

DOI: 10.31393/reports-vnmedical-2020-24(1)-10

УДК: 619:616-078:637.12.05-619:616.5-002.525

ДОСЛІДЖЕННЯ ВЗАЄМОЗВ'ЯЗКУ ЛАТЕНТНОЇ ТУБЕРКУЛЬОЗНОЇ ІНФЕКЦІЇ З РОЗВИТКОМ МІЄЛОЇДНОГО ТА ЛІМФОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗУ

Лисенко А.П.¹, Власенко І.Г.², Власенко В.В.², Римша О.В.³, Назарчук О.А.³, Гончар О.О.³, Сорокоумова Л.К.³

¹РУП “Інститут експериментальної ветеринарії ім. С.Н. Вишелесського” (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: vlasenkoiv@gmail.com

Статтю отримано 25 листопада 2019 р.; прийнято до друку 27 грудня 2019 р.

Анотація. Взаємовідносини туберкульозної інфекції та гемобластозів вже давно привертати увагу медиків і були підставою для найрізноманітніших припущень. Ще в другій половині XIX століття висловлювали думки про єдину природу цих патологій. Але це пояснювалось імунохімічною спорідненістю специфічних пухлинних і мікобактеріальних антигенів, а не як результат персистенції мікобактерій туберкульозу (МБТ). Метою дослідження було вивчення зв'язку латентної туберкульозної інфекції та онкогенезу, зокрема з лейкозами. З перещеплюваних мієлобластів людини, хворої на гострий мієлоїдний лейкоз (Kasumi-1) та Т-лімфоцитів, хворого Т-лімфобластною лейкемією (Jurkat), в тому числі з 0,22 мкм фільтратів їх лізатів виділяли мікобактерії туберкульозу (МБТ) з дефектною клітинною стінкою (cell wall deficient - CWD). При первинній мікроскопії МБТ знаходили переважно у вигляді кокоїдів. Виділені кокоїди Kasumi та Jurkat мали близьку антигенну спорідненість та спільні антигени з типовими МБТ. Після тривалої інкубації зі стимулятором росту вдалося не тільки виділити CWD МБТ з усіх лізатів і фільтратів, але й отримати ізоляти з ідентичною морфологією та антигенним складом. Це переконливо свідчило про те, що МБТ і їх змінні форми могли бути пов'язані з різними видами лейкемій. Більш того, виявлена спорідненість ізолятів FLK-BLV з кров'ю людей з латентною туберкульозною інфекцією, з туберкульозом великої рогатої худоби, CWD формами *M. bovis* та *M. tuberculosis*, що підтверджує роль туберкульозної інфекції в розвитку різних форм захворювання залежно від геному господаря, а також від особливостей адаптаційних реакцій інфекційного агента. Зокрема, після руйнування ультразвуком і фільтрацією через Amicon Ultracel® 100 K і Millex® GP 0.22 мкм їх фільтрати давали зростання кількості CWD МБТ з кислотостійкими елементами і мали однаковий антигенний склад, в тому числі до вихідних ізолятів. Основну роль у виділенні CWD МБТ мала тривала інкубація досліджуваного матеріалу в стимуляторі росту та багаточисельні пересіви на адаптоване середовище MucSel DW.

Ключові слова: перещеплювальні культури клітин, інфекція, туберкульоз, онкогенез.

Вступ

У XX столітті з крові людей, хворих на лейкоз, були виділені частково кислотостійкі мікроорганізми, що фільтруються [1, 2, 4], які володіли антигенною спорідненістю з типовими мікобактеріями туберкульозу (МБТ) [8]. Це дозволило вважати їх змінними МБТ (cell wall deficient - CWD- або L-формами) [9, 15]. Подібні мікроорганізми виділяли з пухлин, у тому числі й у тварин. Їх здатність тривалий час персистувати в організмі лабораторних тварин і в ряді випадків індукувати утворення пухлин [6], дозволили зв'язати латентну туберкульозну інфекцію з онкогенезом. Однак ця теорія не мала широкого визнання і подальшого розвитку [5]. Лише в останні 10-15 років китайськими дослідниками на сучасному рівні був підтверджений зв'язок МБТ та L- (CWD) форм МБТ з онкогенезом [18, 20, 21, 22].

Досить випадково, в мазках з концентрованої культуральної рідини клітин нирки ембріона вівці, інфікованих вірусом бичачого лейкозу (Ag FLK-BLV), забарвлених за Цілем-Нільсеном, були виявлені кислотостійкі (КС) палички. При бактеріологічному дослідженні 14 серій FLK-BLV із застосуванням стимулятора росту [16] і поживного середовища для виділення атипичних мікобактерій, у всіх випадках були виділені CWD МБТ. Зараження морських

свинок ізолятом з Ag FLK-BLV викликало у них утворення відповідних антитіл. Встановлено появу подібних антитіл у свинки після введення гомогенатів органів тварин, заражених ізолятами Ag FLK-BLV [10]. Вченими доведено, що в клітинах FLK-BLV персистують фільтративні форми МБТ, які можуть реверсувати в CWD та КУ форми [11].

Мета - дослідження зв'язку латентної туберкульозної інфекції та онкогенезу, зокрема з лейкозами.

Матеріали та методи

У дослідженні використовували перещеплювальні культури клітин мієлобластів хворого гострим мієлоїдним лейкозом (Kasumi-1) та Т-лімфоцитів людини з Т-лімфобластною лейкемією (Jurkat), які вирощували на RPMI-1640 з додаванням 10 % ембріональної сироватки крові великої рогатої худоби.

Для виявлення МБТ і мікобактеріальних антигенів досліджували мазки диференціюючим імунопероксидазним методом афінноочищених антитіл до типових штамів *M. tuberculosis* і *M. bovis* (ДІП).

Виділені ізоляти руйнували ультразвуком, лізати культур фільтрували через Amicon Ultracel® 100 K та додатково ультрафільтрували пропускаючи через Millex® GP 0.22 мкм,

змішували зі стимулятором росту та інкубували на середовищі MucSel DW.

