

DOI: 10.31393/reports-vnmedical-2019-23(1)-02

УДК: 616-002.5-078.7:576.8:576.852.2

МІКОБАКТЕРІЇ ТУБЕРКУЛЬОЗУ З ДЕФЕКТНОЮ КЛІТИННОЮ СТІНКОЮ, ВІЯВЛЕНІ У МОЗКУ БІОЛОГІЧНОЇ МОДЕЛІ ІЗ СПОНГІОЗНИМИ ЗМІНАМИ

Лисенко О.П.¹, Власенко В.В.², Палій Г.К.³, Власенко І.Г.², Назарчук О.А.³

¹РУП "Інститут експериментальної ветеринарії ім. С.Н. Вишелеського" (вул. Брікета, 28, м. Мінськ, Республіка Білорусь, 220003),

²Вінницький торговельно-економічний інститут Київського національного торговельно-економічного університету (вул. Соборна, 87, м. Вінниця, Україна, 21050)

³Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова (вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, Україна, 21018)

Відповідальний за листування:
e-mail: g_paliy@ukr.net

Статтю отримано 14 листопада 2018 р.; прийнято до друку 21 грудня 2018 р.

Анотація. Мікобактерії туберкульозу наділені стійкістю до несприятливих чинників та швидко формують медикаментозну стійкість. Мета - дослідження зв'язку туберкульозної інфекції та розвитку ураження мозку з ознаками спонгіоморфних змін. Досліджували консервовані 10% формаліном фрагменти головного мозку 2 кіз з ознаками ураження центральної нервової системи за допомогою гістологічних, мікробіологічних методів. Для мікробіологічного дослідження посів проб мозку проведений через 3-5 років на поживне середовище МусСел DW із стимулятором росту. Молекулярно-генетичне дослідження проводили за допомогою полімеразної ланцюгової реакції на приладі Molecular Imager GelDoc TM XR + (BioRad). Поліпептидний профіль досліджували електрофоретично. У кіз, полеглих з ознаками ураження центральної нервової системи, в мозку виявлені губкоподібні зміни. У пробах мозку виявлена ДНК і мікобактерії туберкульозу з дефектною клітинною стінкою, в клітинах мозку і в міжклітинному просторі відмічено накопичення мікобактеріальних антигенів. Попри те, що проби мозку, знаходилися в 10% формаліні 1 місяць, 3 роки і 5 років, у всіх випадках були виділені мікобактерії туберкульозу з дефектною клітинною стінкою. Їх життєздатність була порівнянна з інфекційністю пріонів. Ізоляти мікобактерій туберкульозу з дефектною клітинною стінкою з мозку не відрізнялися за морфологією і поліпептидним складом від ізолятів з туберкуліну, FLK - BLV, лімфатичних вузлів корів, хворих на туберкульоз. Таким чином, це вказує на високу вірогідність того, що мікобактеріальна інфекція залежно від інфікуючої дози, особливостей штаму і геному хазяїна, а також стану імунної системи, може спричиняти онкогенну дію, викликати активний туберкульоз, ураження мозку, серцево-судинної системи.

Ключові слова: туберкульозна інфекція, мікобактерії, кислостійкі палички, ізоляти мозку.

Вступ

Цілеспрямована боротьба з туберкульозом зупинила до середини XX століття пандемію хвороби, істотного понизила смертність і захворюваність, але не призвела до зникнення збудників хвороби [24]. Мікобактерії туберкульозу (МБТ) відрізняються резистентністю до несприятливих чинників, володіють досконалим механізмом інфікування, швидко формують медикаментозну стійкість. При потрапленні в організм невеликих доз МБТ з пониженою вірулентністю їх виживання забезпечується трансформацією у форми з дефектною клітинною стінкою (cell wall deficient - CWD), що пристосовані до тривалої персистенції [1, 13, 16, 20]. При цьому різко міняється морфологія і властивості МБТ [1, 2, 3, 4, 8], аж до появи елементарних тілець діаметром біля 0,22 мкм, що проходять через стерилізуючі фільтри [20]. Ймовірно, МБТ можуть утворювати і дрібніші форми. Вдавалося отримувати ріст CWD МБТ з автоклавованої культуральної рідини *M. bovis* послідовно пропущеної через фільтр Durapore 0,22 мкм і полісульфонову мембрану Biomax 300K [17]. Здатність утворювати спору подібні форми [14], що витримують навіть автоклавування робить МБТ, фактично, "безсмертними" [17].

Незвичайні властивості МБТ та CWD форм дали підстави розглядати їх, як етіологічних агентів захворювань, які традиційно не пов'язують з туберкульозною інфекцією. У пухлинах виявлені CWD (L-) форми МБТ і мікобактеріальна ДНК, у тому числі, інтегрована в ге-

ном хазяїна [13, 16, 21, 22, 25]. CWD МБТ виділені з культуральної рідини клітин нирки ембріона вівці, хронічно інфікованої вірусом бичачого лейкозу (FLK - BLV). Ймовірно, що те, що вважається BLV, може бути вірусоподібними формами CWD МБТ [4].

Отримані дані про роль CWD МБТ у розвитку саркової дози, серцево-судинної патології, цукрового діабету [5, 6, 7, 10, 18]. Відомо, що МБТ можуть долати гемато-енцефалічний бар'єр [16]. Передбачається, що вони можуть викликати симптоми спонгіоморфної енцефалопатії у великої рогатої худоби [9] і, можливо, бути причиною хвороби Альцгеймера [11].

Мета роботи - дослідження зв'язку туберкульозної інфекції та розвитку ураження мозку з ознаками спонгіоморфних змін.

Матеріали та методи

Досліджували консервовані 10% формаліном фрагменти головного мозку 2 кіз, полеглих (з інтервалом 2 роки) з ознаками ураження центральної нервової системи (ЦНС). Сказ і лістеріоз були виключені.

Мікроскопія. Гістологічні зрізи мозку приготовані за загальноприйнятою методикою і забарвлені гематоксилін-еозином. Мазки-відбитки проб мозку фіксували протягом 2 годин при 65°C, забарвлювали за Цілю-Нільсеном і диференціюючим імунопероксидазним (ДІП) методом [30], що включав:

- пригнічення ендогенної пероксидази 3% H_2O_2 і охолодженням метанолом - 20 хвилин;
- фарбування карболовим фуксином Kinyoun - 5 хвилин;
- знебарвлення солянокислим спиртом - 70 секунд;
- фарбування 0,3% метиленовим синім - 2 хв.;
- нанесення кон'югата пероксидази з афінно-очищеними антитілами до *M.bovis* (у ЗФР з 0,02% твіну - 20) - 1,5 години;
- нанесення субстратного розчину (10 мг 3,3 діамінобензидину "Fluka" в 2 мл ДМСО, 10 мл деіонізованої води, 10 мкл 33% H_2O_2) - 15 хв.

