

Лысенко А.П., доктор ветеринарных наук, профессор¹
Wroхmeyer L., доктор медицины²
Власенко В.В., доктор биологических наук, профессор³
Кучвальский М.В., научный сотрудник¹
Красникова Е.Л., научный сотрудник¹

¹Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслеского, г. Минск

²N. Y. Institute of Medical Research in Bayside, New York, USA

³Винницкий торгово-экономический институт, г. Винница, Украина

ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ В ВОЗНИКНОВЕНИИ ОПУХОЛЕЙ

Резюме

Из культуры клеток аденокарциномы шейки матки (HeLa) выделены cell wall deficient (CWD) микобактерии туберкулеза. Изолят демонстрировал «бессмертность» и восстанавливал бактериальную форму после химической инактивации, ультразвукового разрушения, удаления детрита и молекул крупнее 100 kDa, и 3 kDa, давая рост клеток, почти не отличавшихся не только от исходных, но и от CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv. Изоляты были чувствительны только к фторхинолонам, не вызывали явного заболевания у морских свинок, но индуцировали развитие в органах микрогранулем с кислотоустойчивыми зёрнами. Предполагается, что микобактерии туберкулеза, инфицируя клетки, могут персистировать в них в необычной форме, возможно, интегрируя фрагменты генома в ДНК хозяина и при определенных условиях превращая их в раковые за счет своих необычных свойств.

Summary

Cell wall deficient (CWD) mycobacteria of tuberculosis is isolated from culture of cells of cervical adenocarcinoma (HeLa). The isolate exhibited «immortality» and restored bacterial form after chemical inactivation, ultrasonic destruction, removal of detritus and molecules larger than 100 kDa and 3 kDa, giving growth of cells almost not different not only from initial cells, but also from CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv. Isolates were sensitive only to fluoroquinolones, did not cause obvious disease in guinea pigs, but induced development in organs of microgranulems with acid-fast grains. It is suggested that mycobacteria of tuberculosis by infecting cells, can persistence in them in an unusual form, possibly integrating fragments of genome into the host DNA and under certain conditions, turning them into cancer at the expense of their unusual properties.

Поступила в редакцию 22.04.2020 г.

В XIX и в первой трети XX века более 90 % людей были инфицированы микобактериями туберкулеза (МБТ), каждая 5–7 смерть связана с туберкулезом [1]. Благодаря санитарным мерам, вакцинации, улучшению социальных условий с 30-х годов XX века заболеваемость туберкулезом начала снижаться (по данным ВОЗ, в последние годы до 2 % в год). Тем не менее, элиминации МБТ из популяции явно не происходит, не менее 30 % населения инфицировано, более 3 млрд привито вакциной BCG (*Mycobacterium bovis*) [2, 3].

Трансплацентарная передача как возбудителя болезни, так и вакцинного штам-

ма [4] способствует поддержанию практически 100%-ного уровня инфицированности. То есть в организме, вероятно, каждого человека персистируют МБТ, чаще в дормантной или в cell wall deficient (в том числе L) формах, не вызывая явного заболевания [5, 6].

На фоне снижения заболеваемости и смертности от туберкулеза, но при сохраняющейся инфицированности, отмечается рост онкологической патологии, от которой погибает более 9 млн человек ежегодно (UN News, 2019). Связь туберкулезной инфекции и рака подозревали еще в XIX веке, наблюдая похожие морфологические

процессы и вызывая туберкулез у морских свинок введением раковых тканей [7, 8]. Хотя в пору пандемии туберкулеза это скорее объяснялось одновременным течением туберкулезной инфекции и онкогенеза.

В первой половине XX века из опухолей и крови больных были выделены частично кислотоустойчивые (ЧКУ) полиморфные фильтрующиеся микроорганизмы, предположительно МБТ с дефектной клеточной стенкой (CWD – cell wall deficient) [9, 10, 11, 12]. Изоляты индуцировали опухоли у мышей [13] и синтезировали аналог хорионического гонадотропина человека, стимулировавший размножение раковых клеток [14]. Китайские исследователи на современном уровне подтвердили определенную связь CWD (L-) форм МБТ с онкогенезом, которые как онкогенные вирусы могли интегрировать фрагменты своего генома в геном человека [15, 16, 17]. Но такие исследования выполнены на клиническом материале, когда трудно исключить одновременное независимое течение патологических процессов. Более определенные сведения о связи туберкулезной инфекции и онкогенеза может дать исследование опухолевых клеток, культивируемых вне организма. В частности, обнаружена персистенция вирусоподобных форм МБТ в культурах клеток почки эмбриона овцы, инфицированных вирусом бычьего лейкоза (FLK-BLV), миелобластов больного миелоидным лейкозом (Kasumi-1) и Т-лимфоцитов человека с Т-лимфобластной лейкемией (Jurkat) [18, 19, 20]. В связи с этим **целью** исследований было изучение культуры клеток аденокарциномы шейки матки (HeLa) с использованием методов культивирования CWD МБТ.

Дизайн экспериментов. I этап – выявление в клетках HeLa антигенов, реагирующих с антителами к *M. tuberculosis*.

II этап – разрушение клеток HeLa, инкубация лизата со стимулятором роста, посев на питательную среду, проведение «слепых» пересевов.

III этап – культивирование изолята из клеток HeLa, изучение морфологии, идентификация в ПЦР.

IV этап – ультразвуковая дезинтеграция изолята, ультрафильтрация сониката через Amicon Ultracel® 100 К и 3 К, стерилизация ультрафильтратов фильтрацией через фильтры 0,22 мкм.

V этап – инкубация ультрафильтратов 100 К и 3К со стимулятором роста, посев на питательную среду, проведение «слепых» пересевов.

VI этап – культивирование изолятов из ультрафильтратов, изучение морфологии, идентификация в ПЦР, определение лекарственной устойчивости.

VII этап – получение соникатов изолятов из ультрафильтратов, исследование антигенного состава.

VIII этап – заражение изолятами морских свинок, исследование патологического материала.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культура клеток HeLa (коллекция культур клеток БГУ, Минск) выращена на среде 199 с 10 % фетальной бычьей сыворотки (FBS).

Микроскопия. На стекла наносили 75–100 мкл суспензии клеток HeLa (или изолятов) и 30 мкл 3 % H₂O₂ для инактивации эндогенной пероксидазы (ЭП). Мазки фиксировали (65 °С) и окрашивали по Kinyoun или дифференцирующим иммунопероксидазным методом (ДИП), включавшим окраску по Kinyoun, инкубацию с конъюгатом пероксидазы и аффинноочищенных антител к *M. tuberculosis* H₃₇Rv, обработку раствором 3,3'-диаминобензидина с H₂O₂. Метод обеспечивал окрашивание кислотоустойчивых (КУ) клеток в красный, некислотоустойчивых (НКУ) CWD МБТ – в коричневый, а немикобактериальной микрофлоры и тканей – в синий цвет. Результаты учитывали, если в контрольных мазках, окрашенных по Kinyoun и обработанных раствором 3,3'-диаминобензидина с H₂O₂, все объекты были синего (сине-зеленого) цвета, что указывало на инактивацию ЭП [21]. Микроскопию проводили на Olympus B51X, 10×100.

Для посева лизатат клеток HeLa смешивали 1:2 со стимулятором роста ВКГ

(патент Украины № 43467), выдерживали 48 ч при температуре 37 °С и по 0,3 мл вносили в пробирки со средой MucCel DW (включавшей агар, аспарагин, пептон, триптон, крахмал, железо лимоннокислое аммиачное, CaCl₂, MgSO₄, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, ZnSO₄). Посевы инкубировали при температуре 37 °С. Контролем служили посевы стимулятора роста с FBS (2:1), использовавшейся для культуры клеток HeLa.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Изоляты (0,2–0,5 мг/мл) прогревали 5 мин (95 °С) в лизирующем буфере. ДНК выделяли на колонках с сорбентом (ИБОХ НАНБ). Амплификацию проводили на C1000™ ThermoCycler (BioRad) с праймерами 16S RNA, MPB 70, MPB 64 («Праймтех»). Результаты электрофореза амплификатов учитывали на GelDoc™ XR+ (BioRad). ПЦР – real time проводили с праймерами IS 6110 («Праймтех»).

Приготовление соникатов. Изоляты выращивали на среде MucCel DW. Бактериальную массу отмывали 1%-ным раствором фенола и дезинтегрировали на Vandelin Sonopuls 2400 (3 цикла 8х по 5 мин).

