

ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

На правах рукопису

Чеснокова Марина Михайлівна

УДК: 616.24-002.5-092-056.7

ГЕНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ СИСТЕМИ «ХАЗЯЇН-ПАТОГЕН» В ПАТОГЕНЕЗІ
ТУБЕРКУЛЬОЗНОГО ПРОЦЕСУ
14.03.04 – патологічна фізіологія

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук

Науковий керівник
Бажора Юрій Іванович
доктор медичних наук, професор

Одеса – 2012

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ.....	4
ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1 Патогенетичні особливості туберкульозу, обумовлені генетичними факторами людини та <i>M.tuberculosis</i> (огляд літератури)	14
1.1. Патогенез туберкульозу та генетика хазяїна	16
1.2 Вплив поліморфізму генів глутатіонтрансфераз на стан дихальної системи	19
1.3 Характеристика <i>M.tuberculosis</i> родини Beijing.....	24
1.4 Можливості методу лазерної кореляційної спектроскопії в дослідженні патології людини	30
РОЗДІЛ 2 Матеріали та методи досліджень.....	32
2.1 Характеристика групи осіб, залучених у дослідження.....	32
2.2 Молекулярно-генетичні методи дослідження.....	35
2.3. Біофізичні методи дослідження	38
2.4 Статистичні методи дослідження.....	40
РОЗДІЛ 3 <i>M.tuberculosis</i> родини Beijing та патогенетичні особливості перебігу туберкульозу легень	42
3.1 Характеристика туберкульозного процесу у хворих, від яких отримані ізоляти <i>M.tuberculosis</i> генетичної родини Beijing	44
3.2 Результати лікування хворих на вперше діагностований туберкульоз легень в залежності від генотипу виділених від них <i>M.tuberculosis</i>	58
3.3. Результати лікування хворих, що неефективно лікувались раніше, в залежності від генотипу виділених від них <i>M.tuberculosis</i>	66
3.4. Результати лікування хворих на ВДТБ легень в залежності від профілю медикаментозної резистентності	74
РОЗДІЛ 4 Патогенетичні особливості туберкульозу легень в залежності від поліморфізму за генами <i>GSTT1</i> та <i>GSTM1</i>	87
4.1 Характеристика груп хворих в залежності від поліморфізму ферментів	

глутатіон-S-трансфераз M1 та T1	90
4.2 Вплив поліморфізму <i>GSTT1</i> та <i>GSTTM1</i> на перебіг та результат вперше діагностованого туберкульозу легень	96
РОЗДІЛ 5 Стан місцевого та системного гомеостазу хворих на легеневий туберкульоз за даними лазерної кореляційної спектроскопії	104
5.1. Стан гомеостазу дихальних шляхів у хворих на вперше діагностований туберкульоз (ВДТБ) легенів за даними ЛКС	104
5.2. Стан гомеостазу дихальних шляхів в залежності від деяких особливостей генотипу хазяїна та патогену.....	111
5.3. Стан гомеостазу плазми крові хворих на вперше діагностований туберкульоз (ВДТБ) легенів за даними ЛКС	114
5.4 Стан гомеостазу сечі хворих на вперше діагностований туберкульоз (ВДТБ) легенів за даними ЛКС	121
РОЗДІЛ 6 Аналіз та узагальнення отриманих результатів.....	126
ВИСНОВКИ.....	135
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	137

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ,
СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

E - етамбутол

H - ізоніазид

IFN- γ – інтерферон гамма

IL – інтерлейкін

iNOS – індуцибельна ізоформа NO синтетази

GSTT1 – глутатіон-S-трансфераза T1

GSTM1 – глутатіон-S-трансфераза M1

MHC – головний комплекс гістосумісності

OR – відношення шансів (odds ratio)

R - рифампіцин

RR - відносний ризик (rates ratio)

S - стрептоміцин

SNP - однонуклеотидний поліморфізм

Th 1 – T-хелпери I типу

TLR- Toll-рецептори

TNF- α – фактор некрозу пухлин-альфа

Z - піразинамід

АФК – активні форми кисню

ВДТБ – вперше діагностований туберкульоз

ГПІ - гематологічний показник інтоксикації

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ДТЛ - дисемінований туберкульоз легень

ІР - індекс імунної реактивності

КВВП – конденсат вологи видихуваного повітря

ЛІ - лейкоцитарний індекс

ЛІІ - лейкоцитарний індекс інтоксикації

ЛКС – лазерна кореляційна спектроскопія

МБТ – мікобактерії туберкульозу

мРНК – матрична рибонуклеїнова кислота

ООПТД - Одеський обласний протитуберкульозний диспансер

ООКПТЛ - Одеська обласна клінічна протитуберкульозна лікарня

ПДРФ – поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

ПОЛ – перекисне окиснення ліпідів

РТБ – рецидив туберкульозу

ХОБ – хронічна обструкція дихальних шляхів

ХОЗЛ – хронічне обструктивне захворювання легенів

ХТБ – хронічний туберкульоз

ШОЕ – швидкість осідання еритроцитів

ВСТУП

Туберкульоз залишається складною медико-біологічною і соціально-економічною проблемою як міжнародного, так і національного значення. Незважаючи на тенденцію до зниження захворюваності на туберкульоз в Україні за останні роки, в 2010 р. захворюваність становила 68,4 на 100 тис. населення. Найбільші показники захворюваності всіма формами туберкульозу відмічаються у південно-східному регіоні, в тому числі і в Одеській області, що потребує розробки методів удосконалення лікування та профілактики захворювання.

Актуальність теми: Патогенетичні особливості туберкульозного процесу. Впровадження молекулярно-генетичних методів показало, що штами *M.tuberculosis*, є генетично неоднорідними. Збудники, що належать до різних генетичних родин, відрізняються експресією Т-клітинних антигенів, генів анаеробного дихання та ліпідного метаболізму й інших білків, що визначають особливості імунної відповіді та можливість виживання мікобактерії всередині гранульоми. Проте питання кореляції між генотипом штаму та особливостями патогенезу, клінічними проявами, прогнозом та епідеміологічними характеристиками захворювання залишається новим та мало вивченим аспектом науки. В дослідженнях, проведених на лабораторних мишах та макрофагах *in vitro* показана підвищена вірулентність і трансмісивність *M.tuberculosis* філогенетичної родини Beijing, проте визначення особливостей патогенезу легеневого туберкульозу у хворих, інфікованих збудниками цієї родини, представлені поодинокими дослідженнями, результати яких виглядають суперечливо. В Україні вивчення молекулярної епідеміології туберкульозу регіонах лише починається, а питання асоціації між певними генетичними родинами *M.tuberculosis* та патогенезом захворювання раніше не вивчалось.

Складний патогенез, а також варіабельність клінічних проявів туберкульозу дає можливість припустити, вплив багатьох генів-кандидатів в розвитку туберкульозу, при цьому вклад кожного з них в розвиток захворювання варіює. Вивчення

поліморфізму відомих генів схильності, а також пошук нових генів, білкові продукти яких приймають участь в патогенетичних механізмах захворювання, є однією з найважливіших задач при дослідженні туберкульозу. Одним з потенційних генів-модифікаторів для туберкульозної інфекції є гени метаболізму ксенобіотиків, зокрема глутатіон-S-трансфераз T1 (*GSTT1*) та M1 (*GSTM1*), які каталізують детоксикацію значного кола сполук, інтермедіатів запальних процесів та відіграють найважливішу роль у забезпеченні резистентності клітин до перекісного окиснення ліпідів. На теперішній час існує багато даних, які свідчать про участь вільно радикальних процесів в патогенезі ряду бактеріальних інфекцій, у тому разі при туберкульозі. Згідно літературним даним, проведені у хворих на туберкульоз дослідження поліморфізму генів *GSTT1* та *GSTM1* присвячені, в першу чергу, питанням гепатотоксичності, в той час як патогенетичні особливості легеневого туберкульозу майже не вивчались. Визначення асоціації між особливостями патогенетичних процесів при туберкульозній інфекції та певними генотипами хазяїна та патогена надає можливість прогнозування перебігу туберкульозної інфекції, визначення груп ризику та оптимізації лікування захворювання.

На фенотипному рівні стан інтегрального гомеостазу в тканинах дихальної системи під час туберкульозного процесу може бути оцінений за допомогою методу лазерної кореляційної спектроскопії (ЛКС). ЛКС дозволяє аналізувати полідисперсні гетерогенні системи, у тому числі таких складні, як конденсат вологи видихуваного повітря (КВВП), що має особливе значення для захворювань бронхо-легеневої системи. Дослідженні зразків конденсату вологи видихуваного повітря у хворих на туберкульоз легень раніше не проводилось. Визначення особливостей ЛК спектрів КВВП надає можливість оцінки стану місцевого гомеостазу при туберкульозі та комплексу фенотипних проявів особливостей системи „паразит-хазяїн” для моніторингу ефективності терапії та прогнозування результату захворювання.

Таким чином, визначення патогенетичних особливостей легеневого туберкульозу, обумовленого генетичними факторами паразита та хазяїна є

актуальною та до кінця не вирішеною проблемою, а роботи в цьому напрямку дозволять вдосконалити лікування хворих на легеневий туберкульоз.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є фрагментом комплексних науково-дослідницьких робіт, які виконувались в рамках МОЗ України кафедрами Одеського національного медичного університету (ОНМедУ) за темами „Імуногенетичні, епідеміологічні, фармакогенетичні та клініко-мікробіологічні аспекти взаємовідносин у системі „паразит-хазяїн” при туберкульозній інфекції в умовах зростання захворюваності на туберкульоз” (№ держреєстрації 0104U010501) та НДР «Значення поліморфізму деяких генів схильності до захворювання на туберкульоз в перебігу хвороби та ефективності її лікування» (№ держреєстрації 0110U006662) Дисертант є відповідальним виконавцем обох тем.

Мета та завдання дослідження. Метою роботи є з'ясування впливу генетично обумовлених особливостей збудника туберкульозу, організму хазяїна на патогенез туберкульозу легенів та оцінка можливості прогнозування тяжкості перебігу і кінцевого результату даного захворювання.

Для досягнення мети були поставлені такі завдання

1. Встановити патогенетичні особливості перебігу туберкульозного процесу в групах хворих, інфікованих *M.tuberculosis* генетичної родини Beijing
2. Визначити частоти null-генотипів генів глутатіонтрансфераз *GSTT1* та *GSTM1* у хворих на легеневий туберкульоз. Проаналізувати асоціацію між поліморфізмом організму хазяїна за цими генами та особливостями перебігу туберкульозного процесу
3. Проаналізувати тяжкість перебігу туберкульозного процесу в групах хворих, що відрізняються за поліморфізмом генів глутатіонтрансфераз *GSTT1* та *GSTM1*, в залежності від особливостей генотипу ізолятів *M.tuberculosis* (належність до родини Beijing)
4. Проаналізувати асоціацію лікарської стійкості *M.tuberculosis* до препаратів I ряду з перебігом туберкульозного процесу в визначених групах

5. Визначити стан системного та місцевого гомеостазу за даними ЛКС біологічних рідин у хворих, що відрізняються за поліморфними варіантами генів глутатіонтрансфераз *GSTT1* та *GSTM1*, в залежності від тяжкості туберкульозного процесу

6. Встановити патогенетичні критерії виявлення груп ризику за тяжкістю туберкульозного процесу та стійкості (чутливості) до специфічної протитуберкульозної терапії.

Об'єкт дослідження – патогенез легеневого туберкульозу

Предмет дослідження – патогенетичні особливості перебігу легеневого туберкульозу, обумовлені генетичними особливостями хазяїна (поліморфізм генів глутатіонтрансфераз *GSTT1* та *GSTM1*) та патогена (вплив належності *M.tuberculosis* до родини Beijing)

Методи дослідження: Загально-клінічні, молекулярно-генетичні, біофізичні, статистичні

Загально-клінічні методи включали вивчення скарг, анамнезу захворювання та життя, даних об'єктивного огляду, загального аналізу крові та сечі, даних рентгенологічного дослідження, які були отримані з історій хвороб.