На кожному етапі мазки промивали водою з 0,02% твіну 20. При ДІП забарвленні кислотостійкі (КС) МБТ забарвлювалися в червоний, не кислотостійкі (НКС) CWD МБТ і антигени МБТ - в коричневий, немікобактеріальна мікрофлора і клітини тканин - у синій колір.

Мікроскопію проводили на мікроскопі "Olympus 51BX".

Посів проб мозку. Перший посів проб мозку проведений після 1 місячної консервації проб у 10% формаліні. Повторний посів проб мозку, що знаходилися у 10 % формаліні, проведений через 5 років (мозок №1) і через 3 роки (мозок №2).

Для посіву використали стимулятор росту ВКГ (Патент України №43467), стимулятор росту і поживне середовище МусСел DW [11,13,21].

Проби мозку (3-4 г) витягали з формаліну, поміщали в стерильні ємкості з 100 мл стерильної води. Через 12 год. їх гомогенізували в 10 мл стимулятора росту. Гомогенати інкубували 48 год. при 370C і висівали по 300 мкл на пробірки з середовищем МусСел DW. Посіви інкубували при 370C 10 днів.

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). Гомогенати мозку і суспензії культур у буфері, що лізує, прогрівали 5 хв. при 950C. ДНК з лізатів виділяли на колонках з сорбентом (ИБОХ НАН РБ). Ампліфікацію проводили по стандартному протоколу з праймерами 16s RNA і МРВ 70 ("Праймтех") на

S1000TM ThermoCycler (BioRad), електрофорез ампліфікатів - в 2% агарозі (Sigma). Результати враховували на Molecular Imager GelDoc TM XR + (BioRad).

Для дослідження поліпептидного профілю бактерійну масу ізолятів 3-х кратно відмивали 0,5% розчином фенолу при 14 тис. об./хв., ПРОГРІВАЛИ У 2-Х БУФЕРІ для нанесення 5 хв. при 990C і піддавали електрофорезу в 15% ПААГ-ДСН (Laemmli. 1970).

Результати

У гістозрізах мозку на рівні верхнього відділу і варолієвого мосту виявлені стази і тромбози судин, розширення просвіту судин, периваскулярна інфільтрація, клітинні муфти з лімфоїдних клітин і одиничних гістіоцитів, проліферація клітин глії і губчастість мозку (рис. 1).

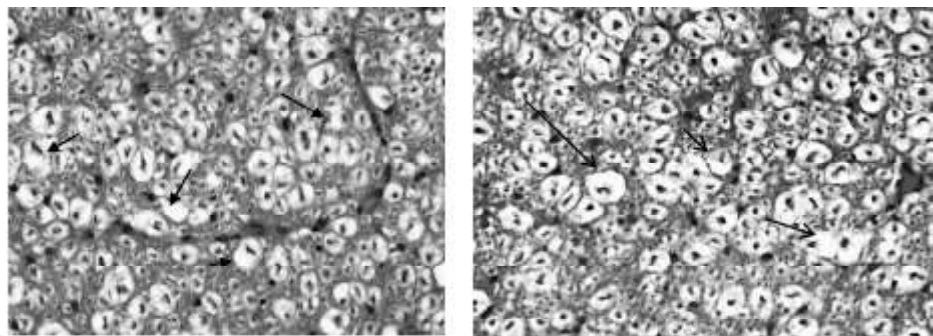


Рис. 1. Гістологічні зрізи мозку біологічних моделей (кіз): 1а - мозок №1, 1b - мозок №2. Помітна губчастість мозку (стрілки). Забарвлення гематоксилін-еозином, 10х20.

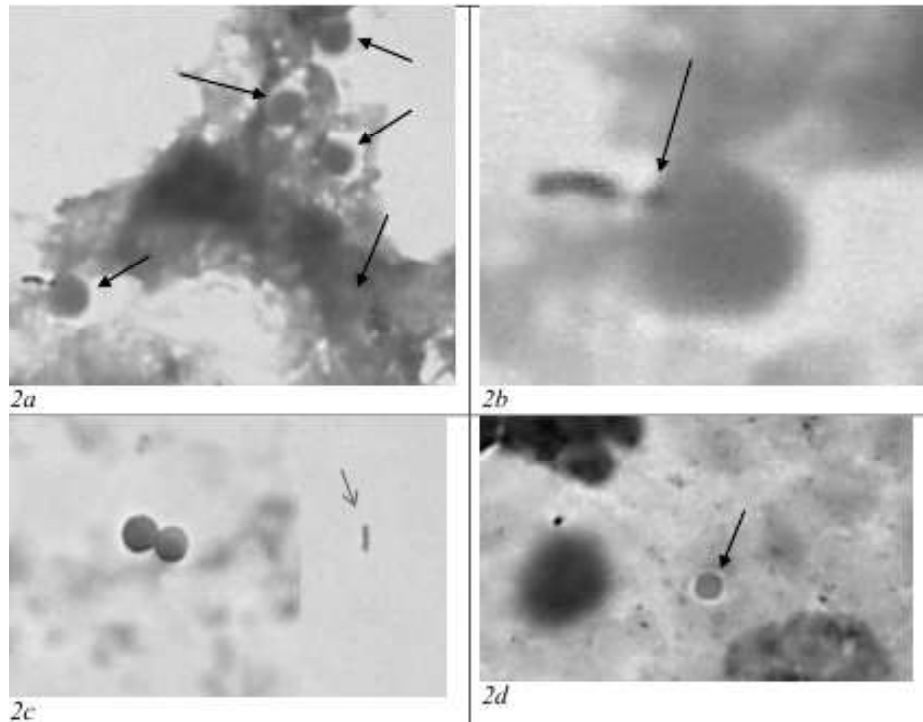


Рис. 2. 2а - відбиток мозку №1, помітні червоні (КС) шаровидної форми (стрілки); 2b - збільшений фрагмент рисунку 2а. Червона КС паличка, зв'язана з шаровидною формою, Ц-Н, 10х100; 2с - відбиток мозку №1, ДІП забарвлення. Видно коричневі шаровидні форми та червона паличка, 10х100; 2d - відбиток мозку №2. Видно червону (КС) шаровидну форму, Ц-Н, 10х100.

