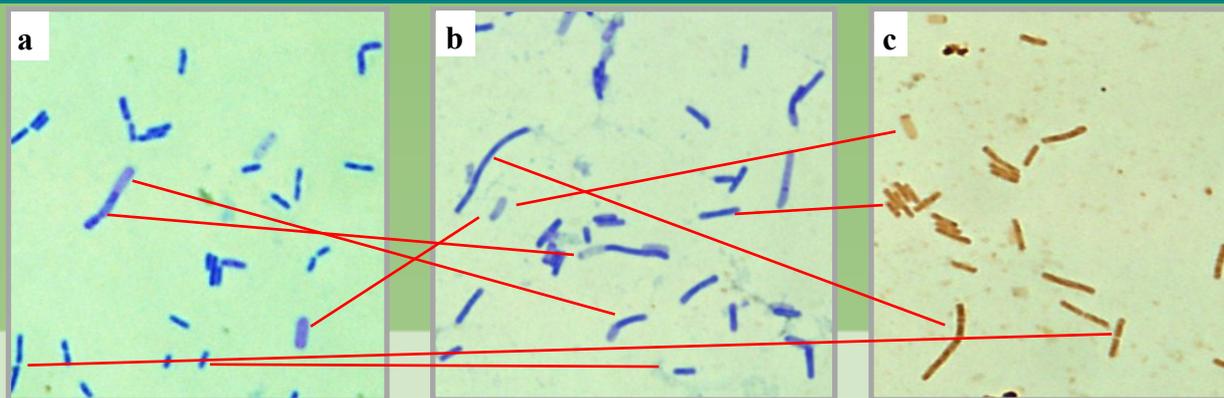


a – молочная железа кошки («Is cat ox»); b – толстый кишечник крысы («Is rat ox»)

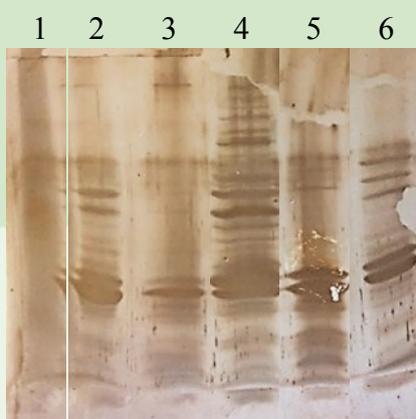
**Рисунок 7. – Образование НКУ палочковидных форм в мицелии в посевах гомогенатов опухолей, Kinyoun, 10×100**

Несмотря на полиморфизм, у всех изолятов встречались клетки одинаковых форм, характерных для CWD МБТ [29] (рисунок 8). Происхождение изолятов подтверждало выраженное антигенное родство с типичными МБТ. Антисыворотка к *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv в иммуноблоттинге выявляла в их составе до 26 антигенов-полипептидов (рисунок 9). Электрофоре-

тические спектры изолятов из опухолей, в частности изолятов из опухолей кишечника крысы («Is rat 0.22»), молочной железы кошки («Is cat 0.22»), из культуры Т-лимфоцитов человека с Т-лимфобластной лейкемией (Jurkat), из FLK-BLV «Is HC ox», были очень похожи и принципиально не отличались от спектра CWD *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv (рисунок 9).



а – «Is ratm ox»; б – «Is hamm ox»; в – «Is rat 0.22»; а, б – Кinyoun; в – ДИП-окраска  
**Рисунок 8. – Клетки одинаковой формы в посевах, 10x100**



- 1 – соникат *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv;
- 2 – CWD *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv;
- 3 – CWD МБТ «Is Jurkat II 0.22»;
- 4 – «Is rat 0.22»;
- 5 – «Is cat 0.22»;
- 6 – CWD МБТ «Is HC ox»