Кожні 2 дні інкубації проводили 2-3 "сліпих" пересіви. При появі видимих ознак росту готували мазки і виконували пересів. З бактеріальної маси виділяли ДНК, яку досліджували в ПЛР (праймери 16S RNA, MPB 70, MPB 64, IS 6110).

Загальна тривалість експерименту становила 8 місяців. Бактеріальну масу ізолятів відмивали і дезінтегрували ультразвуком, антигенний склад штамів досліджували в порівнянні з CWD МБТ типових штамів *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* Vallee, *M. bovis* 8 і виділених з різних джерел.

Для мікроскопії на предметні скельця наносили по 100 мкл суспензій клітин з 75 мкл 3 % H_2O_2 для інактивації ендогенної пероксидази (ЕП). Після висихання мазки фіксували (65°C) і фарбували диференціюючим імунопероксидазним методом (ДІП), що включав забарвлення за Kinyoun, інкубацію з кон'югатом пероксидази і афінноочищеними антитілами до *M. bovis* 8, обробку розчином 3,3'діамінобензидіна з H_2O_2 . Це забезпечувало фарбування кислотостійких (КС) клітин в червоний колір, не кислотостійких (НКС) CWD МБТ - в коричневий, а супутньої мікрофлори і тканин - в синій колір [12]. У ряді випадків для ДІП забарвлення застосовували кролячу антисыворотку до *M. tuberculosis* H37Rv, у співвідношенні (1:1) з лізованою кров'ю людини і кон'югат пероксидази - анти-IgG кролика (Sigma). Мікроскопію проводили на Olympus B51X, 10 x 100.

Культури клітин культивували на ростових середовищах з наступними заморожуваннями та розмороженням, частину клітинних лізатів фільтрували через Millex® GP 0,22 µm. Лізати клітин та їх фільтрати змішували в співвідношенні 1:2 зі стимулятором росту ВКГ (патент України №43467), витримували 48 год. при 37°C і по 0,3 мл вносили в пробірки з поживним середовищем MucSel DW [10, 11, 12]. Контролем служили посіви ембріональної сироватки та її фільтрату з стимулятором росту (1:2) на ідентичне поживне середовище.

Лізати клітин і їх фільтрати, змішані зі стимулятором росту, 8 місяців витримували при 37°C і пересівали на середовище MucSel DW. Для приготування лізатів бактеріальну масу змивали з поверхні середовища, відмивали 0,5 % розчином фенолу і дезінтегрували на Bandelin Sonopuls 2400 (3 цикли по 5 хв, 8х).

Реакцію імунодифузії (РІД) ставили за загальними рекомендаціями з діагностики та вакцинації наземних тварин (2009) [13] з використанням антисывороток тест-набору Iddex *M. bovis*: "A, B" антитіла до специфічних антигенів МБТ MPB 70 і MPB 83 до штамів CWD МБТ: "D" з крові людини хворого на саркому, з FLK-BLV с. 30 (ISAGVL 30), "Br 2" з мозку кози з губчатими змінами в головному мозку, з міжнародностандартизованим PPD туберкуліном *M. bovis* AN5, "C" з крові людини, хворої на туберкульоз, "D" з крові людини з латентною туберкульозною інфекцією, до типових штамів *M. tuberculosis* H37Rv і *M.*

bovis Vallee (п. 2.15 Наказу N 316 від 03.09.2009 "Інструкції щодо профілактики та боротьби з туберкульозом тварин", затвердженого Державним комітетом ветеринарної медицини України).

Переxресний імуоелектрофорез в проміжному гелі (ПІЕФ ПГ) і ракетний імуоелектрофорез (РІЕФ) проводили за методикою N. Axelsen, J. Kroll, B. Weeke [3].

При дослідженні антигенного складу в якості препаратів для порівняння використовували експериментально отримані CWD *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* 8, *M. bovis* tbc24 (з лімфатичного вузла корови з туберкульозними змінами), HeLa 3K / 0.22 (з культури клітин HeLa).

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). Ізоляти (0,2-0,5 мг / мл) прогрівали 5 хв. (95°C) в лізуючому буфері. ДНК виділяли на колонках з сорбітом (IBOX HANB). Ампліфікацію проводили на C1000TM ThermoCycler (Bio-Rad) з праймерами 16S RNA Mycobacteria, MPB 70, MPB 64 ("Праймтех"). Електрофорез ампліфікату проводили в 2 % агарозі, результати враховували на Molecular Imager GelDoc TM XR + (BioRad). ПЛР - real time поводи́ли з праймерами IS 6110 ("Праймтех").

Результати. Обговорення

На першому етапі досліджень з лізату клітин Kasumi і Jurkat, а також з фільтрату Kasumi 0,22µm в ПЛР були виявлені сліди ДНК мікобактерій, що підтверджувалося появою чітких ліній ампліфікату, одержуваних з праймерами 16sRNA, MPB 70, MPB 64. Це вказувало, що в клітинах Kasumi і Jurkat була присутня саме ДНК мікобактерій туберкульозу (МБТ). Позитивні результати ПЛР були отримані і після 8 місяців інкубації лізатів клітин зі стимулятором росту при культивуванні 37°C, додатково ДНК МБТ була виявлена у фільтраті 0,22 мкм лізата клітин Jurkat (табл. 1, рис. 1).

При ДІП забарвленні з антитілами до *M. bovis* та *M. tuberculosis* H37Rv клітини Kasumi та Jurkat зафарбовувались у коричневий колір, що вказувало на присутність у них антигенів МБТ (рис. 2).

У посівах лізатів клітин Kasumi і Jurkat через 1-2 дня з'явився склоподібний "наліт". У мазках виявлені ниткоподібні форми, протопласти, а також поодинокі паличкоподібні форми з типовою для CWD МБТ морфологією. У всіх випадках виявлені об'єкти реагували з антитілами до МБТ (рис. 3), що проявлялося появою коричневого забарвлення при ДІП.