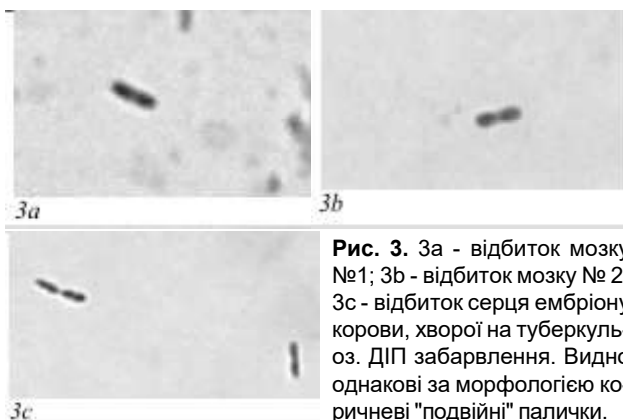


Рис. 3. 3а - відбиток мозку №1; 3б - відбиток мозку №2; 3с - відбиток серця ембріону корови, хворої на туберкульоз. ДІП забарвлення. Видно однакові за морфологією коричневі "подвійні" палички.

При мікроскопії відбитків мозку виявлені частково кислотостійкі (червоного кольору) кулясті форми (рис. 2а, 2д), які в мозку №1 зустрічалися у великих кількостях, а в мозку №2 рідше. У одному випадку така шаровидна форма була пов'язана з частково кислотостійкою (КС) паличкою, яка могла бути віднесена до мікобактерій (рис. 2б). Такий зв'язок і часткова КС кулястих форм

дозволили припустити, що це сферопласти мікобактерій, тим паче, що при ДІП забарвленні, вони набували специфічний коричневий колір (рис. 2с).

При ДІП забарвленні у відбитках обох проб мозку окрім кулястих форм були виявлені червоно-коричневі (рис. 2с) і коричневі палички (рис. 3), які частіше зустрічалися в мозку №2 (рис. 3, 4) і мали майже ідентичну морфологію (рис. 3).

В обох зразках мозку були виявлені структури, з якими зв'язувалися антитіла до *M. bovis*: тяжи (4а), клітини з коричневими включеннями в цитоплазму (4а-4е) часто оточені коричневою "сіткою" (4е), великі сітководні утворення (рис. 4б). Це вказує на те, що CWD МБТ персистували в клітинах мозку і в міжклітинному просторі з накопиченням антигенів МБТ і, можливо, з утворенням сіткоподібних CWD МБТ.

Дослідження гомогенатів мозку в ПЛР показало присутність у них ДНК МБТ. Обидві проби дали реакцію з праймерами 16 s RNA і з MPB 70 tuberculosis -bovis complex (рис. 5).

Після відмивання фрагментів мозку стерильною водою, гомогенізації, 48 год., інкубації гомогенатів в стиму-

ляторі росту (370С), посіву на середовище МусСел DW через 3-5 діб було отримано рід дрібних скловидних колоній. У мазках росту мозку №1 були виявлені частково КС (червоно-коричневі) і НКс (коричневі) палички (рис. 5а), іноді зустрічалися типові КС палички (рис. 5б). У процесі росту була помітна трансформація частково КС паличок в НКс форми (рис. 6).

У мазках росту мозку №2 переважали НКс палички. Після декількох пересівів ізольовані з мозку №1 і №2 були представлені однаковими формами: некислотостійкими довгими біполярними паличками, товстими "порожніми" паличками, короткими біполярними паличками і веретеноподібними формами (рис. 7). Клітини з такою ж морфологією були виявлені в мазках експериментально отриманих CWD *M. bovis* Vallee (рис. 7с-7д).

Належність ізолятів з мозку №1 та №2 до МБТ підтверджено в ПЛР (рис. 8).

Ізоляти з мозку були поліморфними, але форми, що зустрічалися, були такими ж, як і