Ультрафильтрация сониката изолята из лизата клеток HeLa и посев ультрафильтратов. Соникат центрифугировали 4 мин при 17000g, надосадочную жидкость фильтровали через Amicon Ultracel® 100 К и 3 К. Предварительно ультрафильтры стерилизовали 0,1N раствором NaOH и отмывали стерильной водой. Целостность ультрафильтров проверяли сразу после ультрафильтрации с использованием IgG крупного рогатого скота (для 100К) и пероксидазы хрена (для 3К) [22].

Ультрафильтраты стерилизовали фильтрацией через Millex® GP 0.22 µm, смешивали 1:2 со стимулятором роста, выдерживали 48 ч при температуре 37 °С и по 0,3 мл вносили в пробирки со средой MucCel DW. Посевы инкубировали при температуре 37 °С. Во всех случаях посева на среду MucCel DW при отсутствии роста колоний делали «слепые» пересевы.

Антисыворотки получали гипериммунизацией кроликов соникатами инактивированной 1%-ным фенолом бактериальной массы *M. tuberculosis* H₃₇Rv, «Is HeLa is 6, Is HeLa 100 kDa+0.22», «Is HeLa 3 kDa+0.22» (5-кратно подкожно по 1–1,4 мг в 1,5 мл ISA 70, через 12–14 дней).

Реакцию иммунодиффузии (РИД), перекрестный иммуноэлектрофорез с промежуточным гелем (ПИЭФ ПГ), ракетный иммуноэлектрофорез (РИЭФ) ставили по N.Axelsen, J. Kroll, B. Weeke (1977). Антигенный состав изолятов изучали в сравнении составом соникатов CWD штаммов *M. tuberculosis* H₃₇Rv.

Лекарственную устойчивость изолятов изучали в диффузионном тесте на среде MucCel DW, используя стандартные диски с антибиотиками (НИЦФ).

Определение патогенности изолятов. Морским свинкам вводили подкожно по 2 мг бактериальной массы изолятов в 0,5 мл стерильного минерального масла.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При ДИП окраске клетки HeLa и их ядра окрашивались в коричневый цвет, то есть в них были антигены, связывающие антитела к антигенам *M. tuberculosis* (рисунок 1b).

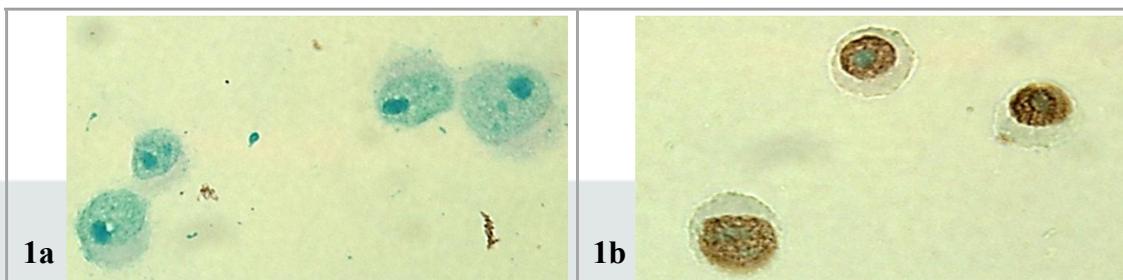


Рисунок 1. – ДИП окраска клеток HeLa: 1a – клетки зелено-голубого цвета (полная инактивация ЭП); 1b – ДИП окраска с использованием антител к *M. tuberculosis* (клетки коричневого цвета)

После посева инкубированного в стимуляторе роста лизата клеток HeLa через 2 суток появились мелкие стекловидные образования. С каждым «слепым» пересевом их количество возрастало. В мазках из пробирки 6 «слепого» пересева обнаружена НКУ и ЧКУ зернистость (рисунок 2а), а также единичные палочковидные формы (рисунок 2b). После их пересе-

ва начался рост («Is HeLa is 6») типичных колоний полиморфных палочковидных форм и «пустых» клеток с «хвостом» (рисунок 3), который исчезал при пересевах изолята (рисунок 4). У части клеток обнаруживались ЧКУ или КУ элементы (рисунок 4). При ДИП окраске клетки связывали антитела к антигенам *M. tuberculosis* и окрашивались в коричневый цвет (рисунок 3).

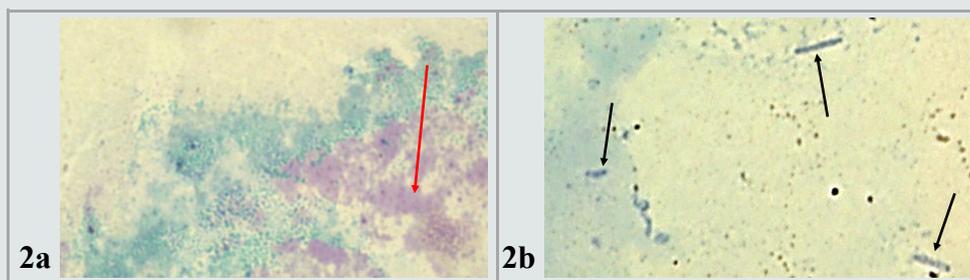


Рисунок 2. – Рост «Is HeLa is 6» в 6 «слепом» пассаже посева клеток HeLa: 2а – НКУ и ЧКУ зернистость (красная стрелка); 2b – зернистые палочки

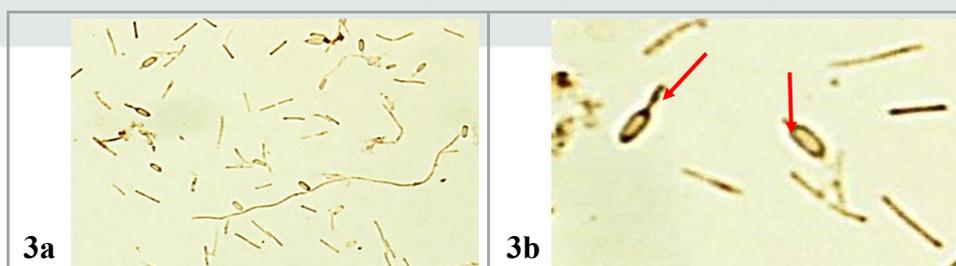


Рисунок 3. – Первичный рост «IsHeLa is 6»: 3а – Полиморфные палочковидные формы и «пустые» клетки с «хвостом» (стрелки); 3b – увеличено (10x100+25 %), ДИП окраска (клетки коричневого цвета)

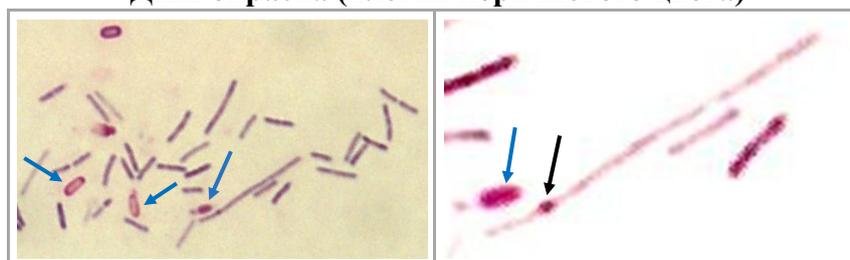


Рисунок 4. – Рост «Is HeLa is 6» в пересеве. Исчезновение «хвостов» у «пустых» клеток, частичная КУ клеток (синие стрелки), КУ зерно в длинной палочке (черная стрелка), Kinyoun, 10x100, +25 %

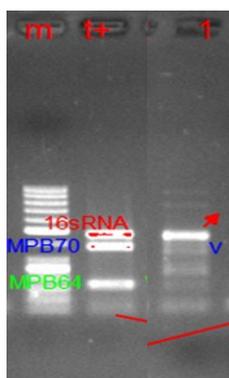


Рисунок 5. – Амплификаты ДНК «Is HeLa is 6», полученные в ПЦР с праймерами 16s RNA, MPB 70, MPB 64 (t+ – положительный контроль, фракции сверху вниз)

В ПЦР ДНК «Is HeLa is 6» реагировала с праймерами 16s RNA, MPB 70, MPB 64 (рисунок 5) и с IS 6110 (Cq 36.04). То есть «Is HeLa is 6» с учетом НКУ и культурально-морфологических свойств явно относилась к CWD МБТ.

В посевах «Is HeLa is 6» рос в виде характерных для CWD МБТ [19] полиморфных палочковидных форм (рисунок 6). Клетки разной формы явно имели одинако-

вое происхождение и, вероятно, первично образовывались в протопластах (рисунок 7). В дальнейшем делящиеся клетки могли образовывать клетки с разной морфологией (рисунок 6).