Після 2 "сліпих" пересівань лізатів клітин Kasumi і Jurkat, а також 3 пересівань фільтрату 0,22 мкм Jurkat відмічали стрімкий ріст характерних для CWD МБТ полиморфних паличковидних форми бактерій. Посів ембріональної сироватки і її фільтрату і 8 "сліпих" пересівів не дали відповідного росту. Результати ПЛР підтвердили, що ізоляти з культур клітин Kasumi і Jurkat з урахуванням їх не кислотостійкості відносяться до CWD МБТ.

При дослідженні антигенного складу встановлено, що "Is Kasumi" і "Is Jurkat" аглютинувались антисыворотками до *M. tuberculosis* H37Rv і *M. bovis* Vallee, що вказувало

Таблиця 1. Результати дослідження культур клітин Kasumi-1 та Jurkat.

Препарат	ПЦР+	Результат I посіву, ПЛР+ з ДНК ізоляту. Назва ізоляту	ПЛР+ після 8 міс. інкубації в стимуляторі росту	Результат II посіву після 8 міс. інкубації в стимуляторі росту, ПЛР+ з ДНК ізолята Назва ізоляту
Kasumi лізат	MPB 64 IS 6110	Під час 2 "сліпого" пересіву виявляли тетракоки, що трансформувалися в кокоїди MPB70±, MPB 64 "Is Kasumi"	16sRNA MPB 64 IS 6110	Не досліджували
Kasumi лізат концентрованих клітин	16sRNA MPB 70 MPB 64	Не досліджували	Не досліджували	Не досліджували
Kasumi фільтрат 0,22 µm лізата	MPB 64	Негативний	MPB 64 IS 6110	Поліморфні паличкоподібні форми в вихідному посіві "Is Kasumi 0,22 II/1" (16s RNA MPB 70, IS6110) та в 2 "сліпому" пересіві "Is Kasumi 0,22 II/2" (IS6110, MPB 70±)
Jurkat лізат	MPB 64 IS 6110	В 2 "сліпому" пересіві поліморфні паличкоподібні форми, 16s RNA, MPB 70, MPB 64 "Is Jurkat 402"	MPB 64	Ріст в первинному посіві через 18 днів MPB 64 "Is Jurkat II"
Jurkat фільтрат 0,22 мкм лізату	Негативний	В 3 "сліпому" пересіві кокоїди часто в тетрадах, MPB 64+ "Is Jurkat 0,22"	MPB 64	Поліморфні паличководні форми (MPB 64, MPB 70) "Is Jurkat 0,22 II"
Ембріональна сироватка	Негативний	Негативний	Не досліджували	-
Фільтрат 0,22 мкм ембріональної сироватки	Негативний	Негативний	Не досліджували	-
M.bovis (K+)	16sRNA MPB 70 MPB 64	-	16sRNA MPB 70 MPB 64	-
K-	Негативний	-	Негативний	-

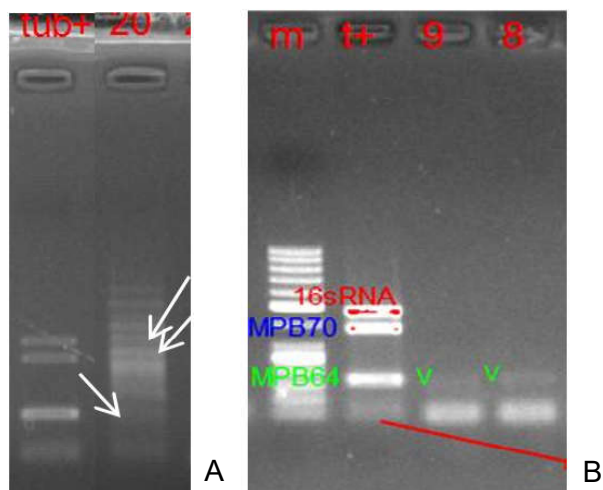


Рис. 1. ПЛР дослідження з лізату та фільтрату клітин Kasumi і Jurkat: лізат концентрованих клітин Kasumi (1А, 20); фільтрати 0,22 мкм лізатів Jurkat (1В 9) та Kasumi (1В 8), інкубованих 8 місяців при 37°C в стимуляторі росту; tub+ і t+ позитивний контроль (зверху до низу лінії 16s RNA, MPB70, MPB64), m - маркер м.м.

на наявність у них спільних антигенів з типовими МБТ (табл. 2).

В РІД штам "Is Jurkat" інтенсивно реагував з більшістю антисироваток до CWD МБТ, утворюючи ідентичні преципітати з штамми гомологічних антисироваток з ізолятів штаму туберкульозу великої рогатої худоби, разом з тим, цей штам практично не взаємодіяв з антисироватками до CWD МБП "С" з крові хворої на туберкульоз людини. Однак фільтрати культур "Is Kasumi" та "Is Jurkat 0,22" реагували в РІД з антисироватками до CWD МБП "С", утворюючи ідентичні преципітати, які вказували на їх імунохімічну спорідненість (рис. 4).

Лізати і фільтрати клітин Kasumi і Jurkat при 8 місячному культивуванні на середовищі MucSel DW з додаванням стимулятора росту давали ріст колоній, при мікроскопії яких виявляли розгалужені або зернисті ниткоподібні структури, іноді з КУ фрагментами. Пізніше в посівах реєстрували появу поліморфних паличкоподібних форм з типовою для CWD МБТ морфологією (рис. 6).

Ізоляти, виділені на II стадії дослідження мали дуже близький антигенний склад, який майже не відрізнявся від антигенного складу "Is Jurkat", отриманого на першому етапі. Певні відмінності стосувалися, в основному, концентрації однакових антигенів, що було помітно в ПІЕФ за висотою їх преципітатів (рис. 7).