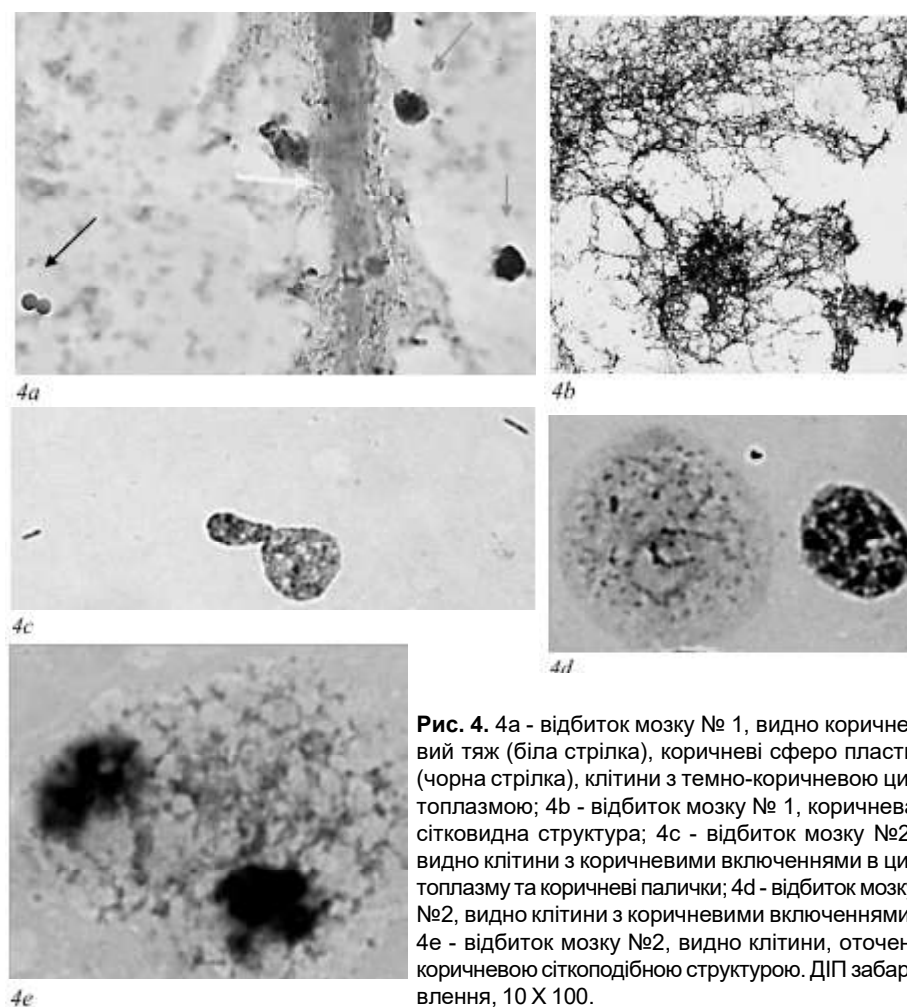


Рис. 4. 4а - відбиток мозку №1, видно коричневий тяж (біла стрілка), коричневі сферопласти (чорна стрілка), клітини з темно-коричневою цитоплазмою; 4б - відбиток мозку №1, коричнева сітководна структура; 4с - відбиток мозку №2, видно клітини з коричневими включеннями в цитоплазму та коричневі палички; 4д - відбиток мозку №2, видно клітини з коричневими включеннями; 4е - відбиток мозку №2, видно клітини, оточені коричневою сіткоподібною структурою. ДІП забарвлення, 10 X 100.

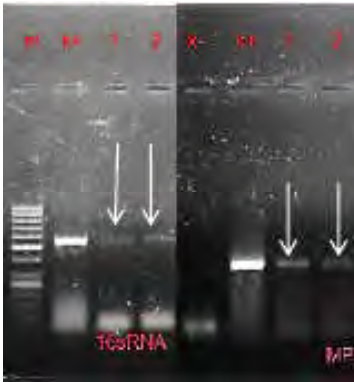
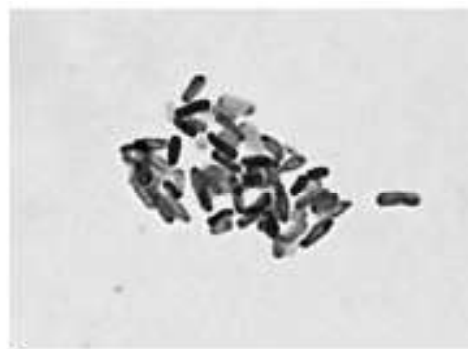


Рис. 5. Електрофорез ампліфікатів ДНК із гомогенатів проб мозку №1 (1) та №2 (2); k- - негативний контроль, k+ - позитивний контроль.

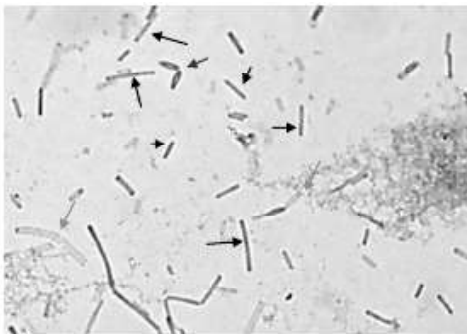


6a

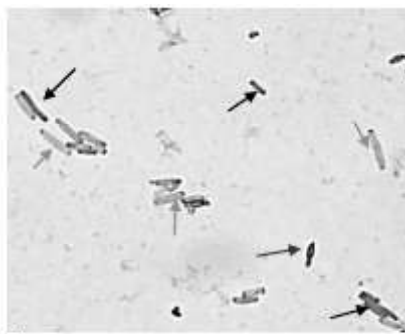


6b

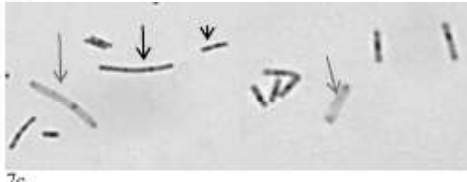
Рис. 6. Первинний ріст посіву мозку №1 на середовищі МусСел DW. 6a - видні частково кислото стійкі (червоно-коричневі) і не кислотостійкі (коричневі) палички; 6b - первинний ріст посіву мозку №1 на середовищі МусСел DW, видно декілька червоних КС паличок, оточених коричневими НКС паличками. ДІП забарвлення 10x100.



7a



7b



7c



7d

Рис. 7. 7a - ріст посіву мозку №2, 7b - ріст посіву мозку №1. довгі і короткі біполярні, іноді із зернами палички (чорні стрілки), товсті "порожні" палички (блакитні стрілки), веретено-подібні форми (червоні стрілки). 7c-7d - CWD M.bovis Vallee. Довгі і короткі біполярні, іноді із зернами палички (чорні стрілки), товсті "порожні" палички (блакитні стрілки), веретено-подібні форми (червоні стрілки).

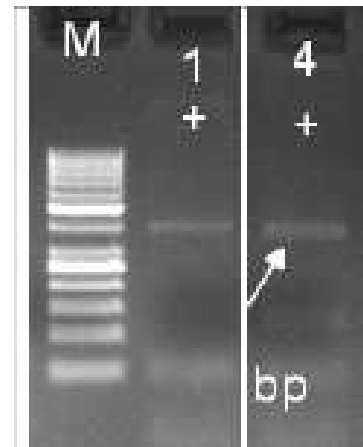
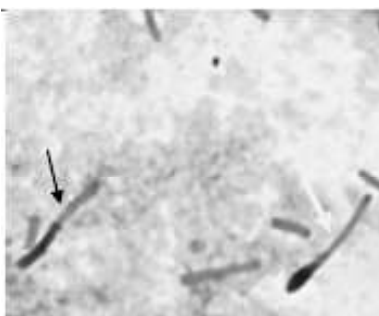


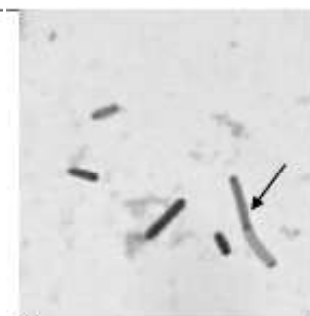
Рис. 8. Електрофорез ампліфікатів ДНК ізолятів з праймерами MPB 70 tuberculosis-bovis complex, 1 - ізолят з мозку №1, 4 - ізолят з мозку №2.



9a



9b



9c



9d

Рис. 9. 9a - ізолят з мозку №1 (частково КС паличка червоно-коричневого кольору ділиться з утворенням НКС палички коричневого кольору). Клітини з подібною морфологією виявлені в ізолятах з еталону ППД (9b), АГВЛ (9c), крові людини, хворої на туберкульоз (9d); 9b - утворення паличкоподібної біполярної форми веретеноподібною клітиною (біла стрілка).