Контрольный посев стимулятора роста с FBS, которую добавляли в культуральную среду с последующими 8 «слепыми» посевами, дал отрицательный результат.

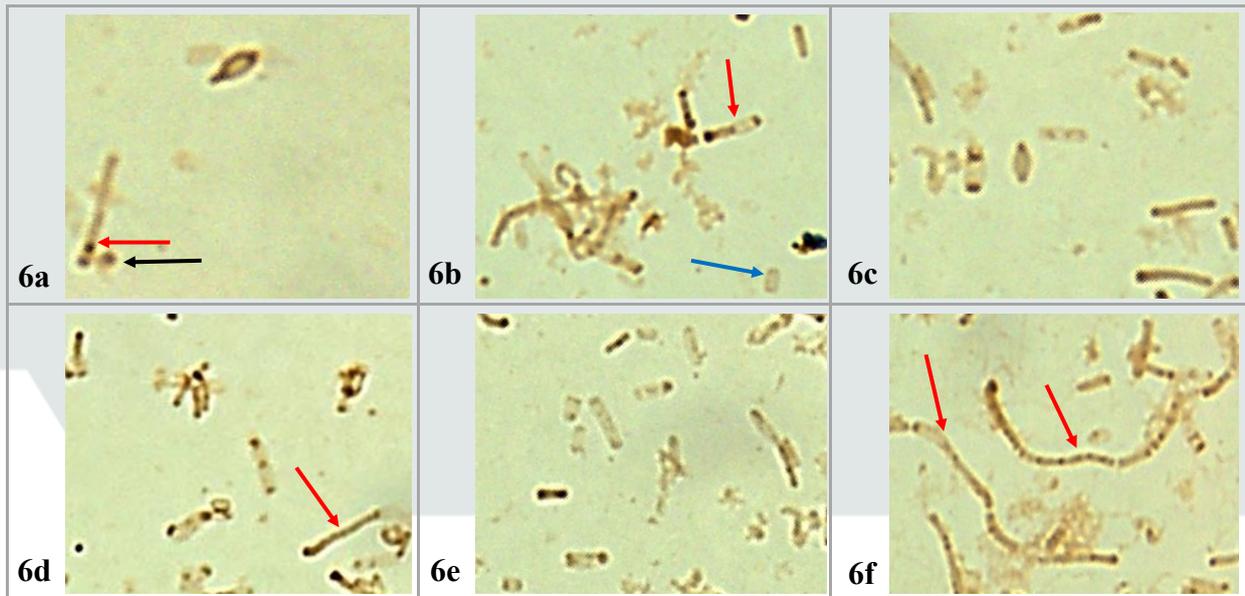


Рисунок 6. – «Is HeLa is 6» – характерные для CWD МБТ формы:
6а – пустая клетка с «хвостом», длинная палочка с 2 зернами (красная стрелка), коккоид (черная стрелка); **6б** – колбовидная клетка (красная стрелка), короткая «пустая» биполярная клетка (синяя стрелка);
6с–6f – веретеновидная клетка, толстые биполярные и зернистые палочки

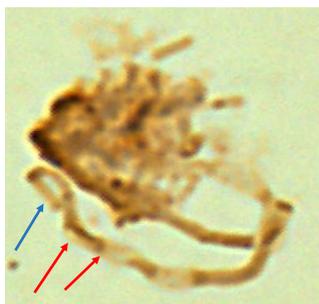


Рисунок 7. – Начало роста «Is HeLa is 6».
Образование в протопласте клеток разной морфологии:
 короткие зернистые и биполярные палочки, длинные толстые и «пустые» палочки. ДИП, 10x100

Бактериальную массу «Is HeLa is 6» дезинтегрировали, соникат после отделения детрита фильтровали через Amicon Ultracel® 100K и 3K, ультрафильтраты фильтровали через Millex® GP 0.22 µm и после 48 ч инкубации в стимуляторе роста (1:2, 37 °C) сеяли на среду МусСел DW.

Через 7 дней в пробирке I «слепого»

пересева ультрафильтрата 100 kDa появились желтоватые колонии – «Is HeLa 100 kDa+0.22» (рисунок 8). В мазках преобладали коккоиды, собранные в тетрады (рисунок 9а). В последующих посевах коккоиды группировались хаотично (рисунок 9б–д) и при длительном росте становились «пустыми» (рисунок 9с).

Коккоиды «Is HeLa 100 kDa+0.22» при ДИП окраске связывали антитела к антигенам *M. tuberculosis*, окрашивались в коричневый цвет (рисунок 9d), агглютинировались антисывороткой к *M. tuberculosis*



Рисунок 8. – Первичный рост «Is HeLa 100 kDa+0.22» в первом «слепом» пересеве (отдельные колонии по ходу петли)

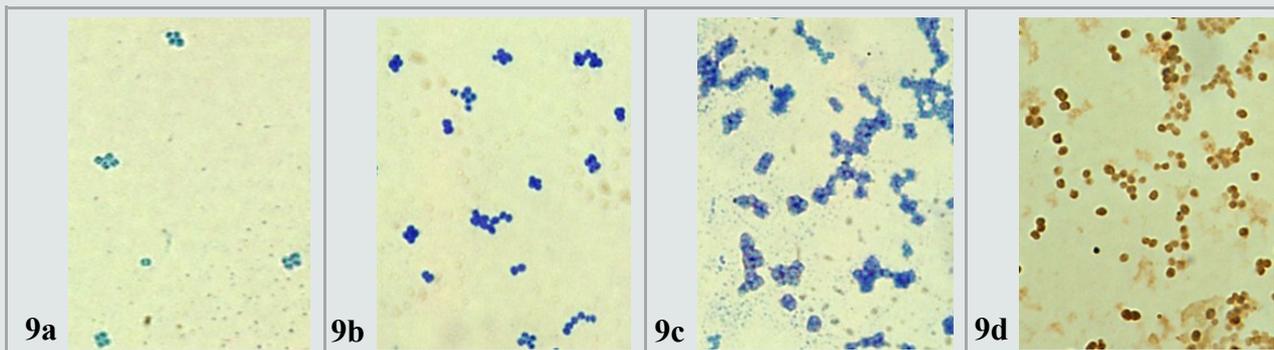


Рисунок 9. – «Is HeLa 100 kDa+0.22»: 9a – рост в 1-м «слепом» пересеве; 9b – рост во 2-м пересеве; 9c – «пустые» коккоиды при длительном росте без посева. 9a–9c – Kinyoun; 9d – ДИП окраска

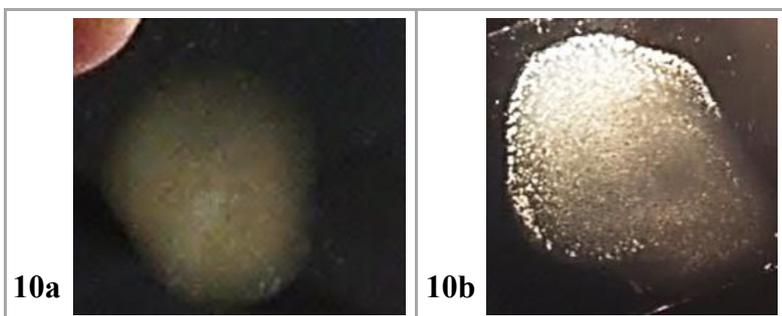


Рисунок 10. – РА «Is HeLa 100 kDa+0.22»: 10a – отсутствие агглютинации в сыворотке с высоким содержанием «нормальных» антител; 10b – агглютинация ++++ в антисыворотке к *M. tuberculosis* H₃₇Rv

Через 10 дней в 1-м «слепом» пересеве ультрафильтрата сониката «Is HeLa is 6», полученного фильтрацией через Amicon Ultracel® 3K, обнаружен газонный рост полиморфных палочек (рисунок 11), в том числе «пустых» клеток (рисунок 12), похожих на клетки материнского «Is HeLa is 6»

(рисунки 3, 4). В последующих пересевах клетки изолята «Is HeLa 3 kDa+0.22» приобретали характерный для CWD МБТ полиморфизм (рисунок 13) [19], как и клетки материнского штамма «Is HeLa is 6» (рисунки 3, 4, 6).