Молекулярно-генетичні методи включали полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) з подальшим електрофорезом для визначення належності ізолятів *M.tuberculosis* до родини Beijing та мультиплексну ПЛР з подальшим електрофорезом для визначення делеції генів глутатіонтрансфераз *GSTT1* та *GSTM1*

Біофізичні методи включали визначення макромолекулярного стану конденсату вологи видихуваного повітря, плазми крові та сечі хворих на легеневий туберкульоз методом лазерної кореляційної спектроскопії

Статистичні методи включали визначення середнього значення (M), стандартної помилки середнього арифметичного (m), критерія Пірсона (χ^2) відносного ризику (RR) та відношення шансів (OR) за допомогою пакета програм «Statistica 6» та Microsoft Excel – 2007

Наукова новизна одержаних результатів

Дістало подальший розвиток розуміння впливу патогенетичних особливостей

легеневого туберкульозу, які визначаються певними генетичними особливостями організмів збудника та хазяїна. Вперше проведений аналіз впливу належності *M.tuberculosis* до генетичної родини Beijing на патогенетичні особливості туберкульозу. Показано, що інфікування збудниками цієї родини супроводжується більш важким перебігом захворювання з переважанням дисемінованої форми туберкульозу та підвищеною тривалістю бактеріовиділення. Встановлено, що покращення на етапі стаціонарного лікування спостерігається частіше при інфікуванні *M.tuberculosis*, які не належать до родини Beijing в той час як летальність від туберкульозу в групі хворих, інфікованих збудниками генетичної родини Beijing суттєво перевищувала летальність при інфікуванні збудниками інших генетичних родин. Доведено, що інфікування штамми генетичної родини Beijing є одним з факторів несприятливого перебігу захворювання.

Вперше визначена частота null-генотипів генів глутатіонтрансфераз *GSTT1* та *GSTM1* у хворих на легеневий туберкульоз. Проаналізовано вплив поліморфізму за генами *GSTT1* та *GSTM1* на патогенез туберкульозного процесу та продемонстровано, що у хворих з *GSTT1-null* генотипом достовірно частіше спостерігалась дисемінована форма туберкульозу у порівнянні з інфільтративною. Вперше доведено, що *GSTM1-null* генотип асоційований з більш тяжким перебігом туберкульозу легень, що проявляється переважанням дисемінованої форми захворювання, більшою тривалістю бактеріовиділення на стаціонарному етапі лікування, підвищеною частотою деструктивних процесів у легенях, особливо в групі хворих з вперше діагностованим туберкульозом. Показано, що наявність ферменту *GSTM1* можна враховувати як протективний фактор щодо розвитку деструкцій у легенях при туберкульозі. Показано, що серед хворих з *GSTM1-null* генотипом частіше спостерігається поєднання туберкульозу з хронічним обструктивним захворюванням легень з емфіземою, пневмосклерозом та дихальною недостатністю I – II ступеню.

Вперше проаналізовано стан системного (плазма крові) та місцевого (конденсат вологи повітря, що видихується) гомеостазу у хворих на туберкульоз методом лазерної кореляційної спектроскопії. Показано

переважання катаболічно-спрямованих гомеостатичних зсувів над синтетично-спрямованими. Продемонстровано, що найбільша відповідність між характеристиками туберкульозного процесу та гомеостатичними зсувами, що реєструються методом ЛКС спостерігається при дослідженні КВВП. Вперше показано, що наявність катаболічно-спрямованих змін у конденсаті видихуваного повітря на початку захворювання асоційовано з більш тяжким перебігом захворювання та гіршими проміжними і віддаленими результатами лікування та можливість використання методу ЛКС для виявлення груп ризику за тяжкістю туберкульозного процесу. Новизна роботи підтверджена патентом України № 49910 «Спосіб прогнозування несприятливого перебігу туберкульозу легень»

Обґрунтованість та достовірність наукових положень, висновків та рекомендацій.

Робота виконана на достатній кількості зразків крові, конденсату вологи видихуваного повітря та культур мікобактерій, отриманих від хворих на легеневий туберкульоз. Основні положення та висновки дисертації підтверджуються статистично достовірними результатами досліджень. Висновки роботи обґрунтовані і логічно витікають з результатів досліджень. Достовірність основних положень і висновків, викладених у дисертації, підтверджується наявністю первинної документації (протоколи досліджень; виписки з історії хвороби пацієнтів на легеневий туберкульоз; журнал реєстрації молекулярно-генетичних досліджень). Отримані результати ретельно проаналізовані і приведені у достатній кількості таблиць, текст викладений стилістично правильно, з дотриманням логічних зв'язків. Математична обробка отриманих результатів проведена з використанням сучасних статистичних методів оцінки. Результати дослідження проаналізовані з використанням даних вітчизняної та зарубіжної літератури. Кількісні виміри отримані на апаратурі, що пройшла державний метрологічний контроль. Матеріали, що представлені в дисертації, відповідають звітам і первинній документації планової НДР кафедри клінічної імунології, генетики та медичної біології ОНМедУ.

Наукове значення роботи

Отримані дані розширили існуючі уявлення про патогенетичні особливості легеневого туберкульозу, обумовлені певними генетичними особливостями організмів збудника та хазяїна. Вони закладають теоретичний фундамент для створення ефективних засобів прогнозування перебігу туберкульозу легень, оптимізації лікування та зниження ризику несприятливого результату захворювання

Практичне значення отриманих результатів

Отримані результати можуть бути використані для удосконалення ефективності лікування і контролю туберкульозу, оскільки дозволяють своєчасно визначити групу епідеміологічно небезпечних хворих з підвищеною ймовірністю несприятливого перебігу захворювання. Адапована для використання в закладах практичної охорони здоров'я методика визначення належності збудника до високо вірулентної родини Beijing. Визначені особливості ЛК спектрів хворих на легеневий туберкульоз, що є важливим в диференційній діагностиці захворювань легеневої системи та показана можливість використання методу для прогнозування тяжкості перебігу захворювання.

Отримані результати склали основу інформаційного листка «Визначення належності ізолятів *M.tuberculosis* родини Beijing як критерію несприятливого перебігу туберкульозу», нововведення «Спосіб прогнозування тяжкості перебігу легеневого туберкульозу» та методичних рекомендацій «Методика генотипування збудника туберкульозу людини (належності *M.tuberculosis* до родини Beijing). Методичні рекомендації впроваджені в практичну роботу Одеського обласного протитуберкульозного диспансеру та Одеської обласної протитуберкульозної клінічної лікарні з відділенням для інвалідів Вітчизняної війни. Результати досліджень внесено у Реєстр галузевих нововведень 2011 р. (випуск № 34–35) та використовуються в навчальному процесі на кафедрах фтізіопульмонології, загальної і клінічної патофізіології, медичної біології, генетики та клінічної імунології та факультету удосконалення лікарів Одеського

національного медичного університету.

Особистий внесок здобувача. Автором особисто проведено патентно-інформаційний пошук, здійснено планування роботи, визначено мету і задачі дослідження, методичні підходи, проведені молекулярно-генетичні дослідження. Проведено статистичну обробку одержаних результатів, їх оформлення у вигляді таблиць і рисунків, проведено аналіз та узагальнення результатів, сформульовано висновки роботи, опубліковано й апробовано основні положення, написано та оформлено дисертаційну роботу.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи доповідалися й одержали позитивну оцінку на 27th Annual congress of European Society of Mycobacteriology (London, 2006), науково-практичній конференції з міжнародною участю „Актуальні питання медичної генетики” (Київ, 2007), науково-практичній конференції АМН України “Сучасні проблеми туберкульозу в Україні: причини та шляхи їх подолання” (Київ, 2008), IV з'їзді фтизіатрів і пульмонологів України (Київ, 2008), V національному конгресі патофізіологів України “Сучасні проблеми патофізіології: від молекулярно-генетичних до інтегративних аспектів” (Запоріжжя, 2008), V міжнародній науково-практичній конференції “Наукові дослідження — теорія та експеримент” (Полтава, 2009), IX Читаннях ім. В.В.Подвисоцького (Одеса, 2010), II Международной научно-практической конференции «Интегративный подход к проблемам туберкулеза и ВИЧ-инфекции (Гомель, 2011).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 19 наукових робіт, з них 1 монографія (у співавторстві), 6 статей у наукових фахових виданнях, 1 патент України, 1 методичні рекомендації МОЗ України, 1 інформаційний лист, 1 нововведення, 8 тез доповідей на наукових форумах різного рівня.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена на 168 сторінках комп'ютерного друку, складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, трьох розділів власних досліджень, аналізу і узагальнення результатів дослідження, висновків та списку літературних джерел, з яких 172 викладені кирилицею і 139 – латиницею. Робота містить 37 таблиць і 7 рисунків.

РОЗДІЛ 1

ПАТОГЕНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ТУБЕРКУЛЬОЗУ, ОБУМОВЛЕНІ
ГЕНЕТИЧНИМИ ФАКТОРАМИ ЛЮДИНИ ТА *M.TUBERCULOSIS* (ОГЛЯД
ЛІТЕРАТУРИ)

Незважаючи на досягнутий прогрес у лікуванні та контролю, захворювання на туберкульоз залишається однією з головних проблем у галузі охорони здоров'я. За сучасними даними біля однієї третини людства інфіковано *M.tuberculosis* (МБТ), 8-9 мільйонів щороку захворюють на туберкульоз та 1,7 мільйони щороку гинуть від цієї недуги (2004) [1,2]. Аналіз епідеміологічних показників свідчить про подальше послаблення захисних властивостей макроорганізму в несприятливих умовах довкілля при одночасному посиленні вірулентності та агресивності мікроорганізмів. Згідно критеріям ВООЗ Україна віднесена до групи країн з високим рівнем захворюваності на туберкульоз та посідає 7 місце в Європейському регіоні після Росії, Грузії, Киргизії, Румунії, Молдови та Казахстану. За 2006 – 2007 роки захворюваність всіма формами туберкульозу в Україні зменшилася на 4,1%, або з 83,2 до 79,8 на 100 тисяч населення [3]. Але в підвищенні ефективності протитуберкульозних заходів і контролю за туберкульозом залишається багато важливих питань, у тому разі в галузі фундаментальних та фундаментально-прикладних досліджень щодо актуальних проблем виявлення, лікування та профілактики туберкульозу [4].

На теперішній час специфічна туберкульозна інфекція розглядається як процес, в якому приймає участь дві сторони. В різноманітності особливостей патогенезу туберкульозу грає велику роль як характер екзогенної інфекції, тобто масивність та неоднорідність мікробної популяції за морфологічними та біологічними властивостям, так і генетичні особливості організму хворого (рис 1.1). Процес взаємодії макро- та мікроорганізму реалізується на тлі певних соціальних факторів (табл.1.1), що загальною сумою і визначає наслідки інфікування – від спонтанноговилікування на ранньому етапі інфекційного процесу без імунологічних і

рентгенологічних слідів до розвитку важких форм туберкульозу.

Таблиця 1.1.

Фактори, що впливають на результат інфікування при туберкульозній інфекції.

Фактори з боку хазяїна	Фактори з боку патогену	Система „хазяїн-патоген”
Вік Недостатнє харчування Імунний статус ВІЛ-статус Супутні захворювання БЦЖ- вакцинація	Вірулентність Тропізм до певних тканин	Локалізація процесу Тяжкість захворювання

Тільки приблизно в 5%-10% інфікованих розвивається захворювання [5], ступінь якого варіює від субклінічних форм до вкрай тяжких із загибеллю, а після п'яти років з моменту інфікування ризик розвитку захворювання шляхом реактивації інфекції є незначним [6]. Розвиток і результат захворювання, в першу чергу визначається станом імунітету та цитокиновим статусом.