**Рисунок 9. – ЭФ в 10%-ном ПААГ-ДСН и иммуноблоттинг с антисывороткой к *M. tuberculosis***

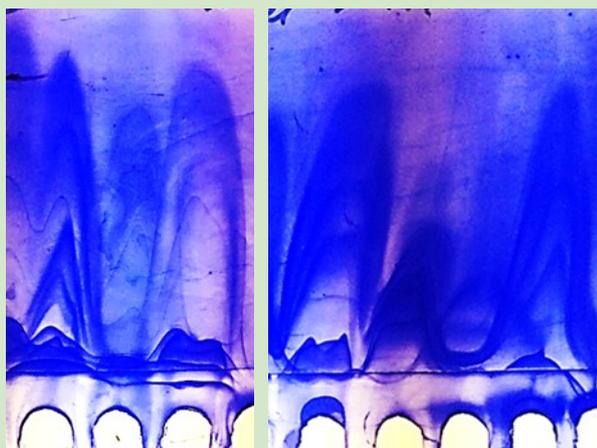
При использовании в иммуноблоттинге антисыворотки к CWD *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv в разведении 1:120 (рисунок 10) антигенные спектры были уже и в них преобладали мажорные полипептиды. Это делало еще более заметным то, что спектры изолятов из опухолевых клеток человека Kasumi, Jurkat, Hela были похожи и не отличались от спектра изолятов из опухолей животных, в частности кишечника

крысы «Is rat 0.22». Некоторые различия касались концентрации фракций, что также было заметно в РИЭФ (рисунок 11) и проявлялось разной высотой преципитатов, которые тем не менее плавно сливались, что указывало на их иммунохимическую идентичность, в том числе с «Is rat 0.22», «Is cat 0.22», а также с CWD *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv и изолятом из крови лейкозной коровы «Is 52 BLV+».



- 1 – CWD МБТ «Is Kasumi II 0.22»;
- 2 – CWD МБТ «Is Jurkat 0.22 II»;
- 3 – CWD МБТ «Is rat 0.22»;
- 4 – CWD МБТ «Is Hela 3 kDa»

**Рисунок 10. – ЭФ в 10%-ном ПААГ-ДСН и иммуноблоттинг с антисывороткой к *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv (1:120)**



1 2 3 1 4 2 3

- 1 – CWD *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv;  
 2 – «Is rat 0.22»;  
 3 – «Is cat 0.22»; 4 – «Is 52 BLV+»

**Рисунок 11. – РИЭФ.**  
 Слева в агарозе – антисыворотка к CWD *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv, справа – к CWD МБТ «Is DchHO» по 58 мкл/мл

Особенно ярко антигенное родство изолятов из опухолей животных, человека и CWD *M. tuberculosis* проявлялось в иммуноблоттинге с антисывороткой к изоляту «Is DchHO» из крови человека, больного саркомой (рисунок 12), где с антителами к

его антигенам реагировал практически весь профиль полипептидов. При этом, в частности, профили изолятов из сыворотки кота FeLv+, опухолевых тканей крысы и самки хомяка («Is FeLv», «Is ratm ox», «Is hamm ox») были почти идентичными.

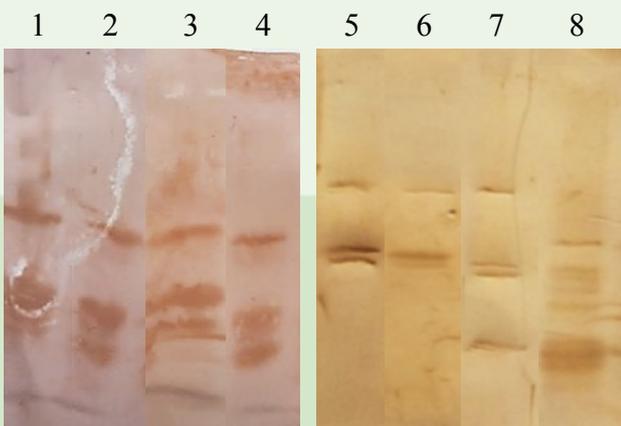


- 1 – CWD *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv;  
 2 – «Is ratm ox»;  
 3 – «Is hamm ox»,  
 4 – «Is FeLv»,  
 5 – CWD МБТ «Is Hela is 6»

**Рисунок 12. – ЭФ в 10%-ном ПААГ-ДСН и иммуноблоттинг с антисывороткой к CWD МБТ «Is DchHO» (1:60)**

Значимым было и то, что до 6 полипептидов с молекулярной массой 51-12 kDa изолятов из опухолей, а также CWD *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv реагировали в иммуноблоттинге с сыворотками крови

лейкозных коров (рисунок 13), а сыворотка крови кота FeLv+ реагировала в РИД с соникатом изолята из опухоли молочной железы кошки «Is cat 0.22» (рисунок 14).