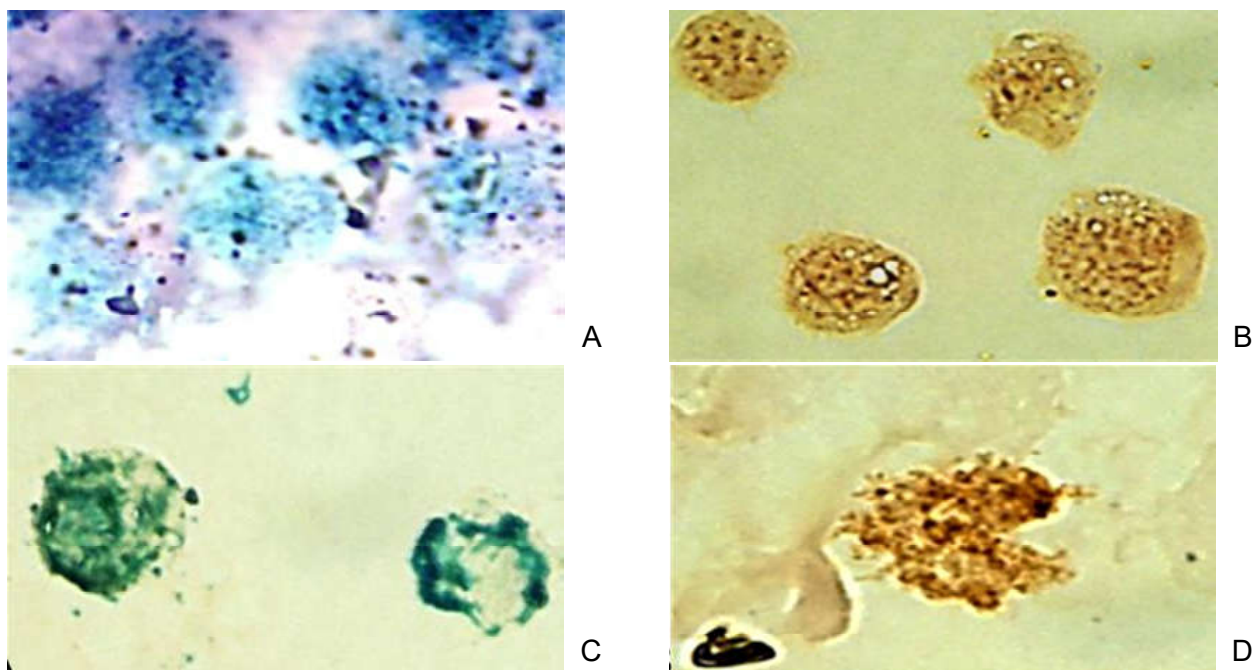


Рис. 2. ДІП забарвлення клітин Kasumi (А-В) Jurkat (С-Д); А, С Kasumi і Jurkat контроль (синє та зелене забарвлення клітин підтверджує інактивацію ендогенної пероксидази); В, D - ДІП забарвлення клітин Kasumi, Jurkat з Ig до *M. bovis* (поява коричневого забарвлення, вказує на наявність в клітинах антигенів МБТ) x1000.

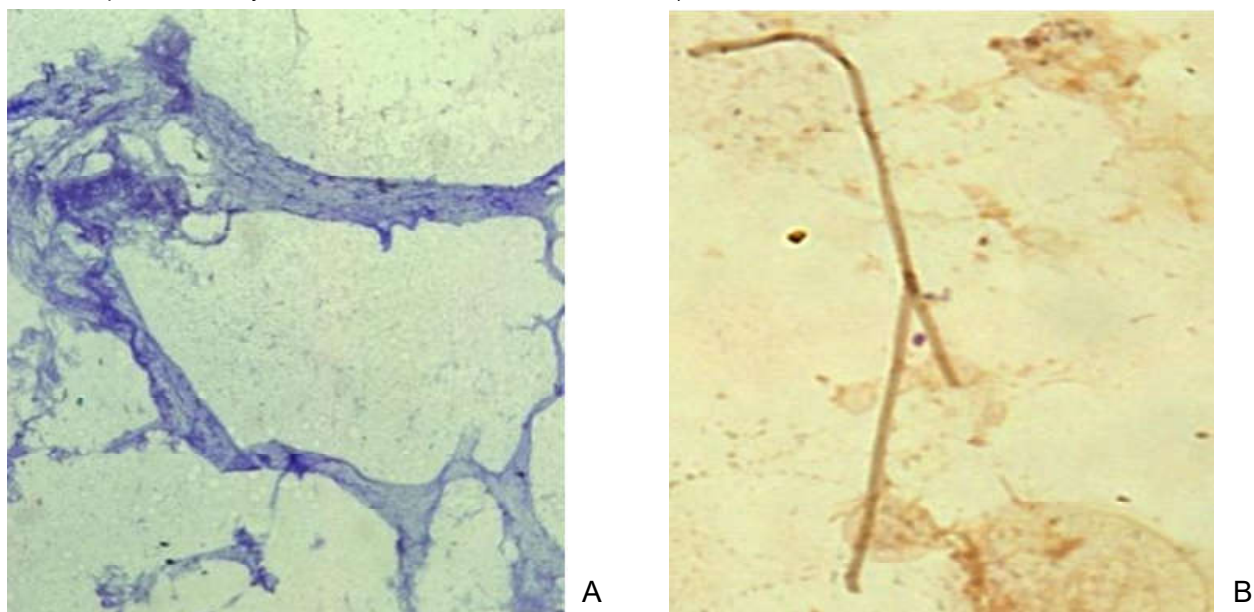











Рис. 3. Мазки лізатів клітин Kasumi та Jurkat, (А - 1 день, В - 2 день культивування). ДІП забарвлення, 10 x 10.