Рис. 1. 1 Фактори, що визначають наслідки інфікування *M. tuberculosis* у системі «патоген-хазяїн»

1.1 Патогенез туберкульозу та генетика хазяїна

Імунологічний контроль туберкульозної інфекції забезпечується взаємодією макрофагів і Т-лімфоцитів (гіперчутливість четвертого типу, I тип Т-клітинної реакції) [7-9]. На відміну від інших патогенів, взаємодія між геномами хазяїна та мікобактерії починається лише після фагоцитування мікобактерій туберкульозу (МБТ) альвеолярними макрофагами та дендритними клітинами в альвеолах легенів [10]. Мікобактерії синтезують ряд ліпідів, гліколіпідів та ліпопротеїдів, що приймають участь в ранніх реакціях розпізнавання та активації імунної відповіді і обумовлюють утворення ряду цитокінів, як фактор некрозу пухлин-альфа (TNF- α), хемокіни CCL2 та CXCL10, IL-1- α , IL-1 β , IL-18 та інших [11-14]. Так, синтез IL-12, який є активатором інтерферону гамма (IFN- γ), індукується взаємодією мікобактеріального гліколіпопротеїда 19 кДа з рецептором макрофагів TLR2 [15]; продукція IL10 індукується взаємодією ліпоарабідоманана, зв'язаного з манозним рецептором, з C-лектиновим рецептором дендритних клітин DC-SIGN тощо [16]. Продукція цитокінів та запальних хемокінів обумовлює активну міграцію мононуклеарних фагоцитів, які диференціюються в тканинні макрофаги та починають процес утворення гранульоми. При цьому продовжується синтез TNF- α та посилюється експресія генів хемокінів CXCL9, CXCL10 та CXCL11. Цей процес супроводжується залученням NKT-клітин, CD4+, CD8+ та В-лімфоцитів [8,13,14,17,18]. В наслідок презентації мікобактеріальних антигенів дендритними клітинами наївні CD4+ перетворюються на Т-хелпери I типу (Th 1). Th 1 лімфоцити продукують IFN- γ , який посилює антибактеріальну активність макрофагів і потенціює загибель внутрішньоклітинних мікобактерій [19], та стимулює утворення в макрофагах TNF- α та IL-12 (головний індуктор IFN- γ). Підвищення бактерицидної активності стимулює в макрофагах злиття фагосом, що містять мікобактерії, з лізосомами, оксидативний вибух та експресію індукцибельної ізоформи NO синтетази (iNOS) [20]. Утворення активних радикалів кисню та NO, як показано в дослідженнях на мишах, необхідно для знищення мікобактерій внутрішньоклітинно [21]. Саме на рівні високої продукції Th 1 цитокінів, TNF- α та

iNOS відбувається утворення гранульом [22], які виконують функції обмеження розмноження бактерій і розповсюдження інфекції. Казеозний некроз та фіброз, характерні для туберкульозу, в значній мірі є результатом дії цитокінів, що продукуються в зоні специфічного запалення [17,18,22] Спрямування імунітету в напрямку Th2 відповіді знижує ефективність захисту[8].

Очевидно, що індивідуальний генотип як хазяїна, так і патогена, які впливають на складний механізм імунної відповіді, обумовлюють чутливість до інфікування *M. tuberculosis*. Це підтверджено за допомогою близнюкових генетичних досліджень [17,23-25]; досліджень родин з високою частотою туберкульозу та популяційними дослідженнями, в яких знайдена асоціація з певними маркерами, як расова належність [17,23,26,27], HLA гаплотипи [17,23,28-32]; аналізом родин з рідкісними моногенними дефектами імунної системи [8,17,18,33]; дослідженнями на трансгенних мишах [8,34 - 38].

В цілому, у людини відомо більше 100 генів, що приймають участь в інфекційному процесі при туберкульозі [8,39,40]. Головними генами схильності є гени, що приймають участь в реалізації етапів імунної відповіді. Першим з ідентифікованих генів, що приймають участь в контролі схильності та тяжкості перебігу, виявився ген *Slc11a1* (Solute carrier family 11, member 1) або *Nramp1*. Активний продукт гена представлений переважно на мембранах лізосом макрофагів та гранул нейтрофілів, швидко переміщується на мембрани фагосом при їх утворенні [41] та виконує роль насоса, який видаляє іони заліза та мангану з фагосом [42,43], що і визначає його мікобактерицидну активність. Функціональна інактивація молекули *Slc11a1* обумовлена рецесивною точковою мутацією в четвертому домені, яка змінює його третинну структуру, запобігає утворенню зрілої форми білка та обумовлює його швидку деградацію[44]. Ген *Slc11a1* містить елементи інтерференового каскаду, які стимулюються IFN- γ , а також IFN- γ активуючі послідовності [19]. Підтверджений вплив на чутливість до туберкульозу та його перебіг поліморфізму за генами інтерферон-інтерлейкінової осі (IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-8, IL-10, IL-12), TNF- α , їх рецепторами [8,11-19] і рецепторами макрофагів [11,12,15,17,37,39,40].

Суттєвий вплив має поліморфізм за рецепторами апоптозу та іншими генами, що приймають участь в цьому процесі [45-47]. Так, продукт гена *Ipr1* (білок *Ipr1*), асоційований з хроматином ядра макрофагів, збільшує здатність інфікованих мікобактеріями макрофагів до апоптозу [48].

В багатьох дослідженнях показаний зв'язок між туберкульозом і дефіцитом вітаміну D, концентрація якого в сироватці крові хворих суттєво нижче, ніж у здорових [8,23,39]. Показано, що 1,25-дігідроксівітамін D3 (активна форма вітаміну) індукує експресію NOS2 та обмежує ріст *M.tuberculosis* в промієлоцитах людини[49]. Виявлений поліморфізм гену рецептора вітаміну D3, варіанти якого асоційовані з підвищеною резистентністю/чутливістю до туберкульозу та розвитком лепроматозної або туберкульозної форми прокази[50-52]. Активація макрофагів людини через TLR1/2-рецептори при зв'язуванні ліпопротеїдів мікобактерій обумовлює підвищену експресію генів, що кодують рецептор вітаміну D, гідролазу D-1 вітаміну D, внаслідок чого утворюється протимікробний пептид кателіцидін, який знищує внутрішньоклітинні мікобактерії[53]. Опосередковану дію на виживання мікобактерій всередині макрофага має утворення IFN- γ -активованими макрофагами хелаторів заліза ліпокалінів, які обмежують здатність мікобактерій конкурувати за зв'язування заліза в клітинах хазяїна, що є єдиним джерелом заліза для мікобактерій в середині фагосоми[54]. Т-лімфоцити також здатні утворювати молекули, що безпосередньо діють на мікобактерії: *in vitro* показано, що CD8 клітини, які синтезують гранулізін та перфорін, мають безпосередню бактерицидну активність проти *M.tuberculosis*[55].

Спектр антигенів HLA, які асоційовані зі схильністю до туберкульозу відрізняється в різних популяціях, що може бути пов'язано з етнічним походженням популяцій і, внаслідок цього, нерівномірною частотою розподілу аллелів. В дослідженнях, проведених в Росії, виявлена асоціація антигенів HLA та особливостей показників клітинного і гуморального ланок імунітету, а також цитокін-секретуючої функції імунокомпетентних клітин у хворих на туберкульоз легень. Так, виявлена асоціація туберкульозу з аллелем HLA-DR-2 [56]; 05й алель локусу HLA-DQ-B1 позитивно асоціюється з захворюванням на туберкульоз і

визначає несприятливий перебіг інфекції, обумовлений пригніченням функції клітинної ланки імунітету з активацією гуморальної ланки; визначена негативна асоціація 03 специфічності локусу HLA-DQ-B1 з несприятливим перебігом процесу [31]. 01, 07 та 13 алелі гена HLA-DR-B1 визначають резистентність до туберкульозу органів дихання, а при захворюванні сприяють більш легкому перебігу туберкульозної інфекції; а наявність 12 та 16 алелів дозволяє прогнозувати схильність до тяжкого прогресуючого перебігу захворювання [32].

Складний патогенез, а також варіабельність клінічних проявів туберкульозу дає можливість припустити значну кількість генів-кандидатів в розвитку туберкульозу, при цьому вклад кожного з них варіює [57]. Вивчення поліморфізму відомих генів-кандидатів та пошук нових генів, білкові продукти яких приймають участь в патогенетичних механізмах захворювання, є однією з найважливіших задач при дослідженні туберкульозу.

1.2 Вплив поліморфізму генів глутатіонтрансфераз на стан дихальної системи

Одним з потенційних генів-модифікаторів для туберкульозної інфекції є гени метаболізму ксенобіотиків. Система метаболізму ксенобіотиків приймає участь як в захисті організму від наслідків розгортання запальних реакцій, що підтверджується зміною рівня активності цитохромів P450 при запаленні та інфекції [58], так і в метаболізмі багатьох лікарських препаратів. Визначення впливу поліморфізму ферментів метаболізму на особливості біотрансформації антимікобактеріальних препаратів дозволяє передбачити побічні реакції та оптимізувати терапію [59].

Одним з найважливіших ферментів метаболізму ксенобіотиків є глутатіонтрансферази. Глутатіон-S-трансферази (GST) – це родина ферментів II-ї фази детоксикації, що каталізують детоксикацію значного кола ксенобіотиків [60], інтермедіатів запальних процесів та відіграють найважливішу роль у забезпеченні резистентності клітин до перекісного окислення ліпідів [61]. Глутатіонтрансферази широко експресовані в тканинах ссавців, де вони каталізують приєднання

глутатіону до електрофільного центру багатьох хімічних сполук, що обумовлює втрату токсичності з утворенням більш гідрофільних продуктів, які в подальшому можуть бути метаболізовані та виведені з клітини [62-65]. Ці ферменти відіграють значну роль у клітинній детоксикації електрофільних альфа та бета ненасичених вуглеводнів – продуктів радикальних реакцій, перекісного окислення ліпідів, іонізуючої радіації та метаболізму ліків [66]. Деякі субстрати для глутатіон- S-трансфераз наведені в таблиці 1.2

Таблиця 1.2

Субстрати для глутатіон- S-трансфераз

Ендогенні молекули	4-гідроксі-2-ноненал; Холестерол-5,6-оксид; Аденінпропенал; 9-гідропероксілінолева кислота; Допамінохром, амінохром; Катехолестрогени (хінони, похідні 2-або 4-гідроксіестрадіола); Малеллацетоацетат
Зовнішні канцерогени та токсиканти	Бензпірен 7,8-дігідродіол-9,10-епоксид; оксид стірену; 5-гідроксіметіл-хризен сульфат; 7-гідроксіметілбензантрацен сульфат; 4-нітрохінолін оксид; акролеїн; гексахлорбутадиєн; бутадиєн; тріхлоретілен; метиленхлорид; етиленоксид; 2-аміно-1-метіл-6-фенілімідазо[4,5b]-піридин.
Пестициди	Ліндан; алахлор; атразін; ДДТ; метілпаратіон;
Лікарські засоби	Cis-платін; хлорамбутіл; циклофосфамід; фосфоміцин; етакринова кислота; нітрогліцерин; менадіон; ацетамінофен; мітозантрон; адриаміцин.

У людини цитозольні GST представлені вісьма класами: α (GSTA), μ (GSTM), π (GSTP), θ (GSTT), τ (GSTZ), σ (GSTS), ω (GSTO), κ (GSTK), кожен з яких має одну або більше гомодімерних або гетеродімерних ізоформ [67]. Ступінь специфічної активності глутатіонтрансфераз проти продуктів перекісного окислення фосфоліпідів представлена рядом GSTA1 > GSTT1 > GSTM1 > GSTA2 > GSTA4 [68].

Знайдені значні міжтканинні відмінності рівню експресії ізоформ GST. Найбільш висока їх концентрація в печінці, плаценті, легенях, мозку, нирках, кишечнику. Активність ферментів глутатіонтрансфераз спостерігається в бронхіальному епітелії, 1 та 2 типах альвеолярних клітин та легеневиx макрофагах, забезпечуючи захист як дистальних так і проксимальних відділів дихальних шляхів [69-72]. Легеневі GST відіграють важливу роль в первинному метаболізмі багатьох

речовин (атмосферні поллютанти, тютюновий дим тощо), які потрапляють в організм через дихальні шляхи. Важливу роль в механізмі токсичної дії сірковмісних атмосферних сполук відіграє активація процесів перекисного окислення ліпідів, внаслідок чого підвищується проникливість клітинних мембран з порушенням окислювально-відновних процесів [73] та дисфункцією системи мукоциліарного кліренсу. Оскільки система мукоциліарного кліренсу є першим бар'єром на шляху туберкульозної інфекції, ряд досліджень виявив кореляцію між ступеню забрудненості атмосферного повітря та характером перебігу туберкульозу з підвищенням деструктивних бацилярних форм серед хворих з ВДТБ в індустріальних районах [74-76].

Більшість генів, що кодують білки глутатіонтрансферази, відрізняються значним популяційним поліморфізмом. Глутатіон-S-трансфераза класу μ кодується геном, картованим на довгому плечі хромосоми 1 (1q13). Внаслідок альтернативного сплайсингу первинного РНК-транскрипту утворюється 5 груп ферментів класу GSTM, з яких GSTM1 переважно експресується в печінці, клітинах крові, легенях, GSTM2 активна в м'язах, а GSTM3 – GSTM5 знайдені в тканинах мозку [77]. У людини зустрічаються 3 аллельні варіанти гена *GSTM1*. *GSTM1A* та *GSTM1B* кодують білки з подібною ферментативною активністю і відрізняються лише за одною амінокислотою (лізин/аспарагін в позиції 172). Аллельний варіант *GSTM1O* (*GSTM1 null*) утворюється внаслідок делеції [67] ділянки розміром приблизно 15 т.п.н., яка повністю містить ген *GSTM1*, внаслідок нерівного кросинговеру між високогомологічними регіонами, що фланкують ген [78]. Делеція обумовлює повну відсутність білкового продукту гена [79], та у гомозиготному стані зустрічається приблизно в 50% європейців [67,77].