Рисунок 11. – Первичный рост в посевах ультрафильтрата 3K сониката «Is HeLa is 6» («Is HeLa 3 kDa+0.22»), Kinyoun, 10×100



**Рисунок 12. – «Is HeLa 3 kDa+0.22»
в 1-м пересеве:**

**12a – контроль инактивации ЭП;
12b – ДИП окраска, 10x100**

В одном из пересевов «Is HeLa 100 kDa+0.22» произошла трансформация коккоидов в ЧКУ зернистую массу (рисунок 14а), давшую рост типичных для СВД МБТ полиморфных палочковидных форм – «Is HeLa 100 kDa+0.22 rod» (рисунок 14 б). В ПЦР ДНК изолята реагировала с праймерами МРВ 70, МРВ 64 (рисунок 15) и IS 6110 (Cq 36,89).

В ИФА соникаты изолятов реагировали с разведениями антисыворотки к *M. tuberculosis* H₃₇Rv 1:1280-1:2560 и выше (таблица 1). По показателю Δ ОП с разведениями антисыворотки к *M. tuberculosis* H₃₇Rv наибольшим родством с типичными МБТ обладал изолят «Is HeLa 3 kDa+0.22». Остальные изоляты имели примерно та-

кую же степень антигенного родства с *M. tuberculosis* H₃₇Rv, как и штамм СВД *M. tuberculosis* H₃₇Rv (таблица 1).

В ИФА, РИД, РИЭФ, ПИЭФ ПГ с антисывороткой к СВД *M. tuberculosis* H₃₇Rv (таблица 2, рисунки 16–18) «Is HeLa is 6», «Is HeLa 100 kDa+0.22 rod», «Is HeLa 3 kDa+0.22» показали выраженное антигенное родство с СВД *M. tuberculosis* H₃₇Rv. Относительно слабо с ней реагировал только соникат «Is HeLa 100 kDa+0.22» (таблица 2), но по результатам иммунодиффузии (рисунки 19–21) было видно, что он содержал антигены, идентичные антигенам СВД *M. tuberculosis* и других изолятов, хотя в меньшей концентрации (рисунки 17–20).

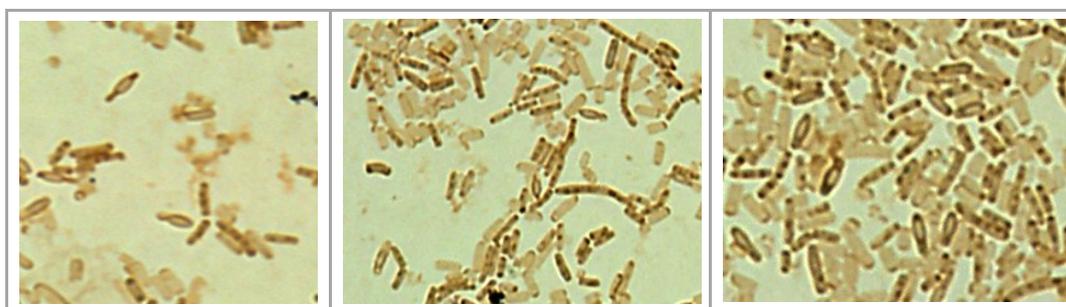


Рисунок 13. – Характерные формы клеток «Is HeLa 3 kDa+0.22», ДИП окраска, 10×100

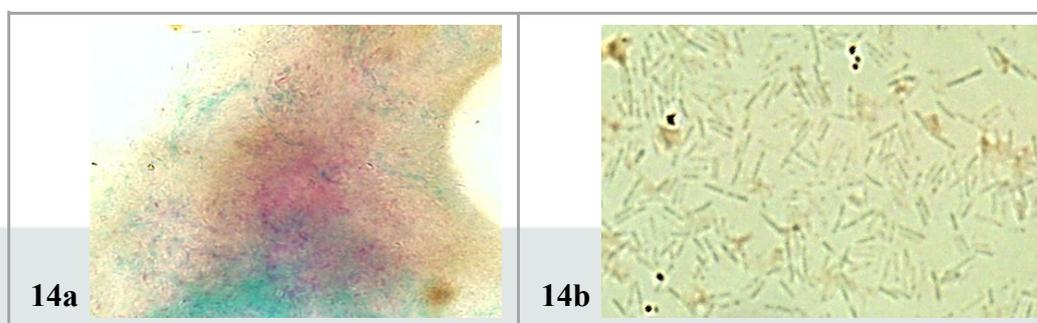


Рисунок 14. – Трансформация «Is HeLa 100 kDa+0.22»: 14a – ЧКУ клетки (красноватого цвета); 14b – рост трансформированной культуры в пересеве, Kinyoun, 10×100

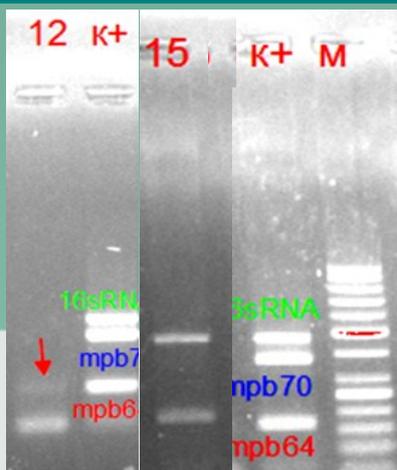


Рисунок 15. – Амплификаты, полученные в ПЦР с ДНК: 12 – «Is HeLa is 100 kDa+0.22»; 15 – «Is HeLa 100 kDa+0.22 rods» с праймерами 16s RNA, MPB70, MPB 64 (K+ – положительный контроль)

ИФА с антисывороткой к «Is HeLa is 6» показал антигенное родство изолятов, происшедших от этого штамма, на что указывали интенсивные реакции их соникатов с антисывороткой в разведении

1:2560 (таблица 3) и образование преципитатов в РИЭФ (рисунок 19). Близость антигенного состава изолятов HeLa подтверждалась и в РИЭФ с антисывороткой к «Is HeLa 3kDa+0.22» (рисунок 20).

Таблица 1. – $\Delta ОП^X$ в ИФА соникатов изолятов из клеток HeLa с антисывороткой *M. tuberculosis* H₃₇Rv

Разведения антисыворотки	Соникаты				
	CWD <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	Is HeLa is 6	Is HeLa 100+0.22	Is HeLa 100+0.22 rods	Is HeLa 3+0.22
1:20	4,6	4,3	3,3	3,7	2,3
1:40	5,7	6,7	3,5	3,8	3,1
1:80	5,9	4,0	3,8	3,9	4,9
1:160	4,7	3,3	4,7	3,9	5,8
1:320	2,4	4,2	4,4	5,0	8,4
1:640	2,7	2,3	4,1	3,2	5,4
1:1280	1,6	2,4	4,1	2,1	5,5
1:2560	1,4	1,4	2,6	1,9	5,8
Сумма $\Delta ОП$	29	28,6	30,5	27,5	41,2

Примечание – X – $\Delta ОП = ОП_{с исследуемой антисывороткой} : ОП_{с нормальной сывороткой крови}$

Таблица 2. – $\Delta ОП^X$ в ИФА соникатов изолятов из клеток HeLa с антисывороткой к CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv

Разведения антисыворотки	Соникаты				
	CWD <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	Is HeLa is 6	Is HeLa 100+0.22	Is HeLa 100+0.22 rods	Is HeLa 3+0.22
1:20	7,7	6,3	1,7	4,8	2,4
1:40	17,7	15,4	2,0	7,7	3,5
1:80	27,3	11,2	2,0	12,5	7,1
1:160	31,3	14,0	1,8	18,1	10,3
1:320	24,6	27,7	1,4	40,6	21,2
1:640	25,6	20,2	1,5	25,7	15,0
1:1280	21,5	24,7	1,6	26,7	19,8
1:2560	14,5	21,0	1,6	18,2	28,0
Сумма $\Delta ОП$	170,2	140,5	13,6	154,3	107,3

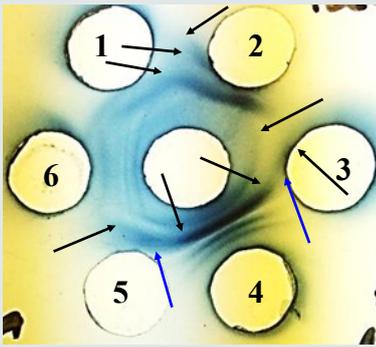


Рисунок 16. – РИД: в центре антисыворотка к CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv. В периферических лунках соникаты: 1 – CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv; 2 – «Is HeLa is 6»; 3 – «Is HeLa 100 kDa+0.22»; 4 – «Is HeLa 100 kDa+0.22 rods»; 5 – «Is HeLa 3kDa+0.22»; 6 – CWD МБТ из крови человека (АП) с латентной туберкулезной инфекцией