В РІД імунодомінантні антигени "Is Kasumi" та "Is Jurkat" демонстрували імунохімічну ідентичність, в тому числі і до ізолятів FLK-BLV I.27 та ізолятів з лімфатичного вузла з туберкульозними змінами (рис. 8).

Для підтвердження високих адаптаційних властивостей МБТ та їх CWD форм досліджували здатність ізолятів з лейкозних клітин відновлювати життєздатність після дезінтеграції і фільтрації через фільтри та ультрафільтри [10, 11, 12]. Для цього клітини "Is Kasumi II 0.22 / 2" і "Is

Jurkat II 0.22" в 0,5% розчині фенолу з 0,1 % азиду натрію (pH 7,4) руйнували ультразвуком на Bandelin Sonopuls 2400 (3 цикли по 5 хв., 8х). Незруйновані клітини відділяли центрифугуванням (6000g). Ізоляти фільтрували через Amicon Ul-tracel® 100 K, ультрафільтрат пропускали через Millex® GP 0.22 мкм, додавали стимулятор росту (1:3), 48 год. інкубували при 37°C і висівали на середовище МусСел DW. У процесі культивування зроблено 3 "сліпих" пересіви. Зростання в посіві штамів "Is Jurkat II

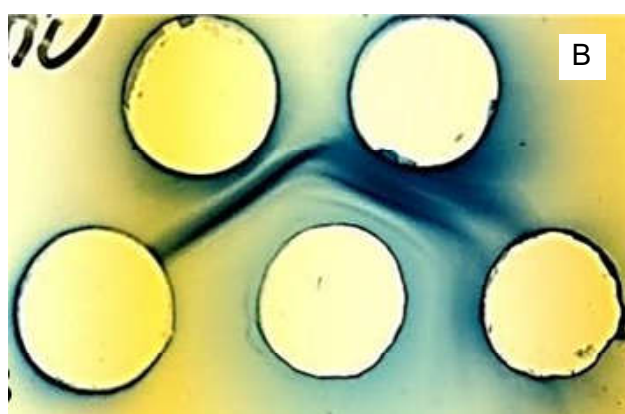
Таблиця 2. Аглютинація ізолятів Kasumi та Jurkat антисироватками до типових CWD МБТ.

Ізоляти	Контроль	Антисироватки	
		<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	<i>M. bovis</i> Vallee
"Is Kasumi"			
"Is Jurkat"			
"Is Jurkat, 22"			

МБТ не пов'язані з етіологією лейкемії. Досить давно антигени *M. bovis* були виявлені в клітинах пухлин. Але це пояснювалося імунохімічною спорідненістю специфічних пухлинних і мікобактеріальних антигенів, а не як результат персистенції МБТ. Виявлення в лейкозних клітинах ДНК МБТ і CWD МБТ довело зв'язок туберкульозної інфекції та лейкемії [7, 19].

МБТ або їх змінні форми знаходилися переважно у вигляді кокоідів, так як при мікроскопії не виявлено явних бактеріальних форм, а CWD виділяли не тільки з лізатів клітин, але і з їх фільтратів 0.22 мкм. Виділені кокоїди Kasumi та Jurkat мали близьку антигенну спорідненість та спільні антигени з типовими МБТ, але вони істотно відрізнялись від антигенного складу "Is Jurkat" та CWD МБТ.

Після тривалої інкубації зі стимулятором росту вдалося не тільки виділити CWD МБТ з усіх лізатів і фільтратів, але й отримати ізоляти з дуже близькою морфологією та антигенним складом. Більш того, виявлена спорідненість ізолятів FLK- BLV з кров'ю людей з латентною туберкульозною інфекцією, з туберкульозом великої рогатої худоби, CWD формами *M. bovis* та *M. tuberculosis*, що підтвер-

**Рис. 4.** РІД (в центрі антисироватка до CWD МБТ "С"; в периферійних лунках штами "Is Kasumi", "Is Jurkat 0,22", з FLK-BLV (A) та CWD МБТ з еталону ППД (B) *M. bovis* AN5.

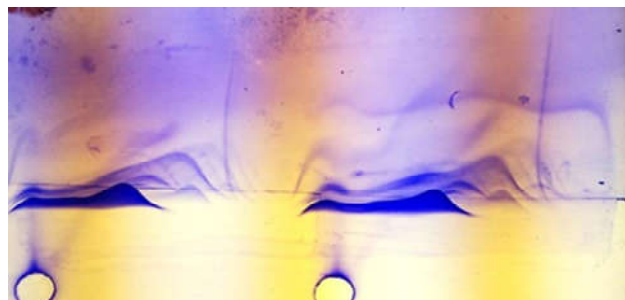
0.22" з'явився в 2 пересіви через 14 днів ("Is Is Jurkat II 0.22 100kDa + 0.22"), "Is Kasumi II 0.22 / 2", через 16 днів ("Is Kasumi II 0.22 / 2 100kDa + 0.22"). У мазках обох ізолятів виявляли характерні для CWD МБТ поліморфні паличкоподібні форми з КС фрагменти (рис. 9).

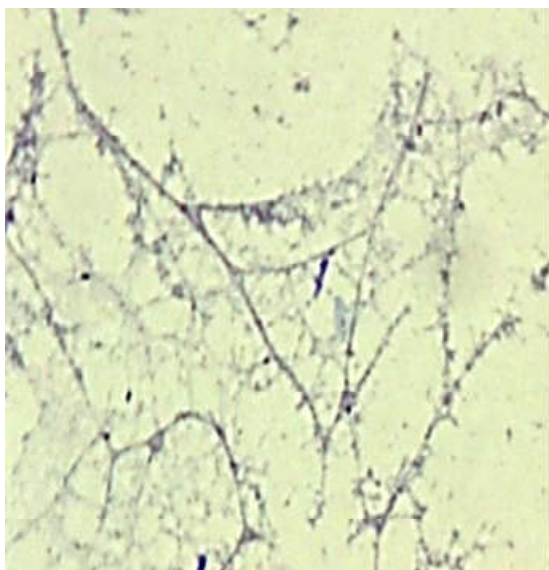
Крім того, в РІД підтверджено антигенну спорідненість штамів "Is Kasumi II 0.22/1" "Is Kasumi II 0.22 / 2 100kDa + 0.22", "Is Jurkat II 0.22 100kDa + 0.22" з антисироваткою до CWD *M. bovis* 8 та CWD *M. tuberculosis* H37Rv. З іншими досліджуваними ізолятами також проявляли імунохімічну ідентичність, але через різницю в концентрації індивідуальних антигенів не завжди вдавалося отримати чітку картину.