Поліморфізм за геном *GSTT1* (22q11.23) обумовлений наявністю двох аллелів: функціонально активного *GSTT1*1* и неактивного «нульового» (*GSTT1O* або *GSTT1 null*) аллелю [80]. Подібно до *GSTM1* поліморфізму, *GSTT1* поліморфізм пов'язаний з делецією значної частини гену, внаслідок чого активність ферменту в тканинах відсутня. Частота гомозигот за делецією *GSTT1* характеризується значною міжетнічною варіабельністю (12% – 62%) [68], і складає до 60% серед азіатів, 40%

серед представників негроїдної раси, 20% - 30% у європеїдів [81,82]. Особи з null-генотипом/фенотипом, в яких ферменти *GSTM1* та *GSTT1* не експресуються, є менш захищеними від хімічного та оксидативного стресу [83-85]. В ряді досліджень показаний зв'язок між поліморфізмом даних ферментів і підвищеним ризиком розвитку онкологічних захворювань легень, кишечника, крові, репродуктивної системи та порушень у системі «мати-плацента-плід»[83, 86-93].

Виявлена значна асоціація між легеневою функцією і захворюваннями дихальної системи з делеційним поліморфізмом генів глутатіонтрансфераз, пов'язана з важливою роллю цих ферментів як в метаболізмі токсикантів зовнішнього середовища, так і інактивації продуктів реактивних форм кисню.

Так, проведене в Швейцарії протягом 11 років спостереження виявило прискорене зниження функції легень (об'єм форсованого видиху та об'єм форсованого видиху за 1 сек.) у чоловіків (але не в жінок) з гомозиготною делецією *GSTT1* (поодинокі або в поєднанні з гомозиготною делецією *GSTM1*). Додаткове річне зниження об'єму форсованого видиху за 1 сек. в цій групі склало -8,3 мл у порівнянні з особинами з наявністю ферментів[94]. Основополагаюча роль оксидативного стресу в стані дихальної системи була показана раніше в епідеміологічних дослідженнях, які продемонстрували захисну роль харчових та інших антиоксидантів для зниження функціональної активності та захворювань легень [95-97]. У швейцарському когортному дослідженні вплив *GST-null* генотипу на функцію легень не залежав від статусу куріння, і спостерігався також у осіб, які мешкали в регіонах з низькою концентрацією атмосферних поллютантів, що підтверджує припущення про можливість оксидативного пошкодження легень навіть при незначній кількості атмосферних пошкоджуючих факторів та у випадках хронічного запалення [98]. Також показана суттєва асоціація між прискореним зниженням легеневої функції з поєднанням делеції *GSTT1* або *GSTM1* та AA(Val) генотипу *GSTP1*(Ile105Val поліморфізм) у курців. Така асоціація є очікуваною, оскільки тютюновий дим містить багато субстратів (оксиди поліароматичних вуглеводнів, дігалоалкени тощо) для *GSTT1*, *GSTM1* та *GSTP1* [99]. Подібна комбінація алелів була знайдена при вивченні впливу поліморфізму генів

детоксикації ксенобіотиків на ризик розвитку раку легень та раку шийки матки [100, 101]. Поєднання „злісного” куріння та *GSTM1* нуль-генотипу глутатіонтрансфераз виявилось суттєвим фактором ризику хронічного бронхіту (71,3% хворих з тяжким хронічним бронхітом мали делецію у порівнянні з частотою делеції 47,1% у курців без ознак захворювання) [102]. В багатьох дослідженнях знайдена асоціація *GSTM1*-null генотипу з хронічним обструктивним захворюванням легень (ХОЗЛ), в той час як результати вивчення подібної асоціації з *GSTT1*-null генотипом є суперечливими [103-106]. Суттєву роль мають глутатіонтрансферази в патогенезі бронхіальної астми [107-109]. Проведене в Росії дослідження показало, що поєднання *GSTT1* та *GSTM1* плюс-генотипів у дітей забезпечує резистентність до розвитку бронхіальної астми, а *GSTT1*-null генотип має домінуючу роль у розвитку схильності до захворювання. К несприятливим ефектам пасивного куріння максимально чутливою виявилась група дітей з комбінацією алелів *GSTM1*- /*GSTT1*+ [110,111]. В той же час в Корейській популяції ані *GSTT1*, ані *GSTM1*-null генотипи з хронічним обструктивним захворюванням легень не асоціювались [112]. Також показано, що поліморфізм за генами глутатіонтрансфераз не впливає на ризик розвитку пневмоконіозу [113], а ризик розвитку азбестозу змінюється не суттєво [114].

Аналіз поліморфізму за генами глутатіонтрансфераз Т та М у хворих на легенеий туберкульоз не виявив достовірної асоціації [115,116] з підвищенням ризику захворювання. Але у ряді досліджень відмічений вплив поліморфізму за генами *GST* на особливості перебігу захворювання. Так, в азіатських популяціях *GSTM1*-null генотип асоційований з підвищеним ризиком гепатотоксичного ефекту протитуберкульозних препаратів, але для *GSTT1*-null генотипу подібний ефект не виявлений [117-119]. Проведені дослідження показали, що гідразин, який утворюється в наслідок гідролізації ізоніазиду, має тенденцію до накопичення власне у хворих з *GSTM1*-null генотипом, що і може пояснювати гепатотоксичність [120]. В той же час, дослідження асоціації серед осіб європеїдної раси виявили підвищену частоту гепатотоксичних ускладнень у хворих на легенеий туберкульоз з *GSTT1*-null генотипом, а в випадку делеції гена

GSTMI подібний ефект не спостерігався [121].

1.3 Характеристика *M.tuberculosis* родини Beijing

До якого ступеню патогенез туберкульозу залежить від особливостей інфекційного агента, не залежно від особливостей хазяїна, залишається з'ясованим недостатньо. До активного впровадження методів молекулярно-генетичного типування вважалось, що мікобактерії туберкульозу є генетично високо консервативною групою з дуже обмеженим спектром фенотипних відмінностей, які можуть впливати на патогенез. Однак з'ясувалось, що сукупність циркулюючих штамів мікобактерій характеризується значною варіабельністю з наявністю високо- й мало вірулентних штамів, які поєднані у різні родини на підставі генетичних особливостей. Відмінною рисою сучасних штамів МБТ є неможливість горизонтального переносу генів [122,123], хоча рідкісні рекомбінаційні події показані в останні роки [124]. Еволюція *M.tuberculosis* відбувається переважно шляхом делецій та дуплікацій, що обумовлює клональний паттерн еволюції, та в поєднанні з відсутністю рекомбінацій, може обумовлювати патогенетичні відмінності між штамми [125]. Послідовністю, що широко використовується як генетичний маркер, є інсерційна послідовність IS6110, що відноситься до IS3 родини транспозонів [126], специфічна для штамів комплексу *M.tuberculosis* [127].

Мікобактерія туберкульозу не продукує будь-яких екзотоксинів. Її патогенність пов'язана в першу чергу, із здатністю виживати в макрофагах і індукувати гіперчутливість сповільненого типу. Генетично різні штами *M.tuberculosis* стимулюють декілька відмінну імунну відповідь. Це, в свою чергу, визначає відмінності в патогенезі і, відповідно, в клінічних проявах захворювання. Так, в різних штаммах *M.tuberculosis* виявлена різна експресія 527 генів (15% від загального числа досліджених) [128], зокрема генів Т-клітинних антигенів, ліпідного метаболізму, родини PE/PPE та інших. Вивчення кореляції між генотипом штаму та патогенезом, клінічними проявами і епідеміологічними характеристиками захворювання є перспективним напрямком сучасних досліджень [129].

Однією з родин, для якої механізми високої вірулентності і трансмісивності зараз активно вивчаються, є Східно-Азіатська родина (Beijing), домінування якої було виявлене в 1995 році в китайській провінції Beijing. Значне розповсюдження штамів Beijing в різних географічних регіонах та їх здатність до домінування і клонального розповсюдження дає можливість припустити, що ця філогенетична лінія має генетичні переваги над іншими лініями *M.tuberculosis* у спроможності інфікувати людину та викликати захворювання. Сучасні молекулярні дослідження показали, що родина W-Beijing є самостійною філогенетичною лінією що походить від спільного вихідного штаму [130]. З генетичної точки зору W-Beijing штами характеризуються певними особливостями:

- характерний паттерн поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (ПДРФ) з 15 – 26 копіями інсерційної послідовності IS6110; [131]

- наявністю двох мутацій – одна в 463 кодоні (CTG, Лей) гену *katG*, інша у 95 кодоні (ACC, Тре) гену *gyrA*, що вказує на належність збудника до генетичної групи 1 [131, 132]; W-штами також характеризуються динуклеотидною заміною (AGC → ACA; Сер → Тре) в 315 кодоні гену *katG*. Мутація 315 кодону цього гену є частою причиною стійкості до ізоніазиду, але вищезазначений тип мутації є унікальною рисою штаму W [133].

- S00034 паттерн споліготипування, який характеризується відсутністю спейсерів 1 – 34 та наявністю гібридизації із спейсерами 35 – 43 в регіоні прямих повторів мікобактеріальної хромосоми [132]. Сполігопаттерни збудників, що належать до групи Beijing відрізняються від інших штамів *M.tuberculosis*, що передбачає їх відносно недавнє виникнення від спільного попередника.

- інсерція IS6110 (інсерція A1) в точці початку реплікації (*oriC*) між генами *dnaA* та *dnaN* [130]

- одна або дві інсерції IS6110 у хромосомному регіоні NTF [130]. Штами Beijing характеризуються однією інсерцією, W-мультирезистентні штами мають дві протилежно орієнтовані вставки [134]

- специфічний паттерн однуклеотидного поліморфізму (sSNP) [135].

В дослідженнях на мишах, інфікованих штамами декількох генетичних родин

показано, що бактерії родини *Beijing* розмножуються в легенях активніше, викликають ранню і масивну пневмонію і смерть [136,137]. При цьому у мишей спостерігається спочатку висока, хоч і скороминуща, експресія $TNF\alpha$ і $iNOS$, що припускає ефективну активацію макрофагів на ранній стадії інфекції. Проте $IFN\gamma$ продукується пізно і слабо, що може свідчити про швидку інактивацію макрофагів, які стимулюють $Th1$ клітини не достатньо ефективно для зупинки розмноження бактерій. Це призводить до масивного пошкодження тканин і ранньої смерті. У лабораторних експериментах у мишей також відмічено більш швидке розмноження в макрофагах і активніше пригнічення апоптоза інфікованих макрофагів при інфікуванні збудниками родини *Beijing*. Спостерігається зниження продукції $IL-2$, що відповідає за активацію макрофагів і запуск синтезу $IFN\gamma$, продукції $TNF\alpha$, підвищення експресії $IL-10$, який гальмує імунну відповідь, пригнічуючи синтез інтерферонів [138]. Такий баланс цитокінів пояснює зниження рівня $IFN\gamma$, який є не тільки активатором макрофагів, але й антагоністом $IL-4$. Для $IL-4$ характерно пригнічення $Th1$ імунної відповіді та індукція проліферації і диференціювання $Th2$ клітин, тобто менш ефективного при туберкульозі типу імунної відповіді.

Дослідження рівня цитокінів у хворих легенеvim туберкульозом людей, інфікованих штамами *Beijing* [139] та штамами інших родин не показали істотних відмінностей в рівнях $IFN\gamma$, $IL-2$, $IL-18$. Розбіжність в отриманих результатах може бути пов'язано як з видовими особливостями імунної відповіді (у мишей найважливішу роль відводять реактивному кисню і радикалам азоту, тоді як у людини велике значення мають перфорін у поєднанні з гранулізіном) [140], так і з відмінностями у вірулентності штамів усередині родини [141]. Не можна також виключити можливість, що при невеликій кількості обстежених хворих істотним фактором були індивідуальні особливості імунної відповіді (лінії мишей характеризуються високим рівнем гомозиготності).

Особливості збудника, що обумовлюють такий результат інфікування остаточно не ідентифіковані, але активно вивчаються потенційні кандидати, одним з яких є фенольний гліколіпід $PGL-tb$. Цей гліколіпід, що продукується гіпервірулентними для мишей штамами *Beijing* (W4, W10, 210), в дослідженнях *in vitro* пригнічує

виділення протизапальних цитокінів макрофагами, а делеція генної ділянки *pks 1-15*, необхідної для синтезу PGL-tb, приводить до зникнення гіпервірулентного фенотипу [142]. Підвищена вірулентність може бути пов'язана також з нездатністю штамів родини Beijing стимулювати дозрівання дендритних клітин, які мають велике значення як антиген-презентуючі клітини [143].