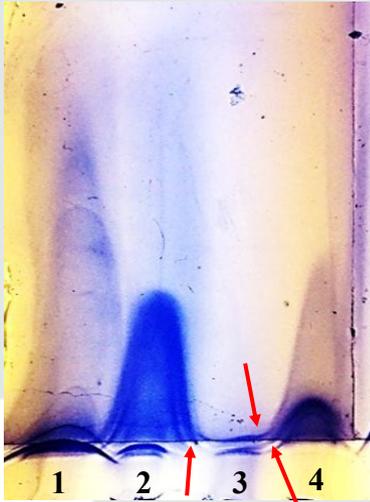
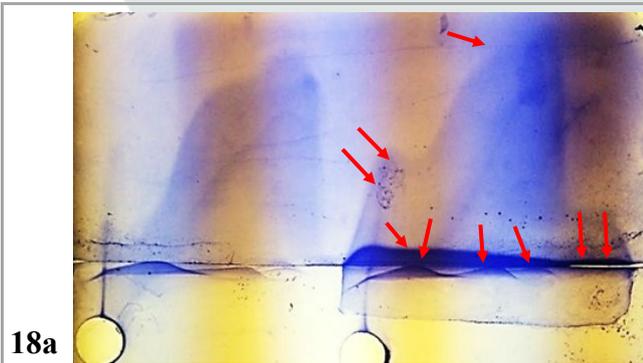
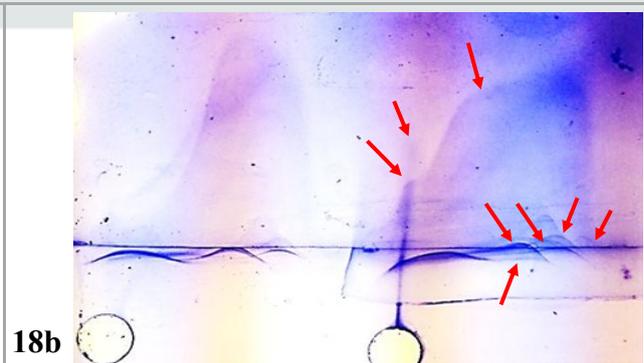


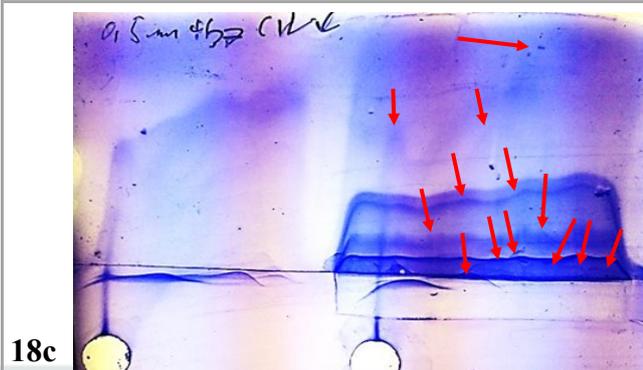
Рисунок 17. – РИЭФ соникатов: 1 – CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv; 2 – «Is HeLa is 6»; 3 – «Is HeLa 100 kDa+0.22»; 4 – «Is HeLa 3kDa+0.22» с антисывороткой к CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv. Соникат «Is HeLa 100 kDa+0.22» содержит общие антигены с CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv, идентичные антигенам «Is HeLa is 6» и «Is HeLa 3kDa+0.22», но в значительно меньшей концентрации (красные стрелки)



18a



18b



18c

Рисунок 18. – ПИЭФ ПГ сониката CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv (в геле I направления по 100 мкл в круглых лунках) с антисывороткой к CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv (в геле II направления, 44 мкл/см³ агарозы). В ПГ по 100 мкл соникатов: 18a – «Is HeLa is 6»; 18b – «Is HeLa 100 kDa+0.22»; 18c – «Is HeLa 3kDa+0.22». Общие антигены обозначены стрелками

Изоляты оказались устойчивыми к аминогликозидам, цефалоспорином, тетрациклином, частично к пенициллином, относительно слабо на них действовали макролиды. Только фторхинолоны эффектив-

но подавляли их рост (таблица 4). В целом профиль их лекарственной устойчивости был близок к CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv.

Изоляты меняли морфологию не только при первичном росте, но особенно

заметно под действием антибиотиков на границах зон задержки роста (рисунок 21). Интересно, что под действием стрептомицина, неомицина и левофлоксацина у «Is HeLa is 6» проявлялась ЧКУ и часть клеток окрашивалась в красный (с оттенками)

цвет (рисунок 21). Под влиянием наиболее эффективных фторхинолонов, вероятно, как адаптивная реакция, появлялись симпласты, дававшие рост неокрашивающихся ветвящихся форм (рисунок 21, стрелки).

Таблица 3. – Δ ОП^X в ИФА соникатов изолятов из клеток HeLa с антисывороткой к «Is HeLa is 6»

Разведения антисыворотки	Соникаты				
	CWD <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	Is HeLa is 6	Is HeLa 100+0.22	Is HeLa 100+0.22 rods	Is HeLa 3+0.22
1:20	6,8	6,0	2,3	4,7	2,2
1:40	11,4	15,5	2,8	6,5	3,4
1:80	14,3	12,2	2,7	9,5	6,5
1:160	12,7	16,0	3,2	12,9	9,1
1:320	7,8	31,5	2,9	27,3	15,8
1:640	6,7	23,6	3,1	14,2	12,0
1:1280	4,8	29,2	2,2	11,4	9,5
1:2560	3,1	23,4	1,9	5,3	10,4
Сумма Δ ОП	67,6	157,4	21,1	91,8	68,9

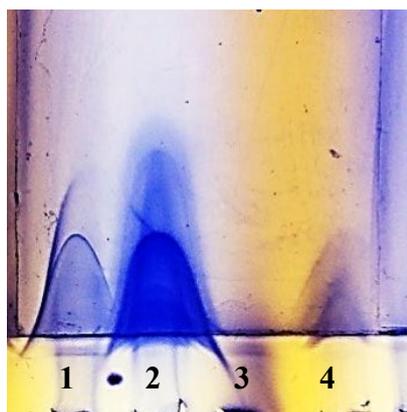


Рисунок 19. – РИЭФ соникатов:
1 – CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv; 2 – «Is HeLa is 6»;
3 – «Is HeLa 100 kDa+0.22»; 4 – «Is HeLa 3kDa+0.22»
с антисывороткой к «Is HeLa is 6»

Заражение морских свинок изолятами HeLa не вызвало у них признаков заболевания и явной потери живой массы, но через 1 месяц в лейкоцитах обнаружены антигены, реагирующие с антителами к *M. tuberculosis*, что при ДИП окраске придавало им коричневый цвет (рисунок 22).

Кроме того, в крови обнаруживались специфически окрашенные палочковидные формы с типичной для CWD МБТ морфологией (рисунок 22). В одном случае замечен контакт такой формы с макрофагом, содержащим антигены, связывавшие антитела к *M. tuberculosis* (рисунок 22).

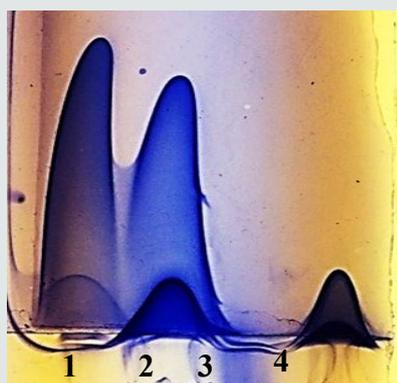


Рисунок 20. – РИЭФ соникатов:
 1 – CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv;
 2 – «Is HeLa is 6»; 3 – «Is HeLa 100 kDa+0.22»;
 4 – «Is HeLa 3kDa+0.22»
 с антисывороткой к «Is HeLa 3kDa+0.22»

Таблица 4. – Диаметры зон задержки роста (в мм) изолятов в диффузионном тесте со стандартными дисками антибиотиков

CWD МБТ	Пенициллины		Аминогликозиды			Азитромицин
	Пенициллин	Амоксициллин	Стрептомицин	Неомицин	Канамицин	
«Is HeLa is 6»	12 ^x	24	14	19±	15	22
«Is HeLa 3kDa+0.22»	0	12	8	14	18	22
CWD <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	0	25	22	24	21	22
CWD МБТ	Фторхинолоны		Цефалоспорины		Тетрациклин	
	Левифлоксацин	Ципрофлоксацин	Цефалотин	Цефаклор		
«Is HeLa is 6»	36	36	0	0	16	
«Is HeLa 3kDa+0.22»	32	34	0	0	18	
CWD <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	37	35	12	0	23	

Примечание – ^x красным шрифтом выделены результаты, указывающие на резистентность к антибиотику (диаметр зоны задержки 18 мм и менее)

На вскрытии у зараженных морских свинок не обнаружено заметных патологических изменений, кроме увеличения селезенки. Но при микроскопическом исследовании во внутренних органах всех зараженных животных обнаружены микрогранулемы с КУ зернистыми формами, часто

с коричневыми ореолами, свидетельствующими о присутствии антигенов, реагирующих с антителами к антигенам МБТ (рисунки 22–25). Кроме того, часть клеток внутренних органов по результатам ДИП окраски содержало антигены МБТ.