Клітини тканин людини і тварин, хворих на лейкоз, можуть містити мікобактеріальні антигени і ДНК, через вакцинацію БЦЖ, активну або латентну туберкульозну інфекцію [14]. Але малоймовірно, що персистенція МБТ може десятиліттями тривати в лімфоцитах *in vitro*, якщо

джує роль туберкульозної інфекції в розвитку різних за проявом форм захворювань залежно від властивостей генома господаря, а також від особливостей адаптивних реакцій інфекційного агента [1, 2, 6].

Існування форм МБТ, що фільтруються доведено в серії дослідів методом ультрафільтрації Amicon Ultracel® 100

**Рис 5.** ПІЕФ ПГ штамів CWD МБТ "С" в гелі (по 60 мкл) зі штамми "Is Kasumi" та "Is Jurkat 0,22" (41 мкл/см³ агарози).



A



B

Рис. 6. Мазки фільтрату 0,22 мкм Kasumi (A) та лізату Jurkat II (B) після 8 місячної інкубації в стимуляторі росту. Збільшення x1000.

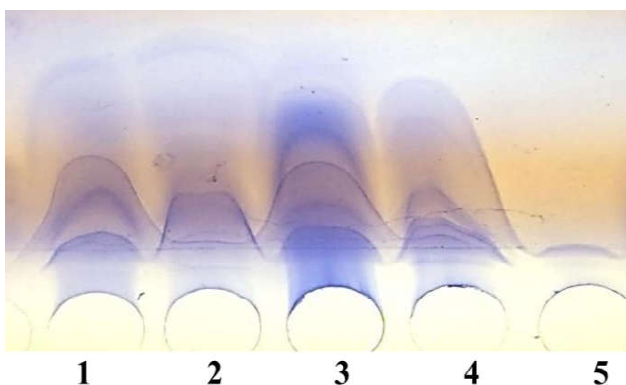


Рис. 7. ПІЕФ штамів (по 100 мкл): 1 - "Is Jurkat 402", 2 - "Is Jurkat II 0.22", 3 - Is Kasu-mi II 0.22/1, 4 - Is Kasumi II 0.22/2, 5 - Is Kasumi; антисироватка до ізоляту FLK-BLV HC фільтр (40 мкл/см³ агарози), 3 вт/см, 12 г.

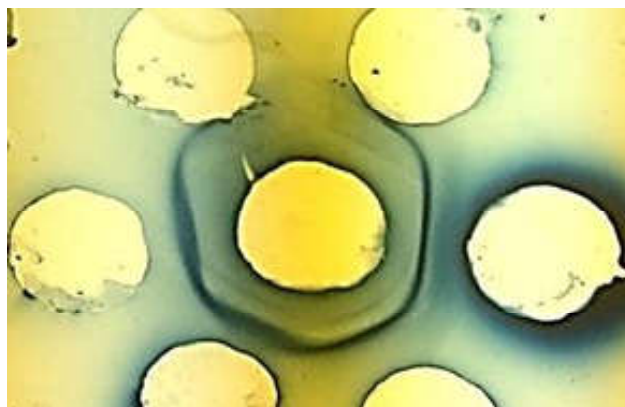
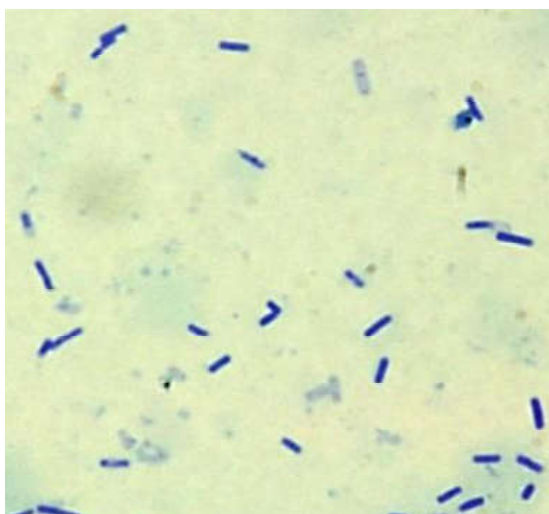
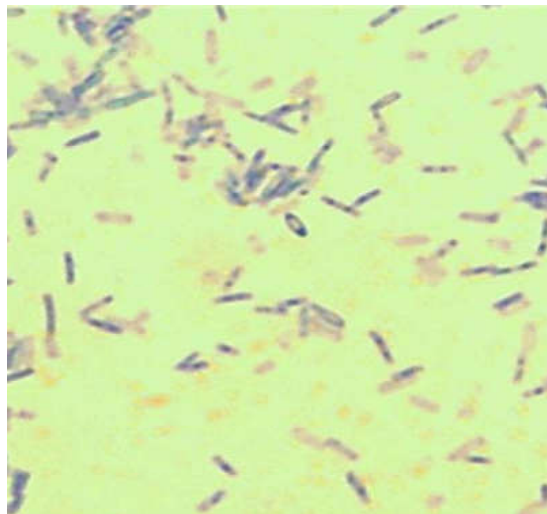


Рис. 8. РІД: у центрі антисироватка до CWD МБТ HC фільтр, в периферійних лунках штами: CWD МБТ из FLK-BLV I.27, "Is Jurkat II", "Is Jurkat II 0,22", "Is Jurkat", "Is Kasumi II 0.22/2", CWD МБТ з лімфатичного вузла з туберкульозними змінами.