- 1 – CWD *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv;  
 2 – «Is rat 0.22»; 3 – «Is ratm ox»;  
 4 – «Is Hela is 6»; 5 – «Is Jurkat 0.22 II»;  
 6 – «Is HC шав»; 7 – «Is cat 0.22»;  
 8 – «Is rat 0.22»

**Рисунок 13. – ЭФ в 10%-ном ПААГ-ДСН и иммуноблоттинг с сыворотками крови коров РИД BLV+ (1:20) № 1 (1–4) и № 2 (5–8)**

Изоляты из опухолей молочной железы кошки «Is cat 0.22», толстого кишечника крысы «Is rat 0.22», а также CWD *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv в течение 1 месяца (срок наблюдения) не вызывали гибели белых мышей, хотя у некоторых животных отмечались абсцессы. Вместе с тем из гомогенатов тканей во всех случаях удалось выде-

лить культуры с типичным для CWD МБТ полиморфизмом и одинаковыми формами клеток (рисунок 15). В иммуноблоттинге они имели одинаковые антигенные профили, выявляемые антисывороткой к CWD *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv, которые не отличались от профилей изолятов, которыми были заражены мыши (рисунок 16).

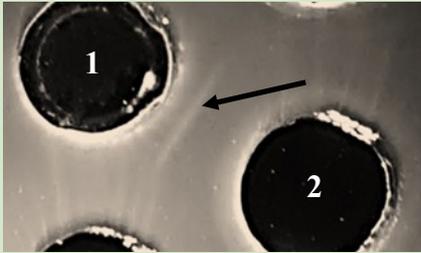
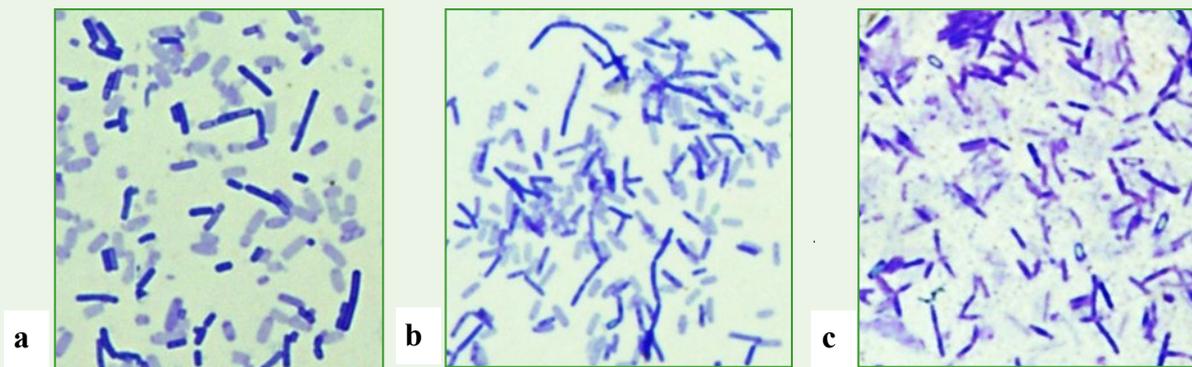


Рисунок 14. – РИД сыворотки крови кота FeLv+ (2) с соникатом «Is cat 0.22» (1), преципитат выделен стрелкой

Профиль чувствительности к антибиотикам у изолятов был практически одинаковым и принципиально не отличался от профиля CWD *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv (таблица 2). Характерной была резистентность изолятов к пенициллину, аминогликозидам и цефалоспорином, а также к ванкомицину – «лекарству последней надежды». Гентамицин оказывал умеренное, а фторхинолоны, карбопенемы, линезолид – выраженное действие на изоляты.

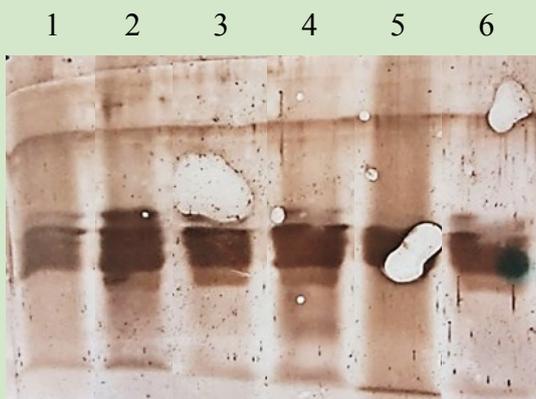
Связь туберкулеза с онкогенезом чаще изучалась с использованием рутинных методов, выявляющих морфологический туберкулезный процесс и типичные МБТ, что позволило установить достовер-