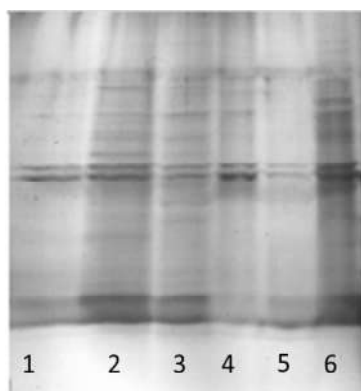
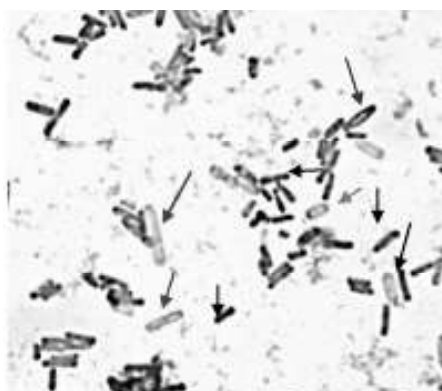


Рис. 10. Електрофорез ПААГ-ДСН 15% лізатів: 1 - ізолят з мозку №1, 2 - ізолят з мозку №2, 3 - ізолят з еталону ППД туберкуліну, 4 - ізолят з АГВЛ с.30, 5 - ізолят з АГВЛ с.27, 6 - CWD M.bovis BCG.



11a



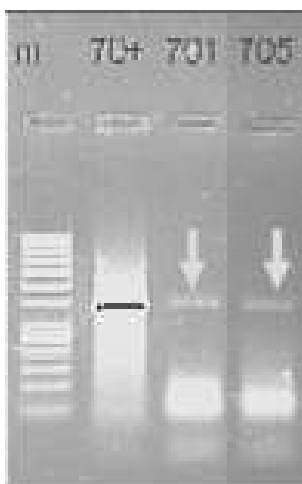
11b

Рис. 11. 11a - ріст посіву мозку №1, 11b - ріст посіву мозку №2. Довгі і короткі біполярні, іноді із зернами палички (чорні стрілки), товсті "порожні" палички (голубі стрілки), веретеноподібні форми (червоні стрілки). МусСел DW, ДіП забарвлення 10x100.

в CWD МБТ з інших джерел. У мазках могли одночасно зустрічатися довгі і короткі біполярні, відносно тонкі зернисті палички, товсті "порожні" палички, веретеноподібні форми, коки (рис. 7).

Такі ж форми були виявлені і у CWD МБТ з еталону ППД туберкуліну, АГВЛ, а також від хворих на туберкульоз людей і корів. Зокрема, на рисунку 9 представлена виявлена в ізолятах з мозку, туберкуліну, АГВЛ і крові людини хворої на туберкульоз дуже характерна форма з двох, пов'язаних між собою паличок з різною мірою КС, що представляє, ймовірно, або процес ділення або утворення різних форм CWD МБТ.

Обидва ізоляти з мозку мали однакові поліпептидні профілі (рис. 10.1 - 10.2), які були практично ідентичні профілю ізоляту з еталону ППД туберкуліну M.bovis (рис. 10.3). Лише у незначних деталях вони відрізнялись від профілю ізолятів з АГВЛ (рис. 10.4-10.5) і CWD M.bovis BCG (рис. 10.6).



Особливий інтерес мають результати посіву проб мозку після 5 і 3 років його знаходження в 10% формаліні. Через 2 дні після посіву досліджуваних проб у стимуляторі росту стало помітне помутніння поверхні поживного середовища, але видимих колоній не виявлено. Після "сліпого" пересівання обидві проби дали ріст дрібних колоній, що зливаються. У мазках були виявлені поліморфні паличко-

подібні форми (рис. 11), такі ж, як були виділені і при першому посіві (рис. 6, 7).

У ПЦР з праймерами MPB 70 було підтверджено, що ізоляти відносяться до МБТ (рис. 12).

Обговорення

Відомо, що менінгоенцефаліт виникає при занесенні в мозок МБТ з кров'ю з туберкульозних вогнищ в легенях і лімфатичних вузлах. У полеглих кіз у внутрішніх органах туберкульозних змін не було. Попри те, що в пробах мозку була присутньою ДНК МБТ, не було виявлено специфічних для туберкульозу епітеліоідно-клітинних гранул з казеозним некрозом, але були знайдені губкоподібні зміни.

У тканинах мозку не знайдено типових КС МБТ, але у великих кількостях виявлені різні форми CWD МБТ, відмічено накопичення антигенів МБТ у цитоплазмі клітин і в міжклітинному просторі. На нашу думку, саме персистенція трансформованих (CWD) МБТ могла стати причиною губкоподібних змін в мозку і розвитку симптомів захворювання. Вірогідність цього підтверджує виникнення симптомів спонгіформної енцефалопатії (BSE) у корови, інфікованої *Mycobacterium bovis* [18]. Відомо, що МБТ можуть утворювати елементарні тільця розміром менше 0,22 мк [20], які можуть подолати гемато-енцефалічний бар'єр і інфікувати клітини мозку.

Посів консервованих проб мозку на середовище Гельберга закономірно дав негативні результати. CWD МБТ були виділені, завдяки використанню стимуляторів росту і поживного середовища МусСел DW. Відомо, що МБТ у тканинах, фіксованих 10% формаліном, певний час можуть зберігати життєздатність. Повідомлялося про виділення 3 культур МБТ (2,17 з 138 проб фіксованого патологічного матеріалу [12], але при дослідженні музейних проб, що тривало знаходилися в 10% формаліні, в усіх випадках отриманий негативний результат. У проведених дослідженнях CWD МБТ були виділені з проб

мозку, що знаходилися в 10% формаліні 5 років і 3 роки. Тобто, життєздатність CWD МБТ була порівняна з інфекційністю пріонів.

Механізм відновлення життєздатності CWD МБТ після летальних впливів детально не вивчений. Вважається, що захисні форми МБТ, які утворилися під дією несприятливих чинників, активізуються стимулятором росту (БКГ або MycCel DW) і ростуть у вигляді CWD форм, а іноді і КС клітин на поживному середовищі з компонентами, необхідними для їх росту.

Обидва стимулятори росту і поживне середовище MycCel DW раніше успішно використовувались для виділення CWD МБТ з туберкуліну і лейкозних антигенів [4, 17].