Іншим дуже важливим моментом патогенезу є виживання в організмі хазяїна. *M.tuberculosis*, що знаходиться в гранульомі хазяїна, потрапляє в екстремальні гіпоксичні/анаеробні умови. Дослідження *in vitro* та *in vivo* (макрофаги миші та зараження мишей інбредної лінії C57B1/6), показали, що штами кластера W-Beijing мали середню швидкість розмноження *in vitro*, але при цьому показали високу життєздатність в макрофагах [144]. Відомо, що для виникнення інфекційного захворювання важливу роль має інфікуюча доза збудника. В експерименті [144] було показано, що здатність вижити всередині макрофага для цього кластера, на відміну від інших штамів, майже не залежала від величини бактеріального навантаження на макрофаги. Штами кластера максимально виживають вже при низькому бактеріальному навантаженні. При зараженні достатньо мінімальної кількості збудника, щоб запустити інфекційний процес, в той час як така ж сама доза збудника інших штамів може виявитися недостатньою.

Підвищена здатність родини Beijing до виживання може бути пов'язана з групою генів (регулон з 48 генів), контрольованих чинником транскрипції DosR, експресію якої викликає недолік кисню (як і NO). Ці гени беруть участь в забезпеченні анаеробного дихання і ліпідного метаболізму і необхідні на стадії латентної інфекції і, ймовірно, хронічної фази активного туберкульозу [145]. У мікобактерій Beijing відмічена підвищена експресія багатьох з цих генів, аж до 50-разової різниці в базовому рівні транскрипції в порівнянні з *M.tuberculosis* інших родин [146]. Мікобактерії родини Beijing також здатні активно акумулювати тріацилгліцериди (TAG), які при нестачі поживних речовин гідролізуються, забезпечуючи мікобактерії вуглецем і енергією, як за відсутності кисню, так і у разі агресивної імунної відповіді хазяїна [147]. Ген ферменту TAG-синтази входить до складу DosR регулона, вміст транскрипту цього гена в стандартних умовах культивування у

штамів Beijing в 10 разів більше в порівнянні з іншими родинами [146]. Здібність до накопичення TAG в умовах, коли збудники інших родин їх не накопичують, дає родині Beijing додаткові переваги при трансмісії і персистуванні в організмі хазяїна, що може пояснити асоціацію інфікування штамми Beijing з невдалим лікуванням та рецидивами туберкульозу [148, 149].

Знайдено також відмінності між родинами в експресивності інших білків, що визначають антигенні властивості та вірулентність мікобактерій (PPE44 та інші). Так, PPE44 є членом родини PPE білків *M.tuberculosis*, яка об'єднує 69 білків, збагачених гліцином. Передбачається, що вони мають певне значення в антигенній варіабельності, дозволяючи мікобактеріям маскуватись від знищення імунною системою хазяїна [150] та виконують роль цис-інгібітора убіквітиново-протеазного шляху, під час якого відбувається процесінг антигену [7]. Секвенування гену *ppe44* головних філогенетичних ліній *M.tuberculosis* не виявило нуклеотидних змін, за винятком генотипу Beijing [151]. Рівень експресії цього гену у штамів Beijing був значно вищий у порівнянні з іншими генетичними родинами.

Важливим фактором успішності мікобактерій є їх медикаментозна резистентність. Розповсюдження хіміорезистентних штамів *M.tuberculosis* – наслідок широкого використання антимікробної терапії. Вихідні штами *M.tuberculosis*, які не зазнавали дії протитуберкульозних засобів майже ніколи не демонструють лікарської стійкості [152].

Первинна резистентність прямо залежить від частоти виявлення набутої резистентності: чим більше хворих виділяє стійкі штами МБТ, тим більша ймовірність здорових осіб інфікуватися хіміорезистентними МБТ. За даними ВООЗ, у світі до 50 млн. людей інфіковано резистентними до протитуберкульозних засобів штамми МБТ [153]. Мультирезистентність (одночасна резистентність до ізоніазиду та рифампіцину з/або без резистентності до інших протитуберкульозних препаратів) спостерігається більш ніж у 4% пацієнтів, серед яких біля 40% - хворі зі вторинною резистентністю [2]. В Східній Європі мультирезистентність спостерігається у приблизно 10% хворих, що не лікувались раніше та у 40% хворих, що вже отримували протитуберкульозне лікування [154]. Оскільки спектр

протитуберкульозних засобів досить вузький, виникнення стійкості до одного або декількох протитуберкульозних препаратів значно знижує ефективність лікування з одночасним підвищенням його тривалості та коштовності [1, 7-9].

Основний механізм розвитку медикаментозної резистентності МБТ є мутації в генах збудника. На сучасний момент вивчені майже усі гени МБТ, що контролюють медикаментозну резистентність до протитуберкульозних препаратів першого та другого ряду [8].

Ізоніазид є попередником активної речовини, що активується *in vivo* за допомогою ферменту мікобактерій каталази-пероксидази, яка є продуктом експресії гена *katG*. Однією з мішеней активованої сполуки є ген *inhA*, що відповідає за синтез еноїд-редуктази, яка приймає участь в синтезі компонентів клітинної стінки. Виникнення мутації в обох генах перешкоджає активації препарату або його зв'язуванню з мішенню [155]. Подібним є механізм нечутливості до піразинаміду, де мутація у гені *pncA* (фермент амідаза) робить неможливою активацію попередника активної речовини [8]. Резистентність до рифампіцину, який пригнічує активність бактеріальної РНК-полімерази, пов'язана з мутацією гена *rpoB* (β -субодиниці РНК-полімерази) і неможливістю взаємодії цього ферменту з препаратом [156,157]. Стрептоміцин блокує трансляцію шляхом приєднання до 16S рРНК. Мутації генів *rrs* та *rpsL*, що кодують 16S РНК і стабілізуючий РНК білок, обумовлюють нечутливість до стрептоміцину [158]. Резистентність до етамбутолу є результатом точкових мутацій гену *emb* ферментів арабінозилтрансфераз, необхідних для синтезу компонентів клітинної стінки [8]. В ряді досліджень показано, що медикаментозно-резистентні штами МБТ характеризуються зниженою пристосованістю у порівнянні з медикаментозно чутливими [159,160]. Але МБТ родини W-Beijing характеризуються наявністю медикаментозно-резистентних штамів, життєздатність яких зберігається після набуття медикаментозної резистентності, а швидкість росту в культурі навіть більше, ніж у чутливих [161]. Селективні переваги внаслідок мутацій, що не знижують пристосованість мікобактерій W-Beijing з множинною медикаментозною

резистентністю можуть бути одним з факторів, що пояснюють значне розповсюдження цих штамів.

Визначення ролі комплексного генетичного прогнозу в лікуванні та профілактиці туберкульозу тільки починається. У випадку виділення МБТ генотипу Beijing у джерелі зараження в контактних осіб ймовірність розвитку туберкульозу висока, особливо якщо вони не мають протективного алелю 01 HLA-DRB1[162]. Вперше доведено безпосередню асоціацію між певним генотипом людини та мікобактерії: показано, що в осіб з С алеллю гену *TLR-2* (Toll-подібний рецептор) T597C достовірно підвищена ймовірність інфікування штамми Східно-Азіатської (Beijing) лінії (OR 1,57 95% CI 1.15-2.15) [163].

1.4 Можливості методу лазерної кореляційної спектроскопії в дослідженні патології людини

Участь легенів у процесах метаболізму й екскреції продуктів метаболізму дозволяє розглядати їхню роль у компенсаторно-приспосувальних реакціях організму, спрямованих на збереження як системного так і місцевого гомеостазу. Патофізіологічні процеси, що відбуваються при будь-якому захворюванні, призводять до порушення гомеостатичних показників на системному і місцевому рівнях, із неминучими змінами в складових біологічних рідин. Традиційні методи біохімічного дослідження передбачають використання хімічних реагентів, що обумовлює порушення міжмолекулярних взаємодій та ускладнює оцінку складу багатокомпонентних рідин. Значною перевагою методу лазерної кореляційної спектроскопії (ЛКС) є вивчення нативних зразків без порушення складних міжмолекулярних взаємодій, які є однією з функціональних характеристик біологічної рідини [164]. ЛКС є одним з зручних неспецифічних моніторингових методів лабораторного аналізу, які дозволяють отримати інформацію про стан біологічно гетерогенних рідин шляхом оцінювання співвідношення гідродинамічних радіусів світлорозсіювальних часток при вивченні змін спектральних характеристик монохроматичного когерентного випромінювання

[165, 166]. Незважаючи на неспецифічність отриманої методом ЛКС інформації, сумарна гістограма субфракційного складу рідини, що вивчається, адекватно віддзеркалює співвідношення в ній біосубстратів та дозволяє одержати інтегральні показники, що відбивають динамічний стан досліджуваної системи [167,168]. Продемонстрована інформативність вивчення рівню функціонального напруження систем гуморального та тканинного гомеостазу методом ЛКС в визначенні критеріїв доклінічної діагностики у дітей [169, 170], оцінюванні тяжкості перебігу та прогнозу захворювань ендокринної, серцевої-судинної, видільної та інших систем [171-174], адекватності терапії [175,176]. Чутливість методу виявилась достатньо високою в усіх проведених дослідженнях, а специфічність варіювала в залежності від досліджуваної патології [174, 177]

Метод ЛКС також виявився корисним при диференційній діагностиці захворювань бронхо-легеневої системи при дослідженні плазми крові та конденсату вологи видихуваного повітря (КВВП). Так, за допомогою ЛКС дослідження плазми крові хворих на туберкульозний та канцероматозний плеврит в 68-72% випадків можливо достовірно розрізнити ці стани [178]. При таких верифікованих патологіях бронхо-альвеолярної системи, як бронхопневмонія, бронхіальна астма, бронхо-ектатичні порушення, субфракційний склад КВВП чітко диференціює різні варіанти зрушень у тканинному гомеостазі дихальних шляхів: перевага atopічних процесів, або метаболічно-активованих станів, або гіперпроліферативних [179-183]. Вивчення можливостей ЛКС при дослідженні зразків конденсату вологи видихуваного повітря у хворих на туберкульоз легень раніше не проводилось.

Матеріали розділу представлені в наступних наукових працях:

1. Запорожан В.М. Молекулярна епідеміологія / В. М. Запорожан, Ю. І. Бажора, В. Й. Кресюн, Ю. М. Ворохта, В. Г. Марічереда, М. М. Чеснокова ; за ред. В. М. Запорожана. – Одеса : Одес. держ. мед. ун-т, 2010. – 316 с

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

З метою вивчення епідеміологічних показників та забезпечення статистичної достовірності дослідження було сплановано згідно з принципами доказової медицини з використанням метода поперечного зрізу (Cross-sectional study) [184]. До участі у дослідженні були залучені усі хворі на легеневий туберкульоз віком 18 – 65 років, які звернулися до поліклінічного відділення Одеського обласного протитуберкульозного диспансеру протягом січня – липня (1 та 2 когорти) 2005 року, були госпіталізовані для стаціонарного лікування до Одеського обласного протитуберкульозного диспансеру та Одеської обласної протитуберкульозної клінічної лікарні з відділенням для інвалідів Вітчизняної війни і дали згоду на участь у дослідженні (320 осіб). Діагноз легеневого туберкульозу у всіх хворих був встановлений на підставі клінічного, мікробіологічного та рентгенологічного дослідження.

2.1 Характеристика групи осіб, залучених у дослідження

Група хворих включала 251 (78,5%) чоловіка та 69 (21,5%) жінок віком 19 до 65 років, мешканці м. Одеси (n=23, 7,1%) та Одеської області (n=297, 92,9%).

Необхідну епідеміологічну та демографічну інформацію було отримано з стандартизованих опитувачів, які включали запитання стосовно :

- демографічних даних (вік, стать, місце постійного проживання);
- факторів ризику туберкульозу (перебування у місцях позбавлення волі, ВІЛ-статус, зловживання алкоголем, вживання ін'єкційних наркотиків, інтенсивність куріння, наявність професійних шкідливостей, контакт з хворими на туберкульоз);

- попередньої історії лікування туберкульозу.

Опитувач також включав інформацію для хворого про цілі роботи та запитання стосовно згоди до участі в дослідженні.