A



B

Рис. 9. Первинний ріст штамів "Is Jurkat II 0.22 100 kDa + 0,22" (A) та частково кислотостійкі клітини, їх фрагменти в пересівах "Is Jurkat II 0.22 100 kDa+0,22" (B). Збільшення x100.

К та послідовними реінокуляціями на середовищі МусСел DW. Ультрафільтрати штамів "Is Kasumi II 0.22/2" та "Is Jurkat II 0.22" дали ріст CWD МБТ з КС властивостями, що мали майже ідентичний антигенний склад.

Отримані результати показали, що фільтративні форми МБТ за розміром були меншими від антитіл. Це підтверджують результати ряду дослідників, які встановили, що фільтративні форми МБТ проходили через колоїдні фільтри, що не пропускали правцевий (150 kDa) та дифтерійний токсини (62 kDa), але затримувалися фільтром 397 Da (фільтруюча здатність азотнокислого стрихніну) [17]. Поясненням цьому може бути унікальна пластичність захисних форм МБТ.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Використання стимулятора росту ВКГ та поживно-

го середовища МусСел DW дозволяє проводити ефективне виділення з клітинних культур, в т.ч. з лейкозних клітин, ізолятів МБТ, які можуть бути ідентифіковані як CWD.

2. Захисні форми МБТ, що фільтруються ультрафільтрами, несуть тільки фрагменти геному. Для відтворення повноцінних клітин необхідно їх злиття з утворенням протопластів та ниткоподібних структур, що є попередниками CWD форм, виявлених при "сліпих" пересівах.

У подальшому, перспективним слід вважати вивчення геному та порівняння CWD МБТ з інших джерел, визначення виду мікобактерій, від якого походять ізоляти лейкозних клітин, визначення чітких параметрів диференціації CWD форм *M. tuberculosis* та *M. bovis*; дослідження ймовірності розвитку туберкульозної інфекції, пов'язаної з неопластичним процесом.

Список посилань - References

- Alavi, H. A., & Moscovici, E. A. (1996). Immunolocalization of cell-wall-deficient forms of *Mycobacterium 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>.
- 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>.
- Axelsen, N., Kroll, J., & Weeke, B. A. (Ed.). (1977). *A manual of quantitative immunoelectrophoresis*. Oslo: Universitetsforlaget.
- 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>.
- Broxmeyer, L. (2017). Cancer and the Science of Denial. *Journal of Tumor Medicine and Prevention*, 1 (3), 555-563. DOI:10.5281/zenodo.887355.
- Diller, I. (1970). Experiments with mammalian tumor isolates. *Ann. NY Acad. Sci.*, 174, 655-674.
- Garnier, Th., Eiglmeyer, K., Camus, J.-Ch., N. Medina, Mansoor, H., Pryor, M., ... Hewinson, R. G. (2003). The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100 (13), 7877-7882. doi: 10.1073/pnas.1130426100.
- Gulian, H., & Tefu, L. (1999). *Mycobacterium tuberculosis* L-forms. Microbial Ecology in Health and Disease, 10, 129-133.
- Livingston, V., & Allen, R. (1948). Presence of consistently recurring invasive mycobacterial forms in tumor cells. *Microscop. Soc. Bull.*, 2, 5-18.
- Lysenko, A., L. Broxmeyer, V., Vlasenko, V. V., Krasochko, P. A., Lemish, A. P. & Krasnikova, E. A. (2016). Further evidence for Cancer as Cell-wall-deficient Mycobacterial Disease. *Journal of Molecular Pathological Epidemiology*, 1 (1), 1-12. Retrieved from <https://molecular-pathological-epidemiology.imedpub.com/further-evidence-for-cancer-as-a-cellwalldeficientmycobacterial-disease.php?aid=17755>.
- Lysenko, A., Vlasenko, V., Broxmeyer, L., Lemish, 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. *Clin. Exp. Med. Sci.*, 2, 55-73. <http://dx.doi.org/10.12988/cems.2014.445>.
- Lysenko, A. P., Broxmeyer, L., Vlasenko, V. V., Krasochko, P. A., Lemish, A. P., & Krasnikova, E. L. (2017). CWD Tuberculosis Found in Spongiform Disease Formerly Attributed to Prions: Its Implication towards Mad Cow Disease, Scrapie and Alzheimer's. *Journal of MPE Molecular Pathological Epidemiology*, 3(3), 1-13. Retrieved from <https://molecular-pathological-epidemiology.imedpub.com/cwd-tuberculosis-found-in-spongiform-disease-formerly-attributed-to-prions-its-implication-towards-mad-cow-diseasescrapie-and-alzhei.php?aid=19116>.
- Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. (8th ed., v. 1). World Organisation for Animal Health. (2018). ISBN 978-92-95108-18-9.
- Markova, N., Slavchev, G., & Michailova, L. (2012). Filterable forms and L-forms of *Mycobacterium bovis* BCG: impact for live vaccine features. *Hum. Vaccin Immunother.*, 8 (6), 759-64. doi: 10.4161/hv.19698.
- Mattman, L. (1993). *Cell Wall Deficient Forms: Stealth Pathogens*. Boca Raton: CRC Press. ISBN 9780849387678.
- Mukamolova, G., Turapov, O., Young, D., Kaprelyants, A. S., Kell, D. B., & Young, M. (2002). A family of autocrine growth factors in *M. tuberculosis*. *Mol. Microbiol.*, 46 (3), 623-35. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.03184.x.
- Sanarelli, G., & Alessandrini, A. (1930). Demonstration in vivo et in vitro des formes filtrantes du virus tuberculeux. *C. rend. Soc. Biol.*, 104, 1241.
- Sheng, T., Kun, C., Tong, H., Guang, L., & Wei, Z. (2009). Study on the relation-ship between *Mycobacterium tuberculosis* L infection and lung cancer. *Tumor*, 29, 1085-1089. DOI: 10.3781/j.issn.1000-7431.2009.11.015.
- 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>.
- Tian, Y., Hao, T., Cao, B., Zhang, W., Ma, Y., Qiang, Lin, & Xiaomin, Li. (2015). Clinical End-Points Associated with *Mycobacterium tuberculosis* and Lung Cancer: Implications into Host-Pathogen Interaction and Coevolution. *BioMed. Research International*, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2015/827829>.
- Tian, Y. S., Cui, X. K., Zhang, W., Ma, Y., Dong, S. F., Zhao, W. Y., & Li, H. G. (2013). Detection of *Mycobacterium tuberculosis* L-forms and MPB64 gene in breast cancer tissues. *Journal of Practical Medicine*, 15, 2552-2555. Retrieved from <http://>