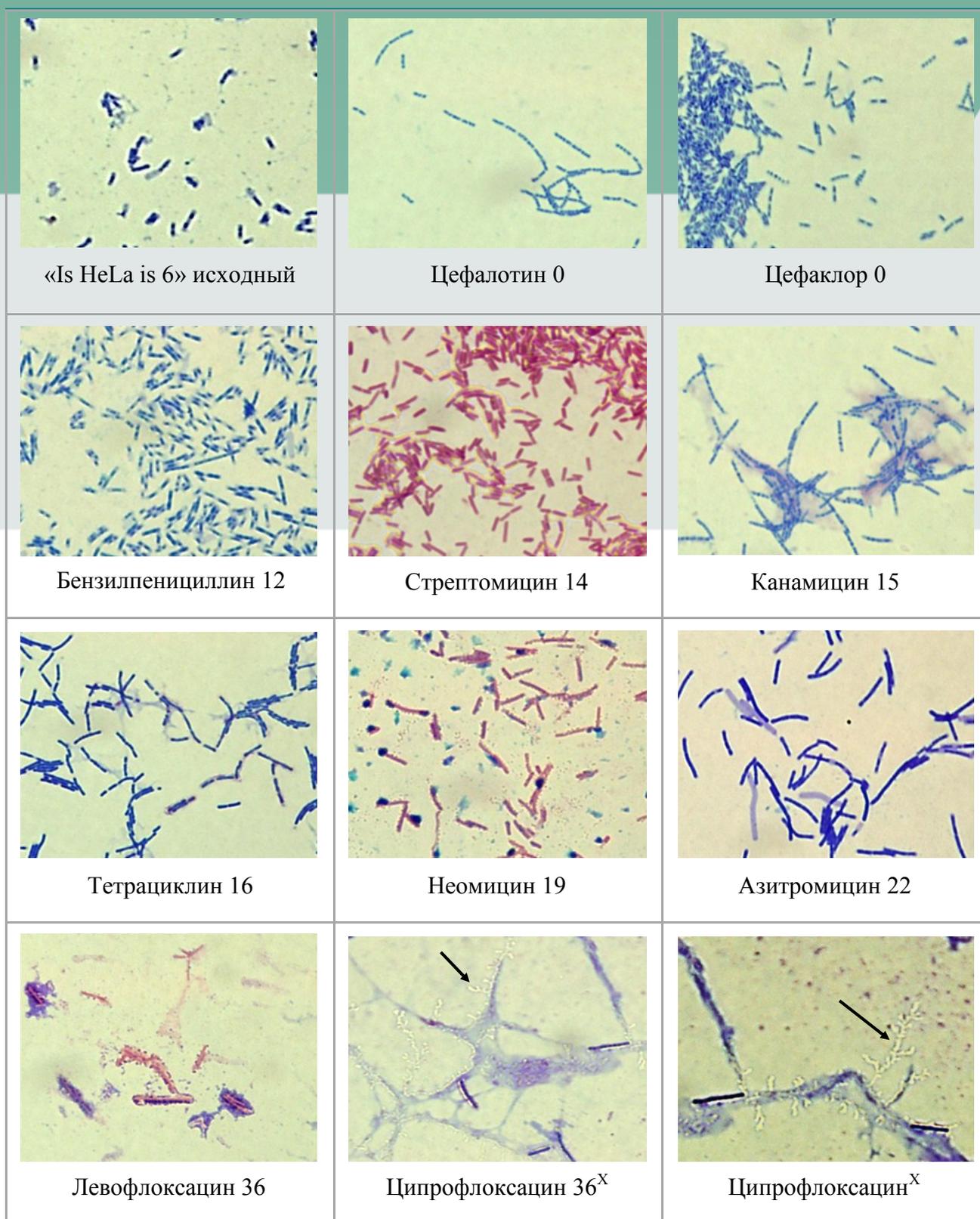


Рисунок 21. – Изменение морфологии «Is HeLa is 6» под действием антибиотиков на границе зоны задержки роста в диффузионном тесте. Размер зоны задержки роста в мм в соответствии с таблицей 4, ^Xстрелки – неокрашивающиеся ветвящиеся формы, Kinyoun 10×100

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее антигены, общие с МБТ, были найдены в гепатокарциномах, меланомах [23, 24, 25], в миелобластах (Kasumi-1) при миелоидном лейкозе, Т-лимфоцитах (Jurkat) при Т-лимфобластной лейкемии [20]. Если в ранних исследованиях [23, 24, 25]

это объяснялось возможным иммунохимическим родством антигенов тканей и микроорганизмов, не предполагая связи с МБТ, то из клеток Kasumi-1, Jurkat, FLK-BLV, HeLa были выделены CWD МБТ, что позволяет серьезно рассматривать роль туберкулезной инфекции в онкогенезе.

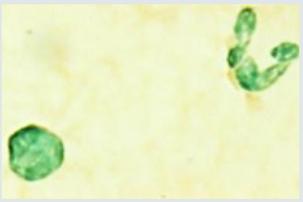
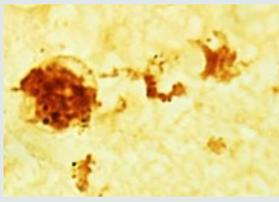
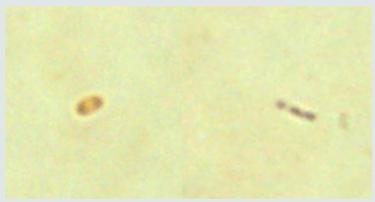
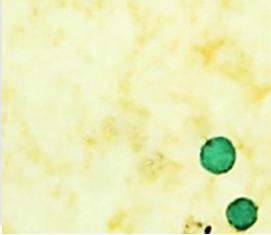
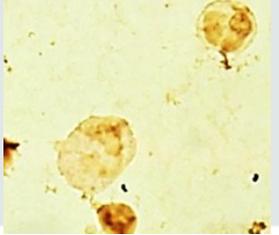
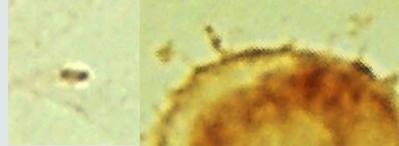
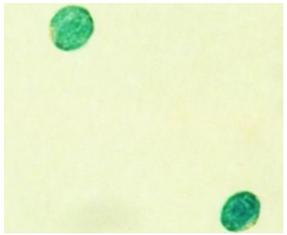
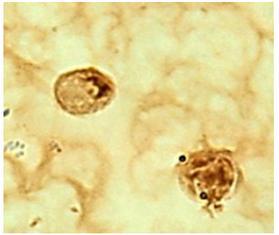
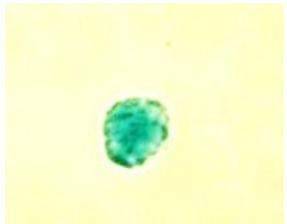
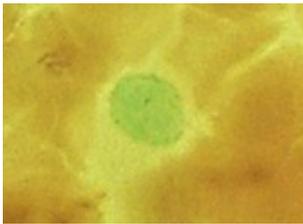
Заражены изолятом	Контроль инактивации ЭП	ДИП окраска	CWD МБТ в крови ДИП окраска
«Is HeLa is 6»			
«Is HeLa 100 kDa+0.22»			 CWD МБТ на макрофаге, содержащем антигены, связавшие антитела к <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv
«Is HeLa 3 kDa+0.22»			
Интактная морская свинка (контроль)			

Рисунок 22. – Обнаружение антигенов, реагирующих с антителами к *M. tuberculosis* H₃₇Rv в клетках крови морских свинок, зараженных изолятами из клеток HeLa

Факт выделения CWD МБТ из культур раковых клеток – еще не свидетельство того, что именно такая форма МБТ в них персистировала. «Is HeLa is 6» выделен благодаря использованию стимулятора роста и среды МусСел DW. Особенностью метода является то, что независимо от того, в

какой форме в пробе присутствуют МБТ (КУ палочки, в том числе инактивированные, L-, CWD, вирусоподобные, спороподобные, зернистые формы), в любом случае появляется рост CWD МБТ, своеобразного маркера туберкулезной инфекции. Инкубация в стимуляторе роста включает

программы восстановления и стимулирует рост CWD МБТ, чему способствуют и «слепые» пересевы, при которых происходит необходимый контакт и взаимодействие ростовых элементов. Регенерация МБТ в CWD форме биологически целесо-

образна ввиду ее повышенной жизнеспособности (рост на простых средах в широком диапазоне температур, адаптация к изменяющимся условиям, в том числе благодаря уникальному полиморфизму).