ное возрастание риска развития опухоли при туберкулезе у человека [7, 32]. Ассоциация туберкулезных изменений и злокачественной опухоли обнаружены и у животных [33]. Вместе с тем заслуживает внимания латентная туберкулезная инфекция с персистенцией CWD (L-) форм МБТ, которая может протекать годами без типичных признаков болезни [34]. Ее связывают с рядом патологических состояний неясной этиологии [35–37]. CWD (L-) формы МБТ обнаруживали не только в опухолевых клетках, но и в ядрах с интеграцией фрагментов их генома в геном хозяина [19–21].



a – CWD *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv («Is mouse CWD H<sub>37</sub>Rv»);  
b – «Is rat 0.22» («Is mouse rat 022»);  
c – «Is cat 0.22» («Is mouse cat 022»)

Рисунок 15. – Изоляты из тканей зараженных мышей



1 – CWD *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv;  
 2 – «Is mouse CWD H<sub>37</sub>Rv»;  
 3 – «Is cat 0.22»; 4 – «Is mouse cat 022»;  
 5 – «Is rat 0.22»; 6 – «Is mouse rat 022»

**Рисунок 16. – ЭФ в 15%-ном ПААГ-ДСН и иммуноблоттинг с антисывороткой к CWD *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv (1:60)**

Во всех исследованных опухолях обнаружены маркеры туберкулезной инфекции – антигены МБТ и CWD МБТ, а в 3 опухолях из 4 – микрогранулемы с КУ «зернами» (предположительно «красные осколки» Spengler’a). Такие микрогранулемы встречаются в лимфатических узлах коров, зараженных *M. bovis* (рисунок 17). Судя по отрицательным результатам рутинного бактериологического посева, КУ «зерна» относились к «некультивируемым» формам МБТ. Однако с помощью инкубации проб в стимуляторе роста и посева на среду МусСел DW во всех случаях из опухолей удалось выделить НКУ CWD

МБТ. Особенность этого метода в том, что независимо от того, в какой форме в пробе присутствуют МБТ (типичные КУ, вирусоподобные фильтрующиеся, CWD-формы), на среде вырастают НКУ CWD МБТ, что отражает одно из направлений стратегии выживания микобактерий.

Присутствовавший в опухолях инфекционный агент проходил через фильтр 0.22 мкм, так как в 100 % случаев фильтраты гомогенатов опухолей дали рост CWD МБТ. Изоляты были получены и при посеве тканей, деконтаминированных кислотой, т.е. инфекционный агент выдерживал действие кислоты.

Таблица 2. – Зоны задержки роста (в мм) изолятов МБТ

Антибиотики	Изоляты			
	«Is FeLv»	«Is hamm ox»	«Is ratm ox»	CWD <i>M. tuberc.</i> H <sub>37</sub> Rv
Пенициллин	10	0	0	0
Линкомицин	0	16	0	10
Цефуроксим	0	16	0	12
Ванкомицин	16	17	17	16
Эритромицин	26	31	20	23
Гентамицин	19	25	20	21
Левифлоксацин	26	36	32	37
Норфлоксацин	26	33	30	28
Ломефлоксацин	37	31	30	35
Меропенем	21	36	34	30
Линезолид	32	40	30	29

Примечание – красным цветом выделены результаты, указывающие на устойчивость к антибиотикам