Дані про перебіг туберкульозного процесу (тривалість стаціонарного лікування, клінічний діагноз, форму туберкульозу, рентгенологічну динаміку, результати загально клінічного та біохімічного лабораторного дослідження, тощо) були отримані при аналізі історій хвороб. У більшості залучених в дослідження хворих (n=254, 79,4%) типом туберкульозного процесу був вперше діагностований туберкульоз (ВДТБ), у 23 хворих (7,2%) – рецидив туберкульозу (РТБ), у 43 хворих (13,4%) – хронічний туберкульоз (ХТБ). У хворих переважали дисемінована (n=159, 49,7%) та інфільтративна (n=125, 39,1%) клінічні форми туберкульозу. Вогнищева та фіброзно-кавернозна форми туберкульозу зустрічались в 14 випадках кожна (по 4,4%), туберкульозний плеврит – у 5 хворих (1,5%), по 1 випадку зареєстровані казеозна пневмонія, туберкулома та міліарний туберкульоз (0,3%).

Згідно стандартам діагностики та лікування туберкульозу [185] більша частина хворих (n=214, 66,9%) була віднесена до 1 клінічної категорії обліку (хворі на вперше діагностований туберкульоз легенів з клінічної бактеріовиділенням, а також хворі на вперше діагностований туберкульоз з поширеними та тяжкими формами легеневого чи поза легеневого туберкульозу незалежно від бактеріовиділення). Частина хворих (n=49, 15,3%) була віднесена до 2 клінічної категорії обліку (хворі з рецидивом туберкульозу, уперше виявлені з неефективним лікуванням, а також хворі, що перервали прийом протитуберкульозних препаратів більш ніж на два місяці). 14 хворих (4,4%) були включені до 3 категорії (хворі на вперше діагностований обмежений (менше 2 сегментів) туберкульоз легень без бактеріовиділення), 43 хворих (13,4%) належали до 4 категорії (хворі на хронічний туберкульоз незалежно від бактеріовиділення).

З 320 хворих, залучених до дослідження, бактеріовиділення спостерігалось в 225 (70,3%) осіб, з них методом бактеріоскопії мікобактерії були визначені у 181(56,5%) осіб, бактеріологічним методом – у 192 хворих (60%). Посів, культивування, ідентифікація та визначення чутливості мікобактерій до

протитуберкульозних препаратів були проведені у бактеріологічних лабораторіях Одеського протитуберкульозного диспансеру та Одеської обласної клінічної протитуберкульозної лікарні (ООКПТЛ) згідно Наказу МОЗ України № 45 від 06.02.02 [186]. Усі штами, що досліджувалися, на підставі даних бактеріологічних та біохімічних тестів були ідентифіковані як *Mycobacterium tuberculosis*. Дослідження медикаментозної резистентності до рифампіцину та ізоніазиду здійснювалися з використанням методу абсолютних концентрацій на щільному живильному середовищі Левенштейна-Йенсена у відповідності до Наказу [186].

Всі хворі отримували двох етапне протитуберкульозне лікування (інтенсивна фаза та підтримуюче лікування) згідно стандартному режиму хіміотерапії [185]. Стандартна схема лікування хворих 1 категорії клінічного обліку представлена в таблиці 2.1

Таблиця 2.1

Схема лікування протитуберкульозними препаратами хворих на легеневий туберкульоз

Маса тіла до початку лікування (кг)	Інтенсивна фаза: 2 місяці, щоденний прийом препаратів					Підтримуюча фаза: 4 місяці, щоденний прийом препаратів
	Ізоніазид	Рифампіцин	Піразинамід	Етамбутол	Стрептоміцин	Ізоніазид+ Рифампіцин
33-50	0,3 г	0,45 г	1,5 г	0,8 г	0,75 г	Як у початковій фазі
50 та більше	0,3 г	0,6 г	2,0 г	1,2 г	1 г	

Віддалені результати лікування отримані при аналізі карт диспансерного спостереження в Одеському обласному протитуберкульозному диспансері.

Контрольну групу склали 70 здорових осіб, у яких проведені дослідження поліморфізму глутатіонтрансфераз та визначені ЛК спектри конденсату вологи видихуваного повітря.

2.2. Молекулярно-генетичні методи дослідження

Належність штамів до генетичної родини Beijing проводилось методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) за наявності IS6110 інсерції в міжгенній *dnaA* - *dnaD* ділянці [187].

Культури *M. tuberculosis* було отримано від 112 пацієнтів. Виділення ДНК проводилось в бактеріологічній лабораторії ООКПТЛ у наступній послідовності:

1. Розлити в потрібну кількість мікропробірок по 200 мкл води. Петлею перенести колонію мікобактерій із середовища у відповідну мікропробірку, суспендувати вміст.

2. Додати в кожен мікропробірку рівний (200 мкл) обсяг хлороформу, суспендувати на вортексі протягом 30 с.

3. Помістити мікропробірки в мікротермостат та інкубувати при температурі 80°C протягом 20 хв

4. негайно після цього помістити мікропробірки в морозильну камеру на 5 хвилин

5. Витягти з морозильника, центрифугувати при 10000 об/хв протягом 5 хв. Після цього піпеткою перенести супернатант до чистих заздалегідь промаркованих мікропробірок.

Для проведення ПЛР реакції були використані праймери до регіону A1 *dnaA*-*dnaD* ділянки (регіон Af - прямий 5' CGCATCCGTCAGCGCTCCAA та Ag - зворотний 5'GCCAACTCTTGTCGTAGCCGC), виготовлені фірмою "Літех" (Москва).

Суміш для ПЛР містить на кожний досліджуваний зразок:

1. ПЛР- суміш № 2 -blue фірми "Амплісенс", Москва – 10 мкл;
2. прямий та зворотній праймери – по 30 пкмоль кожного;
3. суміш деоксинуклеозид трифосфатів (фірма "Амплісенс") – 2,5 мкл;
4. води особливої чистоти для ПЛР - 3,75 мкл

ПЛР проводилась за наступним температурним режимом: 4 хв – 94⁰ С; 30 циклів - 30 секунд 94⁰ С, 30 секунд – 60⁰ С та 2 хв при 72⁰ С; 7 хв – 72⁰ С (ампліфікатор “Терцик”).

Продукт ампліфікації аналізувався шляхом електрофорезу в 1,5% агарозному гелі. Електрофорез проводився протягом 30-40 хвилин при напрузі 200-220 вольт та силі струму 1,5А. Наявність фрагменту ДНК оцінювався за наявністю світіння при ультрафіолетовому промінні, фіксувався за допомогою відеосистеми.

За наявності інсерції IS6110 у міжгенній *dnaA-dnaN* ділянці розмір ампліфікованого продукту складав приблизно, що вказує на належність збудника до родини Beijing. За відсутності інсерції розмір ампліфікованого фрагменту складає 537 пар нуклеотидів (Рис.2.1). Розмір фрагменту оцінюють, порівнюючи з маркером молекулярної маси. Відсутність світіння на відповідній доріжці свідчить про відсутність ДНК або пригнічення ампліфікації у відповідному зразку.

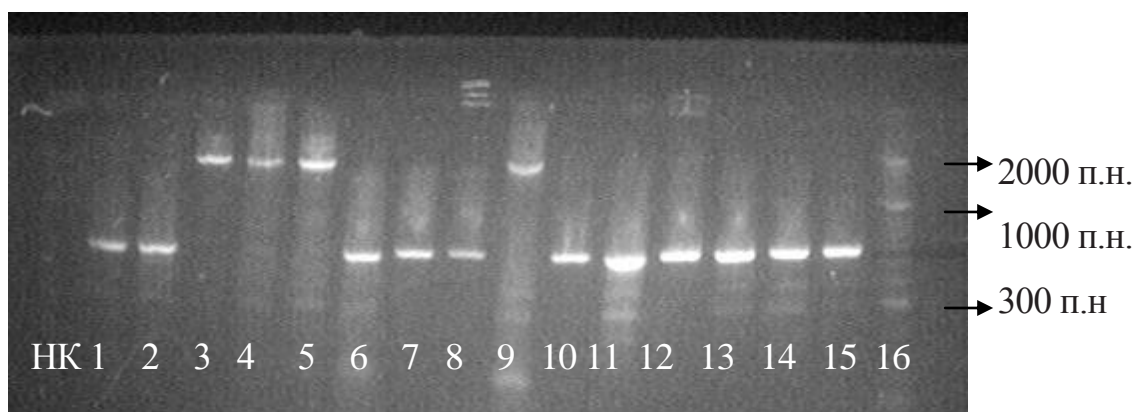


Рис. 2.1 Електрофореграма зразків ДНК *M.tuberculosis*. На 3,4,5 та 9 доріжках ДНК ізолятів належать до родини Beijing. НК – негативний контроль. 16 доріжка – маркер молекулярної ваги. Стрілками вказані розміри яскравіших фрагментів маркера (2000, 1000 та 300 пар нуклеотидів).

На рисунку 2.1 наведено електрофореграму зразків ДНК *M.tuberculosis*, що дозволяє виявити належність збудника до штамів родини Beijing. На 3,4,5 та 9 доріжках розмір ампліфікованого фрагменту – 2000 п.н (Beijing). На інших доріжках розмір ампліфікованого фрагменту біля 500 п.н., що вказує на належність збудника до іншої родини. Остання доріжка – молекулярні

сходинки (яскравішими є смуги, що відповідають розмірам ДНК фрагментів 2000, 1000 та 300 п.н.)

Визначення поліморфізму генів *GSTM1* та *GSTT1* було проведено у 191 хворого на легеневий туберкульоз та 70 студентів віком від 17 до 23 років (контрольна група). Геномну ДНК виділяли з крові хворих за допомогою реагентів комерційного набору "ДНК-сорб-Б" («Амплісенс», Москва) в наступній послідовності:

1. 300 мкл лізуючого розчину змішати на вортексі із 100 мкл крові та прогріти при $t\ 65^0$ протягом 5 хв та центрифугувати 30 сек при 5000 обертів/хв.
2. додати 25 мкл сорбенту, перемішати на вортексі, залишити на 2 хвилини, знову перемішати та після 5 хвилин центрифугувати 1 хв при 5000 обертів/хв.
3. відібрати надосадову рідину, додати 300 мкл розчину №1, змішати на вортексі, центрифугувати 1 хв при 5000 обертів/хв., відібрати надосадову рідину
4. додати 500 мкл розчину №2, змішати на вортексі, центрифугувати 1 хв при 10000 обертів/хв., відібрати надосадову рідину, процедуру повторити
5. висушити сорбент в термостаті при $t\ 65^0$ протягом 10 хв
6. додати до сорбенту 50 мкл ТЕ буферу, змішати на вортексі, висушити в термостаті при $t\ 65^0$ протягом 5 хв, центрифугувати при 12000 обертів/хв

В контрольній групі ДНК виділяли з зіскрібків зі слизової оболонки щоки за допомогою реагентів комерційного набору "ДНК-сорб-А" («Амплісенс», Москва).

Поліморфні ділянки *GSTM1*, *GSTT1* ампліфікували за допомогою мультиплексної ПЛР на ампліфікаторі "Терцик" («ДНК-технологія», Москва) з використанням локус специфічних олігонуклеотидних праймерів («Літех», Москва) згідно протоколу для одночасного аналізу поліморфізму *GSTM1* і *GSTT1* по M. Arand et al.[188]. В якості контрольного фрагменту використаний фрагмент гену альбуміну. Для проведення ПЛР реакції були використані праймери до гену *GSTM1* (прямий 5' GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC та зворотний 5'GTTGGGCTCAAATATACGGTGG), гену *GSTT1* (5' TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC та зворотний 5'TCACCGGATCATGGCCAGCA), гену альбуміну (прямий

5'GCCCTCTGСТААСАAGTCCT

та

зворотний

5'GCCСТААААAGAAAATCGССААТС), виготовлені фірмою “Літех” (Москва).

Суміш для ПЛР містить на кожний досліджуваний зразок:

1. ПЛР- суміш № 2 -blue фірми “Амплісенс”, Москва – 10 мкл;
2. прямий та зворотній праймери до кожного гену – по 30 пкмоль кожного;
3. суміш деоксинуклеозид трифосфатів (фірма “Амплісенс”) – 2,5 мкл;
4. ДНК - 10 мкл

ПЛР проводилась за наступним температурним режимом: 2 хв – 95⁰ С; 30 циклів – 1 хв - 94⁰ С, 1 хв– 64⁰ С та 1 хв при 72⁰ С; 2 хв – 72⁰ С (ампліфікатор “Терцик”).

Аналіз продуктів реакції проводили в 1%-ном агарозному гелі з подальшим забарвленням етидіумбромідом та візуалізацією в ультрафіолетовому світлі.