Рисунок 23. – Отпечатки органов морской свинки, зараженной «Is HeLa is 6».
Гранулемы с рубиново-красными (КУ) зернистыми МБТ: 23а – почка; 23b – легкое; 23d – селезенка; 23f – почки. Ткани и клетки, содержащие антигены, реагирующие с антителами к *M. tuberculosis* H₃₇Rv: 23b – легкое; 23c – печень; 23d – селезенка; 23f – почки). Палочковидные CWD МБТ (23b – легкое, синяя стрелка).
23а – Kinyoun, 23b–23f – ДИП окраска

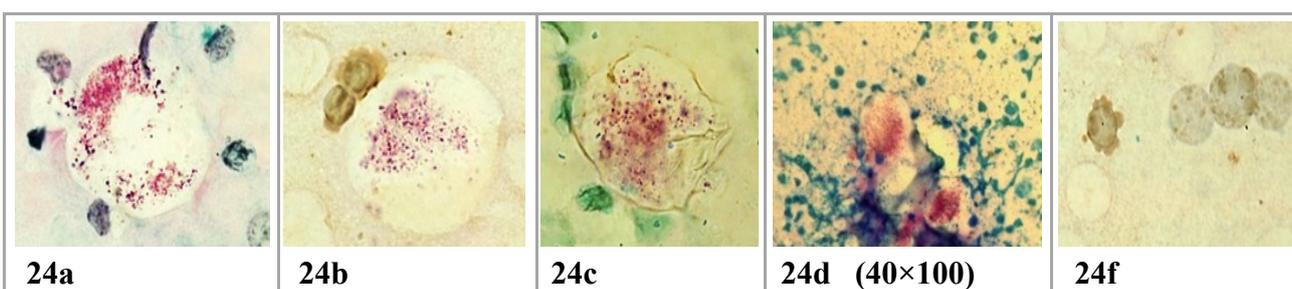


Рисунок 24. – Отпечатки органов морской свинки, зараженной «Is HeLa 100 kDa+0.22».
Гранулемы с рубиново-красными (КУ) зернистыми МБТ: 24а, 24b – печень; 24с – легкое; 24d – селезенка. Ткани и клетки, содержащие антигены, реагирующие с антителами к *M. tuberculosis* H₃₇Rv: 24b – печень; 24с – легкое; 24f – печень.
24а, 24d – Kinyoun, 24b, 24с, 24f – ДИП окраска

В лейкозных [20] и клетках HeLa не обнаружено типичных и CWD МБТ, которые могли синтезировать антигены и дать рост бактериальных форм. Возможно, в них персистировали трудноразличимые внутри клеток L-формы МБТ в виде зерен, вакуолей или диффузных протопластов [4, 17]. Необычные свойства изолятов [20, 22] позволяют предположить существование и неизвестных форм персистирования МБТ в клетках, в том числе с интеграцией генома или его фрагментов в геном хозяина [15, 16, 17]. Ведь «Is HeLa is 6», как и изоляты

из клеток Kasumi-1 и Jurkat [20], демонстрировали своеобразную «бессмертность» и образование супермелких и суперустойчивых форм типа прионов и нанобактерий. То, что оставалось от их клеток после летального химического и механического разрушения, удаления детрита и молекул крупнее не только 100 kDa, но и 3 kDa (!?), давало рост клеток, почти не отличавшихся не только от материнского изолята, но и от экспериментально полученного штамма CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv.

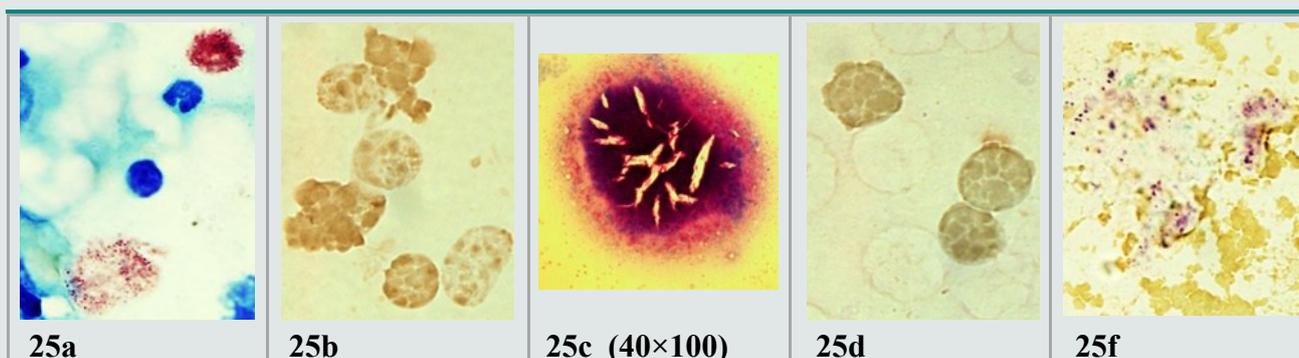


Рисунок 25. – Отпечатки органов морской свинки, зараженной «Is HeLa 3 kDa+0.22». Гранулемы с рубиново-красными (КУ) зернистыми МБТ: 25а – легкое; 25с – печень; 25f – селезенка. Ткани и клетки, содержащие антигены, реагирующие с антителами к *M. tuberculosis* H₃₇Rv: 25b – легкое; 25d – печень; 25f – селезенка.
25а, 25с – Kinyoun, 25b, 25d, 25f – ДИП окраска

Интересно, что такая «бессмертность», «суперфильтруемость», невероятный механизм передачи генетической информации, обеспечивающие регенерацию клеток, изначально присущи МБТ [22]. Причем «ультрафильтруемость» обнаружена 90 лет назад, когда было установлено, что какие-то формы МБТ проходили через коллодиевые фильтры, не пропускавшие столбнячный (150 kDa) и дифтерийный токсины (62 kDa) [27] и задерживались только фильтром 397 Da (фильтруемость азотно-кислого стрихнина) [28]!

Безусловно, констатирую уникальные свойства МБТ и возможности новых методов культивирования, необходимо оценить риск возможной контаминации. Компонент, который потенциально мог содержать МБТ – эмбриональная сыворотка (FBS). Но ее получают от эмбрионов туберкулиноотрицательных коров и стерилизуют фильтрацией через тройные мембранные фильтры 0,1 μm. То есть, типичные МБТ не должны попасть в конечный продукт. В исследованиях использовали FBS дополнительно стерилизованную гамма-лучами.

Это исключает спорную возможность присутствия в ней фильтрующихся форм МБТ. Самое главное – контрольный посев FBS со стимулятором роста, позволявший восстановить жизнеспособность даже инактивированных фильтрующихся форм [22], если они в ней находились, дал отрицательный результат.

Участью МБТ в канцерогенезе способствует свободное проникновение в клетки, чему помогает локализующийся в клеточной стенке белок Mse4A [29]. Пероксид водорода, лизоцим и другие защитные факторы, убивающие внутри клетки обычную микрофлору, для МБТ являются трансформирующими агентами, превращающими их в CWD (L-) [30], а главное – в вирусоподобные формы. На это указывает идентичность морфологии первичных изолятов из лизированной и профильтрованной через фильтр 0.22 μm крови человека с латентной туберкулезной инфекцией, из клеток HeLa и ультрафильтрата 3 kDa (рисунки 26, 27), восстанавливающихся из фильтрующихся вирусоподобных форм.