en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-SYYZ201315053.htm.
22. Zhang, S., Guangling, Z., & Yan-sheng, T. (2009). Detection of

Mycobacterium tuber-culosis L forms infection in tissues of lung carcinoma. *Chin. J. Public. Health*, 25, 1317-1318.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ ЛАТЕНТНОЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ С РАЗВИТИЕМ МИЕЛОИДНОГО И ЛИМФОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА

Лысенко О.П., Власенко І.Г., Власенко В.В., Рымша Е.В., Назарчук А.А., Гончар О.О., Сорокоумова Л.К.

Аннотация. Взаимоотношения туберкулезной инфекции и гемобластозов уже давно привлекало внимание медиков и стало основанием для разных предположений. Еще во второй половине XIX века высказывали мнение о единой природе этих патологий. Но это объяснялось иммунохимическим сродством специфических опухолевых и микобактериальных антигенов, а не результатом персистенции микобактерий туберкулеза (МБТ). Целью исследования было изучение связи латентной туберкулезной инфекции и онкогенеза, в частности с лейкозами. С перевиваемых миелобластов человека, больного острым миелоидным лейкозом (Kasumi-1) и Т-лимфоцитов, больного Т-лимфобластным лейкозом (Jurkat), в том числе с 0,22 мкм фильтрата их лизатов выделяли микобактерии туберкулеза (МБТ) с дефектной клеточной стенкой (cell wall deficient - CWD). При первичной микроскопии МБТ находили преимущественно в виде кокцидов. Выделенные кокциды Kasumi и Jurkat имели близкое антигенное родство и общие антигены с типичными МБТ. После длительной инкубации со стимулятором роста удалось выделить CWD МБТ из всех лизатов и фильтрата и получить изоляты с идентичной морфологией и антигенным составом. Это убедительно свидетельствовало о возможной взаимосвязи МБТ и их измененных форм с различными видами лейкемии. Более того, обнаружено родство изолятов FLK-BLV с кровью людей с латентной туберкулезной инфекцией, с туберкулезом крупного рогатого скота, CWD формами *M. bovis* и *M. tuberculosis*, что подтверждает роль туберкулезной инфекции в развитии различных форм заболевания в зависимости от генома хозяина, а также от особенностей адаптационных реакций инфекционного агента. В частности, после разрушения ультразвуком и фильтрацией через Amicon Ultracel® 100 K и Millex® GP 0.22 мкм их фильтраты давали увеличение количества CWD МБТ с кислотоустойчивыми элементами и имели одинаковый антигенный состав, в том числе в исходных изолятах. Основную роль в выделении CWD МБТ имела продолжительная инкубация исследуемого материала в стимуляторе роста и многочисленные пересевы на адаптированную среду MycCel DW.

Ключевые слова: перевиваемые культуры клеток, инфекция, туберкулез, онкогенез.

INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP OF LATENT TUBERCULOSIS INFECTION WITH THE DEVELOPMENT OF MYELOID AND LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA

Lysenko O.P., Vlasenko I.H., Vlasenko V.V., Rymsha O.V., Nazarchuk O.A., Honchar O.O., Sorokoumova L.V.

Annotation. The relationship between tuberculosis infection and hemoblastosis has attracted the attention of physicians and has been the basis for a wide variety of assumptions. In the second half of the XIX century, there was expressed an opinion about the unique nature of these pathologies. They explained this phenomenon as the immunochemical affinity of specific tumor and mycobacterial antigens, but not as a result of the persistence of mycobacterium tuberculosis (MBT). The aim of the study was to investigate the association of latent tuberculosis infection and oncogenesis, in particular with leukemias. From transplantable human myeloblasts with acute myeloid leukemia (Kasumi-1) and T-lymphocytes with T-lymphoblastic leukemia (Jurkat), including 0.22 μm filtrate of their lysates were isolated from mycobacterium tuberculosis (MBT) with deficient cell wall (CWD). During primary microscopy, the MBT was found mainly in the form of coccoid. The isolated coccoid Kasumi and Jurkat had close antigen affinity and shared antigens with typical MBT. After prolonged incubation with the growth promoter, not only CWD MBT was isolated from all lysates and filtrates, but isolates with identical morphology and antigenic composition were obtained. This strongly suggested that the MBT and their modified forms could be associated with various types of leukemia. Moreover, the affinity of FLK-BLV isolates with blood of people with latent tuberculosis infection, cattle tuberculosis, CWD forms *M. bovis* and *M. tuberculosis* was determined, confirming the role of tuberculosis infection in the development of various forms of the disease depending on the host genome, as well as the features of the adaptive reactions of the infectious agent. In particular, after destruction by ultrasound and filtration through Amicon Ultracel® 100 K and Millex® GP 0.22 μm, their filtrates gave an increase in the number of CWD MBT with acid-resistant elements and had the same antigenic composition, including the original isolates. The long-term incubation of the test material in the growth promoter and numerous transplants on the adapted MyCel DW medium played a major role in the allocation of CWD.

Keywords: cell grafting cultures, infection, tuberculosis, oncogenesis.