Отримані результати до певної міри підтверджують припущення [9], що туберкульозна інфекція і CWD МБТ можуть бути причиною губкоподібних уражень мозку. CWD МБТ ізоляти з мозку, практично не відрізнялися за морфологією, антигенним і поліпептидним складом від CWD МБТ ізолятів з туберкуліну, АГВЛ, людей і тварин, хворих на туберкульоз. Ймовірно, що при попаданні МБТ в організм виникають ефекти (активний туберкульоз,

онкогенна дія, ураження мозку, серцево-судинна патологія та інші ефекти) залежать, від інфікуючої дози, особливостей штаму і значною мірою від генома хазяїна та стану його імунної системи. Зокрема простежується певний зв'язок латентної туберкульозної інфекції і хворобою Альцгеймера. Як правило, захворювання розвивається у літніх людей з віковими імунodefіцитами. У мозку накопичуються важко деградуючі продукти метаболізму CWD МБТ, у тому числі В-амілоїд [19], непряме підтвердження цьому - помітний вплив рифампіцину на агрегацію і нейротоксичність В-амілоїду [11, 19].

Висновки та перспективи подальших розробок

1. У сучасних умовах типові МБТ, швидше, грають роль інвазивної форми, яка у більшості випадків викликає латентну туберкульозну інфекцію, трансформуючись в CWD МБТ, які довільно персистують в організмі.

З цих позицій, перспективним є проведення подальших експериментально-клінічних досліджень у глобальному масштабі можливої персистенції CWD МБТ та їх здатності викликати дану інфекцію при масовому застосуванні вакцини БЦЖ та туберкуліну.

Список посилань

1. Власенко, В. В. (1998). *Туберкульоз в фокусі проблем сучасності*. Вінниця: Наука.
2. Лисенко, А. П., Власенко, В. В. & Broxmeyer, L. (2014). Феномен изменчивости микобактерий туберкулеза и его использование для обнаружения туберкулезной инфекции. Туберкулез - глобальная катастрофа человечества, Материалы I Международной заочной научно-практической конференции. Ростов-на-Дону.
3. Лисенко, А. П., Власенко, В. В., Лемиш, А. П., Новик Т. П., Михалевич Е. А. & Власенко, И. Г. (2014). Выявление микобактерий туберкулеза в тканях с помощью дифференцирующей иммунопероксидазной окраски. *Туберкулез и болезни легких*, 10, 55-58.
4. Лисенко, А. П., Власенко, В. В., Красникова, Е. Л. & Broxmeyer, L. (2018). Микобактерии обнаружены в культуральной жидкости почки эмбриона овцы, инфицированного вирусом бычьего лейкоза. Эпизоотология, иммунология, фармакология, санитария. *Международный научно-практический журнал РУП "ИЗВ им. С.Н.Виселесского"*, 1, 7-18.
5. Alavi, H. A. & Moscovici, E. A. (1996). Immunolocalization of cell-wall-deficient forms of Mycobacteria tuberculosis complex in sarcoidosis in sinus histiocytosis of lymph nodes draining carcinoma. *Histol Histopathol.*, 11 (3), 683-694. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8839759>.
6. Almenoff, P. L., Johnson, A., Lesser, M. & Mattman, L. H. (1996). Growth of acid fast L forms from the blood of patients with sarcoidosis. *Thorax*, 51, 530-533. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8711683>.
7. Anestad, G. & Hoel, T. (2001). Atherosclerosis and tuberculosis: are they both chronic infectious diseases. *Scand J Infect. Dis.*, 33, 797. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11728058>.
8. Beran, V., Havelkova, M., Kaustova, L., Dvorska, J. & Pavlik, I. (2006). Cell wall deficient forms of mycobacteria: a review. *Veterinarni Medicina*, 51 (7), 365-389. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=CZ2006000623>.
9. Broxmeyer, L. (2004). Is mad cow disease caused by a bacteria. *Medical Hypothesis*, 63, 731-739. DOI: 10.1016/j.mehy.2004.04.013.
10. Broxmeyer, L. (2005). Diabetes mellitus, tuberculosis and the mycobacteria: two millennia of enigma. *Medical Hypothesis*, 65 (3), 433-439. DOI:10.1016/j.mehy.2005.04.017.
11. Broxmeyer, L. (2016). *Alzheimer's Disease - How Its Bacterial Cause Was Found and Then Discarded*. Create Space, USA. ISBN-10: 1491287357; ISBN-13: 978-1491287354.
12. Gerston, K. F., Blumberg, L., Tshabalala, V. A. & Murray, J. (2004). Viability of myco-bacteria in formalin-fixed lungs. *Hum. pathol.*, 35, 571-575. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15138931>.
13. Guliang, H. & Tefu, L. (1999). Mycobacterium tuberculosis L-forms. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 10, 129-133.
14. Ghosh, J., Larsson, P., Singh, B., Pettersson, B. M. F., Islam, N. M., Sakhar, S. N. ... Kisebom, L. (2009). Sporulation in mycobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106 (26), 10781-10786. doi: 10.1073/pnas.0904104106.
15. Huaman, M., Henson, D., Ticona, E., Sterling, T. R. & Garvy, B. A. (2015). Tuberculosis and cardiovascular disease: linking the epidemics. *Tropical Disease, Travel Medicine and Vaccines*, 1, 10. doi: 10.1186/s40794-015-0014-5.
16. Mattman, L. (1993). *Cell Wall Deficient Forms: Stealth Pathogens*. Boca Raton: CRC Press. ISBN 9780849387678.
17. Lysenko, A. P., Vlasenko, V. V., Broxmeyer, L., Lemis, A. P., Novik, T. P. & Pritychenko, A. N. (2014). The tuberculin skin test: how safe is safe? The tuberculin contains unknown forms capable of reverting to cell-wall-deficient mycobacteria. *Clinical and Experimental Medical Sciences*, 2 (2), 55-73. <http://dx.doi.org/10.12988/cems.2014.445>.
18. Roels, S. & Walravens, C. (2003). Mycobacterium bovis meningitis in a cow with clinical signs of BSE. *Vet. Rec.*, 152 (26), 6807-6808. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12862170>.
19. Scharz, Ph. (1972). Amyloid degeneration and tuberculosis in the aged. *Gerontologia*, 8 (5-6), 321-362. <https://doi.org/10.1159/000211943>.