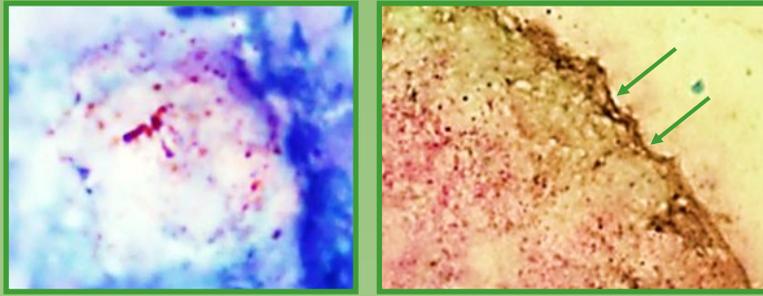
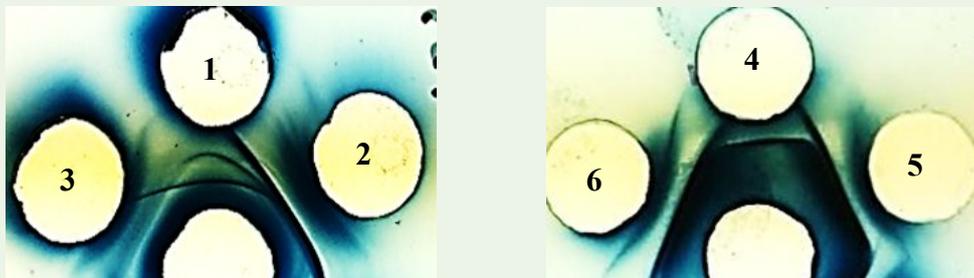


Рисунок 17. – КУ зерна в гранулемах лимфатического узла коровы, зараженной *M. bovis*. Справа – коричневый «вал» антигенов МБТ, связавших антитела к *M. bovis* (ДИП-окраска)

С учетом данных микроскопии можно считать, что в опухолевых тканях присутствовали зернистые КУ, НКУ CWD палочковидные, вирусоподобные формы МБТ, резистентные к кислоте, хотя скорее они были результатом последовательной трансформации и переходили из одной формы в другую в зависимости от условий. Это подтверждало то, что все изоляты не различались по антигенному составу (рисунок 18) и имели до 26 общих антигенов с типичными МБТ. Важным было и то, что антигенные спектры изолятов из опухо-

лей разных животных, в том числе больных лейкозом, и культур клеток опухолей человека были почти идентичными, а в иммуноблоттинге до 6 их полипептидов (51-12 kDa) реагировали с антителами сывороток крови коров, больных лейкозом.

В задачи исследований не входило изучение онкогенности изолятов, но в биопробе с «Is cat 0.22» и «Is rat 0.22» установлено, что они приживались в организме мышей и изоляты от зараженных животных не отличались от «материнских».



1 – «Is rat 0.22»; 2 – CWD МБТ «Is *M. bovis* 24»;  
3 – «Is rat ox» и антисыворотки к CWD МБТ «Is Hela 3 kDa» с соникатами;  
4 – CWD МБТ «Is Hela is 6 0.22»; 5 – «Is rat 0.22»; 6 – «Is rat ox»

Рисунок 18. – РИД антисыворотки к CWD *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv с соникатами изолятов

Изоляты из опухолей животных, как и от людей [12, 13, 14], оказались резистентными к пенициллину и другим антибиотикам, влияющим на синтез клеточной стенки. По профилю чувствительности они не отличались от CWD *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv, то есть резистентность к определенным препаратам не была приобретенной. Интересно, что недавно были сделаны попытки лечить рак как инфекционную бо-

лезнь антибиотиками, «нацеленными» на митохондрии [38]. Именно такие препараты оказывали эффективное действие на изоляты из опухолей животных.

Происхождение раковых клеток остается фундаментальной проблемой. В последнее время выдвинута гипотеза о том, что персистирующие внутри клеток бактерии могут поглощать ДНК стареющих и некротических нормальных кле-

ток, гибридизировать собственную ДНК с приобретенной ДНК, экспрессировать гибридный геном и превращаться в первичные и вторичные раковые клетки [40]. МБТ как универсальный внутриклеточный пато-