Розмір ампліфікованого фрагменту склав 480 п.н для *GSTT1*, 215 п.н для *GSTM1*, 350 п.н. для гена альбуміну. Делеції гена відповідає відсутність смуги відповідного розміру (рис. 2.2).

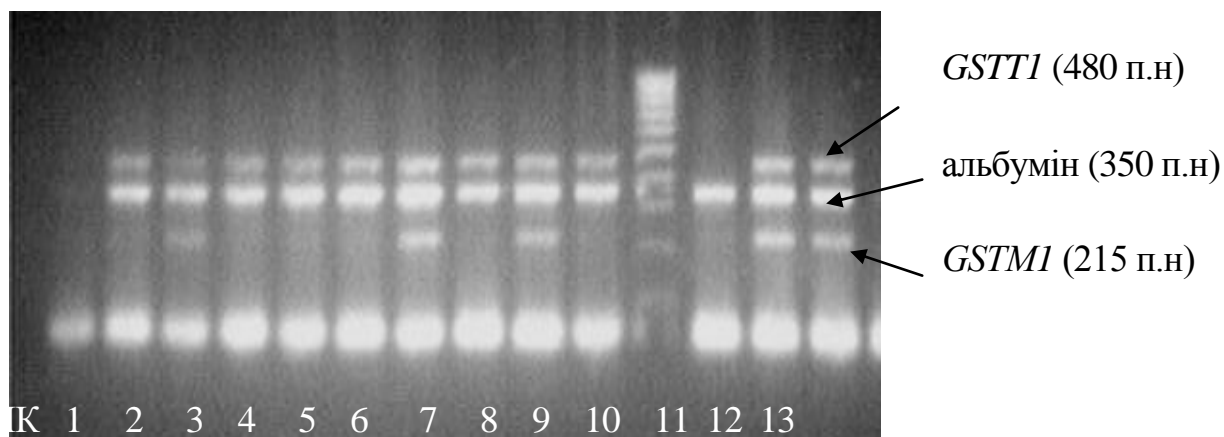


Рис 2. 2 Електрофореграма зразків ДНК людини. НК - контроль. 10 доріжка – маркер молекулярної ваги з кроком 100 п.н. На 2,6,8,12 та 13 доріжках – наявність обох генів. 1,3,4,5,9 доріжки – делеція *GSTM1*, на 11 доріжці – делеція обох генів.

2.3. Біофізичні методи дослідження

Лазерна кореляційна спектроскопія (ЛКС) є біофізичним методом дослідження, який надає інформацію про стан системи гомеостазу за розподіленням у

досліджуваному субстраті часток з різним гідродинамічним радіусом (частки розміром від 1 до 10 000 нанометрів). Він оснований на визначенні спектральних характеристик монохроматичного когерентного випромінювання гелій-неонового лазера внаслідок світлорозсіювання при проходженні через дисперсну систему [165]. Взаємодія випромінювання із світлорозсіювачими частками, які знаходяться у броуновському русі, розширює спектр розсіяного світла пропорційно до швидкості руху часток, яка визначається їх розміром [166]. Таким чином, ЛКС дозволяє реєструвати гідродинамічні розміри часток будь-яких біологічних рідин. Для оцінювання стану місцевого та системного гомеостазу досліджувались плазма крові, сеча та конденсат видихуваного повітря (КВВП) хворих на легеневий туберкульоз.

Кров отримується під час забору периферичної крові з м'якої тканини дистальної фаланги безіменного пальця лівої руки хворого. Піпеткою Панченкова, яка попередньо була промита 4% розчином цитрату натрію, відбирають 100 мкл крові. Потім кров видувають з піпетки в стерильну одноразову пластикову пробірку з 500 мкл фізіологічного розчину. Після змішування крові з розчином пробірку центрифугують протягом 15 хвилин при 1500-3000 обертів/хв. Після центрифугування мікропіпеткою обережно відбирають вільну плазму у пластикові одноразові пробірки типу "Епендорф" об'ємом 1,5 мл і заморожують. Необхідно виключити навіть короткочасне розмерзання плазми за період зберігання або транспортування. Перед виконанням виміру проби розморожують у термостаті при температурі 37⁰ С 30-40 хвилин та центрифугують.

Зразок ранкової сечі в об'ємі 1 мл відливається у центрифужну пробірку та центрифугується протягом 30 хвилин зі швидкістю 3000 об/хв. Надсадову рідину відбирають у пластикові одноразові пробірки типу "Епендорф" об'ємом 1,5 мл та заморожують. Перед виконанням виміру проби розморожують у термостаті при температурі 37⁰ С 30-40 хвилин та центрифугують.

Конденсат вологи видихуваного повітря збирається за допомогою „Пристрою для отримання конденсату що видихується” [189]. Градуйована пробірка

поміщається у 200гр банку з льодом. Хворий після звичайного вдиху видихує повітря через одноразову пластмасову трубочку у пробірку. При цьому водяні пари з видихує мого повітря конденсуються у пробірці. Для ЛКС-досліджень необхідно отримати 1 мл КВВП. Ця кількість КВВП накопичується приблизно за 10 – 15 хвилин. Зібрана волога за допомогою мірної піпетки переміщується в пробірку типу “Епендорф” об’ємом 1,5 мл, яка закривається кришкою. КВВП заморожують в морозильній камері, яка забезпечує $t -18^{\circ} \text{C}$. Не допускається навіть одноразове розмороження біологічної рідини. При необхідності довготривалого транспортування зразків до лабораторії принципово важливою технічною умовою є зберігання їх у добре замороженому стані. Для цього можна використовувати звичайний побутовий термос, пересипаючи пробірки із зразками КВВП льодом і сіллю, після чого герметично закрити кришку. При транспортуванні більш 2-х діб, замість звичайного льоду використовують «сухий лід» (вуглекислота).

Перед безпосереднім вимірюванням в термостаті при температурі $37,0^{\circ}\text{C}$ протягом 30 хвилин розморожується одночасно не більш як 10 зразків КВВП. Пробірки центрифугуються протягом 15 хвилин при 5000 об/хв при кімнатній температурі. Надосадну рідину зразка КВВП відбирають з епендорфа за допомогою дозатора і вносять в кювету ЛК-спектрометра без розведення.

Визначення ЛК-спектрів проводилось за допомогою лазерного кореляційного спектрометра ЛКС-03 «Интокс» (С.-Петербурзький інститут ядерної фізики РАН) (потужність лазера 8 мВт, довжина хвилі випромінювання 0,633 мкм, діапазон розмірів випромінюваних часток від 5 нм до 1×10^3 нм). Спектральні характеристики вимірюються в кількості 1000 нагромаджень при частоті 2000 Гц. Регуляризація спектра проводиться з використанням нелінійної шкали, після чого відповідність спектра тієї чи іншої дискретної семіотичній групі встановлюється за допомогою програми класифікатора, що додається до прибору.

2.4 Статистичні методи дослідження

Статистичний аналіз даних здійснювався із застосуванням персонального

комп'ютера за допомогою програм Microsoft Excel [190] та «Statistica» 6.0. В процесі статистичної обробки обчислювались середнє значення M , стандартна помилка середнього арифметичного m , критерій Стюдента t (коефіцієнта ймовірності). Достовірність відмінностей між групами визначались за допомогою критерію Пірсона χ^2 (критерій відповідності). Аналіз достовірності між відсотковими величинами визначався за допомогою критерію відносного ризику (RR – rates ratio or relative risk), асоційованість одних показників з другими оцінювалась за відношенням шансів (OR – odds ratio). Критичний рівень достовірності нульової статистичної гіпотези (p) приймався рівним 0,05.

Матеріали розділу представлені в наступних наукових працях:

1. Чеснокова М. М. Нові підходи до питань ідентифікації умовно-патогенних коринебактерій та мікобактерій / Ю. І. Бажора, В. В. Ніколаєвський, М. М. Чеснокова // Досягнення біології та медицини. – 2003. – № 1. – С. 45–49.

2. Чеснокова М. М. Методика генотипування збуднику туберкульозу людини (належності *M. tuberculosis* до родини Beijing) : методичні рекомендації МОЗ України / уклад: В. Й. Кресюн, Ю. І. Бажора, О. К. Асмолов, М. М. Чеснокова, О. А. Бабуріна.

3. Визначення належності ізолятів *M.tuberculosis* родини Beijing як критерію несприятливого перебігу туберкульозу : інформ. лист / Одеський державний медичний університет МОЗ України. – К., 2010. – 2 л. – Вип. із пробл. – (Фтизіатрія і пульмонологія).

РОЗДІЛ 3

M.TUBERCULOSIS РОДИНИ BEIJING ТА ПАТОГЕНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ПЕРЕБІГУ ТУБЕРКУЛЬОЗУ ЛЕГЕНІВ

Тривалий час вважалось, що мікобактерії туберкульозу є генетично високо консервативною групою з дуже обмеженим спектром фенотипних відмінностей. До 90х років ХХ сторіччя відмінності між окремими штамми збудника визначались переважно за допомогою фаготипування та характеру медикаментозної резистентності, що суттєво обмежувало можливості епідеміологічних досліджень. Впровадження молекулярно-генетичних технологій виявило значну генетичну різноманітність *M.tuberculosis* представлену делеціями, дуплікаціями, інсерціями та одонуклеотидним поліморфізмом. Генетичні відмінності асоційовані з відмінностями в експресії ряду молекул, що, в свою чергу, впливає на такі аспекти системи «паразит-хазяїн», як імунна відповідь, особливості патогенезу та результат захворювання.

Ступінь кореляції між генотипом штаму та патогенезом захворювання, клінічними проявами і епідеміологічними характеристиками в значній мірі залишається не з'ясованою та є перспективним напрямком сучасних досліджень. З цієї точки зору багато уваги приділяється вивченню штамів родини *M.tuberculosis* Beijing. Значне розповсюдження штамів родини Beijing в різних географічних регіонах та виявлення цього штаму при спалахах туберкульозу з більшою частотою, ніж інших родин, особливо в випадках підвищеної резистентності збудника, дозволяє передбачати, що ці штами мають селективну перевагу у порівнянні з іншими родинами *M.tuberculosis*.

З метою виявлення кореляції між генотипом штаму та клінічними проявами хвороби було проведено визначення належності *M.tuberculosis* до генетичної родини Beijing, та проміжна і віддалена оцінка результатів ефективності лікування в групах хворих, інфікованих збудниками родини Beijing у

порівнянні з хворими, інфікованими збудниками інших генетичних родин.

Культури *M.tuberculosis* для молекулярно-генетичного дослідження було отримано від 110 хворих на легеневий туберкульоз. Належність збудника до родини Beijing було виявлено в ізолятах, отриманих від 33 хворих (30%). Належність ізоляту до інших родин *M.tuberculosis* визначено в 77 випадках (70%).

Частота виявлення цього штаму у хворих варіює в різних регіонах. Розповсюдженість штамів цієї родини є значною у Південно-східній Азії (Китаї, В'єтнамі, Гонконгу, Індонезії, Кореї, Таїланді та Тайвані), складає приблизно 16% в Північній Америці та є низькою в Центральній Європі (4%).[191-197] При дослідженні 2100 ізолятів, отриманих в Російській федерації, штами родини Beijing були знайдені в 45% пацієнтів[198]. В північних регіонах Росії розповсюдженість штамів родини Beijing (Самарська, Архангельська область, Санкт-Петербург) досягає 60% [199,200]. В Україні молекулярно-епідеміологічні дослідження туберкульозу майже не проводились і представлені поодинокими дослідженнями в Південному регіоні (Одеська та Миколаївська області) та в Харківській області. Отримані в Одеському регіоні дані корелюють з частотою розповсюдженості родини Beijing в Харківській області, де у хворих на тяжкі форми туберкульозу збудники Beijing виявляються в 32% і декілька більша, ніж в Миколаївській області (17,5%) [201-203]. Частота виявлення штамів Beijing в Україні, включаючи Одеський регіон, є проміжною між частотою в Південно-східній Азії та Росії. Beijing є однією з принципових генетичних ліній *M.tuberculosis*, яка, найімовірніше, виникла в Південній Азії, звідки поступово розповсюджувалась в інші регіони. Розповсюдження штамів родини Beijing в країнах Європи, Південної Африки, Південної та Північної Америки пов'язують з активною міграцією населення в ХХ сторіччі. Наприклад, в Данії до родини Beijing належало 3,6 % ізолятів, отриманих від хворих емігрантів, і лише 1% від місцевих мешканців (загальна частота – 2, 5%)[204]. В країнах Південної Америки, куди міграція з Південно-східної Азії не є значною, розповсюдженість штамів Beijing низька (19 з 1202 ізолятів, 1,6%). Так, ізоляти родини Beijing були виявлені у хворих з Аргентини (1%), Бразилії (0,8%),

Перу (5,9%), Парагваї (0,6%), і не знайдені при обстеженні хворих з Чилі, Колумбії та Еквадору [205]. Одеса є крупним портом, промисловим та навчальним центром, де активність імміграції населення останні роки зростає, в тому числі з Китаю та інших країн Південно-східної Азії, в яких штами *M.tuberculosis* родини Beijing є домінуючими. Це пояснює відносно високу розповсюдженість в Одеському регіоні цього штаму та створює умови для його подальшого розповсюдження. Якщо прийняти гіпотезу, що вакцина БЦЖ не дає достатньої імунізації проти штамів генетичної родини Beijing, розповсюдження цього штаму може стати серйозною загрозою для майже повністю вакцинованої української популяції [137, 206].