20. Slavchev, G., Michailova, L. & Markova, N. (2013). Stress-induced L-forms of *M. bovis*: challenge to survivability. *New Microbiologica*, 36, 157-166. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23686122>.
 21. Song, L. Y., Yan, W. S. & Zhao, T. (2002). Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in lung cancer tissue by indirect in situ nested PCR. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 22, 992-993. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12433626>.
 22. Tian, Y., Hao, T., Cao, B., Zhanget, W., Ma, Y., Lin, Q. & Li, X. (2015). Clinical End-Points Associated with *Mycobacterium tuberculosis* and Lung Cancer: Implications into Host-Pathogen Interaction and Coevolution. *BioMed Research Intern.*, 1-9. doi: 10.1155/2015/827829.
 23. Tomiyama, T. & Satoshi, A. (1994). Rifampicin prevents the aggregation and neurotoxicity of amyloid B protein in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 204 (1), 76-83. DOI:10.1006/bbrc.1994.2428.
 24. World Health Organization (2010). Report Global Tuberculosis Control. *World Health Organization Library Cataloguing-in-Publication*, 218, 16. Retrieved from <https://reliefweb.int/report/world/who-report-2010-global-tuberculosis-control>.
 25. TIAN Yan-sheng, CUI Xing-kun, ZHANG Wei, MA Yan, DONG Sheng-feng, ZHAO Wen-yan ... LI Hong-guang (2013). Detection of *Mycobacterium tuberculosis* L-forms and MPB64 gene in breast cancer tissues. *J. of Practical Medicine*, 15, 2552-2555. Retrieved from http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-SYYZ201315053.htm.
- References**
1. Vlasenko, V. V. (1998). *Tuberkulez v fokuse problem sovremennosti [Tuberculosis in the focus of modern problems]*. Vinnica: Nauka.
 2. Lysenko, A. P., Vlasenko, V. V. & Broxmeyer, L. (2014). Fenomen izmenchivosti mikobakterij tuberkuleza i ego ispol'zovanie dlja obnaruzheniya tuberkuleznoj infekcii [The phenomenon of variability of mycobacterium tuberculosis and its use for the detection of tuberculosis infection]. *Tuberkulez - global'naja katastrofa chelovechestva, Materialy I Mezhdunarodnoj zaochnoj nauchno-prakticheskoy konferencii. - Tuberculosis is a global catastrophe of humanity, Materials of the I International Correspondence Scientific and Practical Conference*. Rostov-na-Donu.
 3. Lysenko, A. P., Vlasenko, V. V., Lemish, A. P., Novik, T. P., Mihalevich, E. A. & Vlasenko, I. G. (2014). Vyjavlenie mikobakterij tuberkuleza v tkanjah s pomoshch'ju differencirujushhej immunoperoxidaznoj okraski. [Detection of mycobacterium tuberculosis in tissues using differentiating immunoperoxidase staining]. *Tuberkulez i bolezni legkih. - Tuberculosis and lung disease*, (10), 55-58.
 4. Lysenko, A. P., Vlasenko, V. V., Krasnikova, E. L. & Broxmeyer, L. (2018). Mikobakterii obnaruzheny v kul'tural'noj zhidkosti pochki jembriona ovcy, inficirovannyh virusom bych'ego lejkoza. Jepizootologija, immunobiologija, farmakologija, sanitarija [Mycobacteria are found in the culture fluid of a sheep embryo kidney infected with bovine leukemia virus]. *Mezhdunarodnyj nauchno-prakticheskij zhurnal RUP "IJeV im. S.N.Vyshelesskogo" - Epizootology, immunobiology, pharmacology, sanitation. International Scientific and Practical Journal RUE "IEVS n. a. S. N. Vysheslesski"*, 1, 7-18.
 5. Alavi, H. A. & Moscovici, E. A. (1996). Immunolocalization of cell-wall-deficient forms of *Mycobacteria tuberculosis* complex in sarcoidosis in sinus histiocytosis of lymph nodes draining carcinoma. *Histol Histopathol.*, 11 (3), 683-694. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8839759>.
 6. Almenoff, P. L., Johnson, A., Lesser, M. & Mattman, L. H. (1996). Growth of acid fast L forms from the blood of patients with sarcoidosis. *Thorax*, 51, 530-533. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8711683>.
 7. Anestad, G. & Hoel, T. (2001). Atherosclerosis and tuberculosis: are they both chronic infectious diseases. *Scand J Infect. Dis.*, 33, 797. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11728058>.
 8. Beran, V., Havelkova, M., Kaustova, L., Dvorska, J. & Pavlik, I. (2006). Cell wall deficient forms of mycobacteria: a review. *Veterinarni Medicina*, 51 (7), 365-389. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=CZ2006000623>.
 9. Broxmeyer, L. (2004). Is mad cow disease caused by a bacteria. *Medical Hypothesis*, 63, 731-739. DOI: 10.1016/j.mehy.2004.04.013.
 10. Broxmeyer, L. (2005). Diabetes mellitus, tuberculosis and the mycobacteria: two millennia of enigma. *Medical Hypothesis*, 65 (3), 433-439. DOI:10.1016/j.mehy.2005.04.017.
 11. Broxmeyer, L. (2016). *Alzheimer's Disease - How Its Bacterial Cause Was Found and Then Discarded*. Create Space, USA. ISBN-10: 1491287357; ISBN-13: 978-1491287354.
 12. Gerston, K. F., Blumberg, L., Tshabalala, V. A. & Murray, J. (2004). Viability of myco-bacteria in formalin-fixed lungs. *Hum. pathol.*, 35, 571-575. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15138931>.
 13. Guliang, H. & Tefu, L. (1999). *Mycobacterium tuberculosis* L-forms. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 10, 129-133.
 14. Ghosh, J., Larsson, P., Singh, B., Pettersson, B. M. F., Islam, N. M., Sakhar, S. N. ... Kisebom, L. (2009). Sporulation in mycobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106 (26), 10781-10786. doi: 10.1073/pnas.0904104106.
 15. Huaman, M., Henson, D., Ticona, E., Sterling, T. R. & Garvy, B. A. (2015). Tuberculosis and cardiovascular disease: linking the epidemics. *Tropical Disease, Travel Medicine and Vaccines*, 1, 10. doi: 10.1186/s40794-015-0014-5.
 16. Mattman, L. (1993). *Cell Wall Deficient Forms: Stealth Pathogens*. Boca Raton: CRC Press. ISBN 9780849387678.
 17. Lysenko, A. P., Vlasenko, V. V., Broxmeyer, L., Lemis, A. P., Novik, T. P. & Pritychenko, A. N. (2014). The tuberculin skin test: how safe is safe? The tuberculin contains unknown forms capable of reverting to cell-wall-deficient mycobacteria. *Clinical and Experimental Medical Sciences*, 2 (2), 55-73. <http://dx.doi.org/10.12988/cems.2014.445>.
 18. Roels, S. & Walravens, C. (2003). *Mycobacterium bovis* meningitis in a cow with clinical signs of BSE. *Vet. Rec.*, 152 (26), 6807-6808. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12862170>.
 19. Scharzt, Ph. (1972). Amyloid degeneration and tuberculosis in the aged. *Gerontologia*, 8 (5-6), 321-362. <https://doi.org/10.1159/000211943>.
 20. Slavchev, G., Michailova, L. & Markova, N. (2013). Stress-induced L-forms of *M. bovis*: challenge to survivability. *New Microbiologica*, 36, 157-166. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23686122>.
 21. Song, L. Y., Yan, W. S. & Zhao, T. (2002). Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in lung cancer tissue by indirect in situ nested PCR. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 22, 992-993. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12433626>.
 22. Tian, Y., Hao, T., Cao, B., Zhanget, W., Ma, Y., Lin, Q. & Li, X. (2015). Clinical End-Points Associated with *Mycobacterium tuberculosis* and Lung Cancer: Implications into Host-Pathogen Interaction and Coevolution. *BioMed Research Intern.*, 1-9. doi: 10.1155/2015/827829.
 23. Tomiyama, T. & Satoshi, A. (1994). Rifampicin prevents the