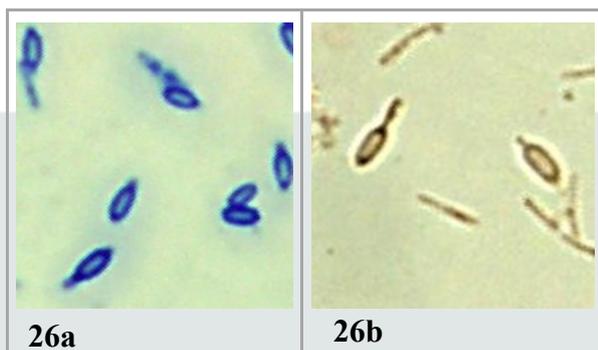


Рисунок 26. – Первичный рост:
26а – фильтрованной через фильтр 0.22 μm лизированной крови человека с латентной туберкулезной инфекцией;
26b – «Is HeLa is 6».
Видны «пустые» клетки с «хвостом».
26а – Kinyoun, 26b – ДИП окраска



27a



27b

**Рисунок 27. – Пересев роста:
27a – фильтрованной через фильтр
0.22 μm гемолизированной крови
человека с латентной туберкулезной
инфекцией (ЧКУ клеток);
27b – «Is HeLa 3kDa+0.22»,
Kinyoun, 10 \times 100**

Персистенция МБТ в клетках может вызывать геномную нестабильность [31, 32], облегчающую интеграцию генов МБТ, включая гены «бессмертия». Придание инфицированным клеткам хозяина «бессмертности» дает МБТ возможность размножаться с каждым их делением, избегая контакта с иммунной системой, наступающим при апоптозе клеток.

На изоляты из клеток HeLa эффективно действовали только фторхинолоны. Это еще не значит, что они могут применяться для лечения рака, так как МБТ явно не персистируют в клетках в бактериальной форме. Но не исключено, что на каких-то этапах онкогенеза, когда в крови и тканях появляются CWD МБТ, они могут быть полезны, тем более известно, что многие противораковые лекарства эффек-

тивно действуют на МБТ [33].

Выделенные изоляты по фенотипу резко отличались от типичных КУ МБТ. Тем не менее, они имели общие антигены, у них проявлялась частичная кислотоустойчивость, особенно после контакта с некоторыми антибиотиками. Но не только результаты ПЦР были решающими в их идентификации. При заражении изолятами морских свинок во всех случаях они вызывали образование микрогранулем с КУ зернами, что характерно для латентной туберкулезной инфекции МБТ со сниженной патогенностью.

Полученные результаты, конечно, не бесспорны, но они демонстрируют наличие у МБТ необычных свойств и необходимость изменения подходов к профилактике туберкулезной инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. *The Frequency Of Tuberculosis In Man* // *JAMA*. – 2009. – Vol. 302. – № 15. – P. 1709.
2. Houben, R. M. G. J. *The Global Burden of Latent Tuberculosis Infection: A Re-estimation Using Mathematical Modelling* / R.M.G.J. Houben, P. J. Dodd // *PLOS Medicine*. – 2016. – Vol. 13. – *The Global Burden of Latent Tuberculosis Infection*. – № 10. – P. e1002152.
3. Митинская, Л. А. 80 лет вакцинирования БЦЖ / Л. А. Митинская // *Проблемы туберкулеза*. – 2001. – № 1. – С. 51–53.
4. *Mycobacterial L-forms are found in cord blood: A potential vertical transmission of BCG from vaccinated mothers* / N. Markova [et al.] // *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. – 2016. – Vol. 12. – *Mycobacterial L-forms are found in cord blood*. – № 10. – P. 2565–2571.
5. *Latent Mycobacterium tuberculosis Infection* / H. Getahun [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2015. – Vol. 372. – № 22. – P. 2127–2135.
6. Дорожкова, И. Р. *Скрыто протекающая туберкулезная инфекция* / И. Р. Дорожкова, С. С. Земскова. – М. : Медицина, 1984. – 222 с.
7. 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.
8. Sternberg H. *Experimentelle Untersuchungen uber die Wirkung toter TBC* / H. Sternberg // *Verhandl. d. Deutsch. patol. Ges.* – 1902. – P. 204.
9. Young, J. *Description of an Organism Obtained from Carcinomatous Growths* / J. Young // *Edinb Med J*. – 1921. – Vol. 27. – № 4. – P. 212–221.

10. Nuzum, J. *The experimental production of metastasizing carcinoma of the breast of the dog and primary epithelioma in man by repeated inoculation of a micrococcus isolated from human breast cancer* / J. Nuzum // *Surg Gynecol Obstet.* – 1925. – № 11. – P. 343–352.
11. Sweany, H. C. *Mutation forms of the tubercle bacillus* / H. C. Sweany // *JAMA.* – 1926. – Vol. 87. – № 15. – P. 1206–1211.
12. Alexander-Jackson, E. *A specific type of microorganism isolated from animal and human cancer* / E. Alexander-Jackson // *Bacteriol Org Growth.* – 1954. – № 18. – P. 37–51.
13. Diller, I. *Experiments with mammalian tumor isolates* / I. Diller // *Ann NY Acad Sci.* – 1970. – № 174. – P. 655–674.
14. Livingston, V. *Cancer: a new breakthrough* / V. Livingston, V. Wuerthele-Caspe. – Los Angeles: Nash Publishing, 1972. – 269 p.
15. Tian, Y. *Detection of Mycobacterium tuberculosis L-forms and MPB64 gene in breast cancer tissues* / Y. Tian, X. K. Cui, T. Hao // *J. of Practical Medicine.* – 2013. – № 15. – P. 45–46.
16. *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.
17. *Association of Mycobacterium tuberculosis L-formmpb64 gene and lung cancer* / M. Abudureheman [et al.] // *European Review for Medical and Pharmacological Sciences.* – 2019. – Vol. 23, № 1. – P. 113–120.
18. *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.
19. *Вирус бычьего лейкоза – вирусоподобная форма микобактерий туберкулеза?* / А. П. Лысенко [и др.] // *Экология и животный мир.* – 2019. – № 1. – С. 15–24.
20. *Вероятная связь миелоидного и лимфобластного лейкоза с туберкулезной инфекцией* / А. П. Лысенко [и др.] // *Эпизоотология, иммунобиология, фармакология, санитария.* – 2020. – № 1. – С. 23–39.
21. *Выявление микобактерий туберкулеза в тканях с помощью дифференцирующей иммунопероксидазной окраски* / А. П. Лысенко [и др.] // *Туберкулез и болезни легких.* – 2014. – № 10. – С. 55–58.
22. *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.
23. *Borsos, T. Antigenic Relationship Between Mycobacterium bovis (BCG) and a Guinea Pig Hepatoma* / T. Borsos, H. J. Rapp // *JNCI: Journal of the National Cancer Institute.* – 1973. – Vol. 51, № 3. – P. 1085–1086.
24. *Bucana, C. Immunoelectronmicroscopic Analysis of Surface Antigens Common to Mycobacterium bovis (BCG) and Tumor Cells* / C. Bucana, M. G. Hanna // *JNCI: Journal of the National Cancer Institute.* – 1974. – Vol. 53, № 5. – P. 1313–1323.
25. *Minden, P. Shared antigens between human malignant melanoma cells and Mycobacterium bovis (BCG)* / P. Minden, T. R. Sharpton, J. K. McClatchy // *Journal of Immunology.* – 1976. – Vol. 116. – № 5. – P. 1407–1414.
26. *The tuberculin skin test: How safe is safe? – the tuberculins contain unknown forms capable of reverting to cell-wall-deficient mycobacteria* / A. P. Lysenko [et al.] // *Clinical and Experimental Medical Sciences.* – 2014. – Vol. 2. – P. 55–73.
27. *Sanarelli, G. Demonstration in vivo et in vitro des formes filtrantes du virus tuberculeux* / G. Sanarelli, A. Alessandrini // *C. rend. Soc. Biol.* – 1930. – Vol. 104. – P. 1241.
28. *Sanarelli, G. Demonstration in vivo de l'ultravirus tuberculeux* / G. Sanarelli, A. Alessandrini // *C. rend. Soc. Biol.* – 1931. – Vol. 106. – P. 426–429.
29. *Characterization of Mce4A protein of Mycobacterium tuberculosis: role in invasion and survival* / N. Saini [et al.] // *BMC Microbiology.* – 2008. – Vol. 8, № 1. – P. 200.
30. *Mattman, L. H. Cell wall deficient forms: stealth pathogens* / L. H. Mattman. – 3rd ed. – Boca Raton: CRC Press, 2001. – 416 p.
31. *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.
32. *Mycobacterium tuberculosis promotes genomic instability in macrophages* / J. Castro-Garza [et al.] // *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* – 2018. – Vol. 113. – № 3. – P. 161–166.
33. *Broxmeyer, L. Cancer and the Science of Denial – with Breast Cancer* / Long Island Breast Cancer / L. Broxmeyer // *Journal of Tumor Medicine and Prevention.* – 2017. – Vol. 1, № 3. – P. 555–563.