ген, обладающие уникальной фильтруемостью и «бессмертностью» [27, 28, 39], могут рассматриваться как наиболее вероятный этиологический агент онкогенеза.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Манкин, З. В. Лимфогрануломатоз / З. В. Манкин. – Л. : Государственное издательство биологической и медицинской литературы, 1938. – 451 с.
2. Warthin, A. S. The Coexistence of Carcinoma and Tuberculosis of the Mammary Gland / A. S. Warthin // *The American Journal of the Medical Sciences*. – 1899. – Vol. 118, № 1. – P. 25–34.
3. Ewing, J. *Neoplastic Diseases* / J. Ewing. – Third edition. – Philadelphia and London : W. B. Saunders Co. Ltd., 1928. – 1127 p.
4. Fraenkel, E. Bemerkungen zur Aetiologie der Hodgkinschen Krankheit und der Leukaemia lymphatica / E. Fraenkel, H. Much // *Münchener med. Wochenschr.* – 1910. – B. 57. – S. 685.
5. Lichtenstein, A. Pseudoleukämie und Tuberkulose / A. Lichtenstein // *Virchows Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin*. – 1910. – B. 202, № 2. – S. 222–237.
6. L'esperance, E. S. Studies in Hodgkin's disease / E. S. L'esperance // *Annals of Surgery*. – 1931. – Vol. 93, № 1. – P. 162–168.
7. Tuberculosis and malignancy / M. E. Falagas [et al.] // *QJM: An International Journal of Medicine*. – 2010. – Vol. 103, № 7. – P. 461–487.
8. Sternberg, C. Lymphogranulomatose und Reticuloendotheliose / C. Sternberg // *Ergebnisse der Allgemeinen Pathologie und Pathologischen Anatomie des Menschen und der Tiere* / eds. W. Hueck [et al.]. – Munich : J. F. Bergmann-Verlag, 1936. – S. 1–76.
9. Young, J. Description of an organism obtained from carcinomatous growths / J. Young // *Edinburgh Medical Journal*. – 1921. – Vol. 27, № 4. – P. 212.
10. Nuzum, J. W. The experimental production of metastasizing carcinoma in the breast of the dog and primary epithelioma in man by repeated inoculation of a micrococcus isolated from human breast cancer / J. W. Nuzum // *Surg. Gynec. a. Obst.* – 1925. – № 48. – 336 p.
11. Sweany, H. C. Mutation forms of the tubercle bacillus / H. C. Sweany // *JAMA*. – 1926. – Vol. 87, № 15. – P. 1206–1211.
12. Cantwell, A. Four women against cancer: bacteria, cancer, and the origin of life. Four women against cancer / A. Cantwell. – Los Angeles : Aries Rising Press, 2005. – 144 p.
13. Livingston, V. Presence of consistently recurring invasive mycobacterial forms in tumor cells / V. Livingston, R. M. Allen // *Microscop Soc Bull.* – 1948. – Vol. 2. – P. 5–18.
14. Alexander-Jackson, E. A. Differential Triple Stain for Demonstrating and Studying Non-Acid-Fast Forms of the Tubercle Bacillus in Sputum, Issue and Body Fluids / E. A. Alexander-Jackson // *Science*. – 1944. – Vol. 99, № 2572. – P. 307–308.
15. Cultural properties and pathogenicity of certain microorganisms obtained from various proliferative and neoplastic diseases / V. Wuerthele-Caspe [et al.] // *American Journal of Medical Sciences*. – 1950. – Vol. 220. – P. 638–648.
16. Diller, I. C. Isolation of pleomorphic, acid-fast organisms from several strains of mice / I. C. Diller, A. J. Donnelly, M. E. Fisher // *Cancer Research*. – 1967. – Vol. 27, № 8. – P. 1402–1408.
17. Diller, I. C. Experiments with mammalian tumor isolates / I. C. Diller, A. J. Donnelly // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 1970. – Vol. 174, № 2. – P. 655–674.
18. Diller, I. C. Three similar strains of pleomorphic acid-fast organisms isolated from rat and mouse tissues and from human blood / I. C. Diller // *The American Review of Respiratory Disease*. – 1962. – Vol. 86. – P. 932–935.
19. Song, L.-Y. Detection of Mycobacterium tuberculosis in lung cancer tissue by indirect in situ nested PCR / L.-Y. Song, W.-S. Yan, T. Zhao // *Academic journal of the first medical college of PLA*. – 2002. – Vol. 22, № 11. – P. 992–993.
20. Detection of Mycobacterium tuberculosis L-forms infection in tissues of lung carcinoma / S. Zhang [et al.] // *Chin. J. Public Health*. – 2009. – № 11. – P. 36–38.