- aggregation and neurotoxicity of amyloid B protein in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 204 (1), 76-83. DOI:10.1006/bbrc.1994.2428.
24. World Health Organization (2010). Report Global Tuberculosis Control. *World Health Organization Library Cataloguing-in-Publication*, 218, 16. Retrieved from <https://reliefweb.int/report/world/who-report-2010-global-tuberculosis-control>.
25. TIAN Yan-sheng, CUI Xing-kun, ZHANG Wei, MA Yan, DONG Sheng-feng, ZHAO Wen-yan ... LI Hong-guang (2013). Detection of Mycobacterium tuberculosis L-forms and MPB64 gene in breast cancer tissues. *J. of Practical Medicine*, 15, 2552-2555. Retrieved from http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-SYYZ201315053.htm.

МИКОБАКТЕРИИ ТУБЕРКУЛЕЗА С ДЕФЕКТНОЙ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКОЙ, ОБНАРУЖЕННЫЕ В МОЗГЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ ИЗ СПОНГИОЗНЫМИ ИЗМЕНЕНИЯМИ

Лысенко О.П., Власенко В.В., Палій Г.К., Власенко І.Г., Назарчук А.А.

Аннотация. Микобактерии туберкулеза обладают устойчивостью к неблагоприятным факторам и быстро формируют медикаментозную устойчивость. Цель - исследование связи туберкулезной инфекции и развития поражения мозга с признаками спонгiomорфных изменений. Исследовали консервированные 10% формалином фрагменты головного мозга 2 коз с признаками поражения центральной нервной системы при помощи гистологических, микробиологических методов. Для микробиологического исследования посев проб мозга проведен через 3, 5 лет на питательную среду MycCel DW содержащую стимулятор роста. Молекулярно-генетическое исследование проводили с помощью полимеразной цепной реакции на приборе Molecular Imager GelDoc TM XR+ (BioRad). Полипептидный профиль исследовали электрофоретически. У коз, павших с признаками поражения центральной нервной системы, в мозге обнаружены губкообразные изменения. В пробах мозга обнаружена ДНК и микобактерии туберкулеза с дефектной клеточной стенкой, в клетках мозга и в межклеточном пространстве отмечено накопление микобактериальных антигенов. Несмотря на то, что пробы мозга, находились в 10% формалине 1 месяц, 3 года и 5 лет, во всех случаях были выделены микобактерии туберкулеза с дефектной клеточной стенкой. Их жизнеспособность была сравнима с инфекционностью прионов. Изоляты микобактерий туберкулеза с дефектной клеточной стенкой из мозга не отличались по морфологии и полипептидным составом от изолятов из туберкулина, FLK - BLV, лимфатических узлов коров, больных туберкулезом. Это указывает на высокую вероятность того, что микобактериальная инфекция в зависимости от инфицирующей дозы, особенностей штамма и генома хозяина, а также состояния иммунной системы, может вызывать онкогенное действие, вызвать активный туберкулез, поражение мозга, сердечно-сосудистой системы.

Ключевые слова: туберкулезная инфекция, микобактерии, кислотоустойчивые палочки, изоляты мозга.

MYCOBACTERIUM OF TUBERCULOSIS WITH DEFECTIVE CELL WALL, DETERMINED IN THE BRAIN OF THE BIOLOGICAL MODEL WITH SPONGIONAL CHANGES

Lysenko O.P., Vlasenko V.V., Palii H.K., Vlasenko I.H., Nazarchuk O.A.

Annotation. Mycobacterium tuberculosis is endowed with resistance to adverse factors and rapidly forms drug resistance. The aim is to study of the connection of tuberculosis infection and the development of brain damage with signs of spongymorphic changes. There were investigated canned 10% formalin fragments of the brain of 2 goats with signs of central nervous system damage by histological, microbiological methods. For microbiological examination, 3-5 years brain samples after were sowed on the MycCel DW nutrient medium with a growth stimulator. The molecular genetic study was performed using a polymerase chain reaction on a Molecular Imager GelDoc TM XR + (BioRad) device. The polypeptide profile was studied electrophoretically. In the goats, who died with symptoms of central nervous system damage, spongiform changes were detected in the brain. In the brain samples, DNA and mycobacterium tuberculosis with a defective cell wall have been detected, accumulation of mycobacterial antigens has been observed in the cells of the brain and in the intercellular space. Despite the fact that brain samples were in 10% formalin for 1 month, 3 years and 5 years, in all cases mycobacterium tuberculosis with a defective cell wall was isolated. Their viability was comparable to the infectiousness of prions. The isolation of mycobacterium tuberculosis with a defective cell wall from the brain did not differ in morphology and polypeptide composition from isolates from tuberculin, FLK-BLV, lymph nodes of cows, patients with tuberculosis. This indicates a high probability that mycobacterial infection, depending on the infectious dose, the characteristics of the strain and host genome, as well as the state of the immune system, can cause oncogenic action, cause active tuberculosis, brain damage, and the cardiovascular system.

Key words: tuberculosis infection, mycobacterium, acid resistant sticks, brain isolates.