21. *Clinical End-Points Associated with Mycobacterium tuberculosis and Lung Cancer: Implications into Host-Pathogen Interaction and Coevolution* / Y. Tian [et al.] // *BioMed Research International*. – 2015. – Vol. 2015. – P. 1–9.
22. *Livingston, V. Cancer: a new breakthrough* / V. Livingston, V. Wuer-thele-Caspe. – Los Angeles : Nash Publishing, 1972. – 269 p.
23. *Lung carcinogenesis induced by chronic tuberculosis infection: the experimental model and genetic control* / A. Nalbandian [et al.] // *Oncogene*. – 2009. – Vol. 28, № 17. – P. 1928–1938.
24. *McKay, K. A. The demonstration of a single species of an unclassified bacterium in five cases of bovine lymphosarcoma* / K. A. McKay, D. H. Neil, A. H. Corner // *Growth*. – 1967. – Vol. 31, № 4. – P. 357–368.
25. *Вирус бычьего лейкоза – вирусоподобная форма микобактерий туберкулеза?* / А. П. Лысенко [и др.] // *Экология и животный мир*. – 2019. – № 1. – С. 15–24.
26. *Further evidence for cancer as cell-wall-deficient mycobacterial disease* / A. P. Lysenko [et al.] // *Journal of Molecular Pathological Epidemiology*. – 2016. – Vol. 1, № 1. – P. 1–12.
27. *Вероятная связь миелоидного и лимфобластного лейкоза с туберкулезной инфекцией* / А. П. Лысенко [и др.] // *Эпизоотология Иммунобиология Фармакология Санитария*. – 2020. – № 1. – С. 23–38.
28. *Возможная роль туберкулезной инфекции в возникновении опухолей* / А. П. Лысенко [и др.] // *Экология и животный мир*. – 2020. – № 1. – С. 53–69.
29. *Василев, В. Н. Микобактериозы и микозы легких* / В. Н. Василев. – София : Медицина и физкультура, 1971. – 381 с.
30. *Выявление микобактерий туберкулеза в тканях с помощью дифференцирующей иммунопероксидазной окраски* / А. П. Лысенко [и др.] // *Туберкулез и болезни легких*. – 2014. – № 10. – С. 55–58.
31. *Феномен изменчивости микобактерий туберкулеза и его использование для обнаружения туберкулезной инфекции* / А. П. Лысенко [и др.] // *Туберкулез – глобальная катастрофа человечества: материалы I Междунар. заочной науч.-практ. конф., 24 марта 2014 г.* / Ростов н/Д. : РостГМУ, 2014. – С. 176–198.
32. *Increased lung cancer risk among patients with pulmonary tuberculosis: a population cohort study* / Y.-H. Yu [et al.] // *Journal of Thoracic Oncology*. – 2011. – Vol. 6, № 1. – P. 32–37.
33. *Bir Köpekte Memede Beraber Seyreden Tüberküloz ve Malign Mikst Tümör* / T. Kutlu [et al.] // *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. – 2018. – Vol. 24, № 2. – P. 315–318.
34. *Дорожкова, И. Р. Скрыто протекающая туберкулезная инфекция* / И. Р. Дорожкова, З. С. Земскова. – М. : Медицина, 1984. – 222 с.
35. *Mattman, L. H. Cell wall deficient forms: stealth pathogens* / L. H. Mattman. – 3rd ed. – Boca Raton : CRC Press, 2001. – 416 p.
36. *Livingston, V. Mycobacterial Forms In Myocardial Vascular Disease* / V. Livingston, E. Alexander-Jackson // *Journal of the American Medical Women's Association*. – 1965. – Vol. 20. – P. 449–452.
37. *CWD tuberculosis found in spongiform disease formerly attributed to prions: its implication towards mad cow disease, scrapie and Alzheimer's* / A. P. Lysenko [et al.] // *Journal of Molecular Pathological Epidemiology*. – 2017. – Vol. 3, № 3. – P. 1–13.
38. *Antibiotics that target mitochondria effectively eradicate cancer stem cells, across multiple tumor types: treating cancer like an infectious disease* / R. Lamb [et al.] // *Oncotarget*. – 2015. – Vol. 6, № 7. – P. 4569–4584.
39. *Микобактерии туберкулеза при термическом воздействии образуют защитные формы, проходящие через ультрафильтры и восстанавливающие жизнеспособность в виде CWD форм* / А. П. Лысенко [и др.] // *Эпизоотология Иммунобиология Фармакология Санитария*. – 2019. – № 1. – С. 33–45.
40. *Dong, Q. Cancer cells arise from bacteria* / Q. Dong, X. Xing // *Cancer Cell International*. – 2018. – Vol. 18, № 1. – P. 205.