3.1 Характеристика туберкульозного процесу у хворих, від яких отримані ізоляти *M.tuberculosis* генетичної родини Beijing

Проведено аналіз основних соціально-демографічних даних в групі хворих, від яких виділили відповідні ізоляти (табл. 3.1). В досліджуваній групі не виявлено різниці щодо частоти інфікування збудниками родини Beijing в різних вікових групах. Серед чоловіків цей штам виявлявся декілька частіше, ніж серед жінок, але в дослідженні 2003 року в Одеському регіоні, ця різниця була більш значною [201]. За даними літератури, серед чоловіків та жінок частота інфікування штамом Beijing, як правило, не відрізнялись [192,196,197].

Генотип Beijing частіше зустрічався в групі хворих, що є мешканцями міста Одеси ($\chi^2=4,3$, $p=0,03$; $RR=3,89$, CI 1-15,34) у порівнянні з мешканцями Одеської області, що дозволяє розцінювати проживання у місті як один з факторів ризику інфікування даним штамом (OR 4,29, CI 0,96 – 19,14). Значного переважання в розповсюдженості штаму Beijing в певному районі Одеської області не виявилось. Інфікування збудниками родини Beijing спостерігалось серед мешканців Ананьївського (1), Арцизького (2), Біляївського (9), Велико-Михайлівського (1), Іванівського (1), Комінтернівського (3), Красноокнянського (1), Миколаївського (1), Любашовського(1), Овідіопольського (1), Роздільнянського (2), Ренійського (2),

Саратського (2), Татарбунарського (1) районів Одеської області.

Таблиця 3.1.

Соціально-демографічні дані пацієнтів, від яких отримано ізоляти *M.tuberculosis*

Соціально-демографічні групи хворих (n=110)	Beijing n=33(30%)		Інший n=77		RR 95 % CI
	Абс. Кількість	%	Абс. Кількість	%	
Стать					
чоловіки n=90 (81,8%)	28	84,8%	62	80,5%	1,05 (0,88 - 1,26)
жінки n=20(18,2%)	5	15,2%	15	19,5%	0,77 (0,31 - 1,96)
Вік					
18 – 30 років n=20 (9,1%)	5	15,1%	15	19,5%	0,77 (0,31 - 1,96)
31 – 60 років n=83 (75,5%)	25	75,8%	58	75,3%	1,01 (0,80 - 1,27)
61 – 65 років n=7 (6,4%)	3	9,1%	4	5,2%	1,75 (0,41–7,39)
Мешкання					
БОМЖ n=2 (1,8%)	-		2	2,6%	
м.Одеса n=8 (7,3%)	5	15,2%*	3	3,9%	3,89 (1,0 - 15,34)
Одеська область n=100 (90,9%)	28	84,8%	72	93,5%	0,91 (0,78 - 1,06)
Контактні зі хворими на туберкульоз 47/96 (49%)	14/25	56%	33 /71	46,4%	1,2 (0,79-1,85)
Особи, що перебували в місцях позбавлення волі n=27 (24,3%)	9	27,2%	18	23%	1,17 (0,59 - 2,32)
Особи, що зловживають наркотиками n= 16 (14,5%)	8	24,2%	8	10,4%	2,33 (0,96-5,69)
Особи, що зловживають алкоголем n= 27 (24,5%)	5	15,2%	22	28,6%	0,53 (0,22-1,28)
ВІЛ- інфіковані особи n= 15 (13,6%)	5	15,1%	10	12,9%	1,17 (0,43-3,15)

Примітка. *різниця достовірна (p <0,05)

Аналіз частоти інфікування штамми родини Beijing в вікових групах 18 –

30 років, 30 – 60 років та старше 60 років не виявив різниці в частоті виявлення цього штаму. Отримані результати збігаються з даними досліджень проведених в Таїланді, Індонезії, Гонконгу, Данії, Естонії, включаючи ретроспективні дослідження (Іспанія) [192-194,196,204,207-209].

Проведене в Китаї дослідження біоптатів легенів, отриманих після пневмоектомії, не виявило розбіжностей в частоті зустрічальності штаму Beijing, починаючи з 1956 року, у порівнянні з сучасними зразками [210]. І все ж таки, у деяких дослідженнях знайдене збільшення пропорції випадків туберкульозу, що обумовлені штамми групи Beijing та інфікування штамми групи Beijing контингенту хворих переважно молодого віку. Так, дослідження у В'єтнамі виявили інфікування штамом Beijing 71% хворих до 25 річного віку і тільки 41 % хворих старше 55 років [193]. В Кейптауні відсоток дітей, інфікованих штамми родини підвищився з 13% до 33% за період з 2000 до 2003 року, а дослідження архівних зразків виявило відсутність штамів Beijing за період 1930 – 1965 рр, 2,8% - за період 1966 – 1995 рр, та 20% - за період 1996 – 2005 роки [211].

Якщо формування генетичної родини Beijing географічно пов'язано з територією Китаю та прилеглих регіонів, можна припустити, що частота цього штаму за тривалий період його циркуляції стала стабільною, а на територіях, куди цей штам був завезений у відносно недавні часи, відбувається активна експансія цієї родини. Швидке збільшення частоти виявлення штаму за короткий період може бути асоційовано з активною трансмісією збудника від окремих хворих. Так, зростання виділення штаму Beijing на острові Гран-Канарія з 0% (0/85) в 1991 році до 23% (9/40) пов'язано зі спалахом захворювання від хворого на туберкульоз гортані з асоціальною поведінкою [212]. Дослідження, проведені нами в Одеському регіоні в 2005 та 2006 році не виявило статистично достовірних розбіжностей в частоті виділення штамів цієї родини у порівнянні з 2003 – 2004 рр (39,6%)[203], але відносно висока частота виявлення штамів генотипу Beijing та сприятливі умови для його розповсюдження потребують постійного моніторингу молекулярно-

епідеміологічної ситуації.

Частота виявлення збудників генотипу Beijing в різних соціально-демографічних групах хворих представлена в таблиці 3.2

Таблиця 3.2

Частота інфікування збудником родини Beijing в різних соціально-демографічних групах хворих

Категорія хворих	% (абс.)	Категорія хворих	% (абс.)	RR (95% CI)
Чоловіки	31% (28/90)	Жінки	25% (5/20)	1,24 (0,55 – 2,82)
Особи, що перебували в місцях позбавлення волі	33,3% (9/27)	Особи, що не перебували в місцях позбавлення волі	21,6% (24/83)	1,49 (0,78 – 3,01)
Мешканці м.Одеси	62,5% (5/8)	Мешканці Одеської області	28% * (28/100)	2,23 (1,20 – 4,16)
Контактні із хворими на туберкульоз	29,8% (14/47)	Відсутність контакту із хворими на туберкульоз	22,4% (11/49)	1,32 (0,67 – 2,62)
Наркозалежні особи	56,3% (9/16)	Особи, які не вживають наркотики	32%* (25/94)	1,9 (1,04 – 3,41)
Особи, які зловживають алкоголем	18,5% (5/27)	Особи, що не зловживають алкоголем	38,5% (28/73)	2,07 (0,89 – 4,81)
Особи, що курять	31,7% (26/82)	Особи, що не курять	25% (7/28)	1,27 (0,62 – 2,59)
ВІЛ-інфіковані	33,3% (5/15)	Не інфіковані ВІЛ	29,4% (28/95)	1,1 (0,52 – 2,47)

Примітка. *різниця достовірна ($p < 0,05$)

Інфікування штамми генотипом Beijing частіше спостерігалось у наркозалежних (OR 2,76, CI 0,94 – 8,14). Не виявилось значної різниці між частотою інфікування *M.tuberculosis* родини Beijing у порівнянні з іншими генетичними родинками в групах хворих, що є ВІЛ-інфікованими. За даними дослідження, проведеного у В'єтнамі, генотип Beijing був статистично значимо асоційований з ВІЛ статусом у хворих на туберкульозний менінгіт, але це

спостереження є єдиним і може віддзеркалювати унікальну для туберкульозного менінгіту ситуацію[213]. Серед хворих, що перебували в місцях позбавлення волі частота інфікування штамми *M.tuberculosis* родини Beijing декілька вища. У ряді досліджень, проведених в Росії та Азербайджані, асоціація між перебуванням у місцях позбавлення волі та підвищенням ризику інфікування штамми Beijing є суттєво більшою[214-216].

Характеристика туберкульозного процесу при інфікуванні збудником родини Beijing та інших родин *M.tuberculosis* представлена в таблиці 3.3.

Таблиця 3.3

Характеристика туберкульозного процесу у хворих, інфікованих збудником родини Beijing та інших родин *M.tuberculosis*

Характер перебігу захворювання	Всього n=110	Beijing n=33		Інший n=77		RR 95 % CI
		Абс. Кількіс	%	Абс. Кількість	%	
1	2	3	4	5	6	7
Тип туберкульозного процесу						
ВДТБ	87 (79,1%)	23	69,7%	64	83,1%	0,8 (0,66– 1,07)
Раніше не ефективно ліковані, з яких	23 (20,9%)	10	30,3%	13	16,9%	1,8 (0,9 – 3,67)
- РТБ	8 (7,3%)	4	12,1%	4	5,2 %	2,33 (0,62– 8,77)
- ХТБ	15 (13,6%)	6	18,2%	9	11,7%	1,6 (0,60 – 4,0)
Клінічні форми						
Дисемінований	63 (57,2%)	19	57,6%	44	57,1%	1,0 (0,7 – 1,4)
Інфільтративний	39 (35,5%)	9	27,3%	30	39 %	0,7 (0,38– 1,70)
Фіброзно-кавернозний	6 (5,5%)	4	12,1%	2	2,6%	4,7 (0,90-24,40)
Інші	2(1,8%)	1 ¹	3%	1 ²	1,3%	
Наявність деструкції						
Наявність	83 (75,5%)	28	84,8%	65	84,4%	1,0 (0,85– 1,20)
Відсутність	17 (15,5%)	5	15,2%	12	15,6%	

Продовження таблиці 3.3

1	2	3	4	5	6	7
Поширеність процесу						
1 легеня	25 (22,7%)	8	24,2%	17	22,1%	1,1 (0,50– 2,20)
2 легені	85 (77,3%)	25	75,8%	60	77,9%	

Примітки: 1. 1 – вогнищевий туберкульоз;
2. 2 – казеозна пневмонія

Більша частина хворих ($n = 87$), від яких були досліджені ізоляти *M.tuberculosis* – хворі з вперше діагностованим легеневим туберкульозом (ВДТБ). Всі вони були віднесені до 1 клінічної категорії обліку (хворі на вперше діагностований туберкульоз легенів з бактеріовиділенням, а також хворі на вперше діагностований туберкульоз з поширеними та тяжкими формами легеневого чи позалегеневого туберкульозу незалежно від бактеріовиділення). Частота інфікування штамми родини Beijing в цій групі склала 26,4% (23/87), належність збудника до інших генетичних родин знайдена в 73,6% (64/87).

Частина хворих раніше лікувалась неефективно ($n=23$). Вісім з них віднесені до 2 клінічної категорії обліку (з рецидивом туберкульозу, вперше виявлені з неефективним лікуванням, а також хворі, що перервали прийом протитуберкульозних препаратів більш ніж на два місяці), 15 хворих віднесені до 4 категорії обліку (хворі на хронічний туберкульоз, у яких після завершення повного повторного курсу терапії через два роки процес залишився активним). В групі хворих, що неефективно лікувались раніше частота інфікування штамми родини Beijing склала 43,5% (10/23), належність збудника до інших генетичних родин знайдена в 56,5% (13/23) (Рис 3.1)

Серед хворих с РТБ інфікування штамми родини Beijing виявлено у 50% хворих, с ХТБ – в 40% хворих. Таким чином, частота інфікування штамом Beijing в групі з ВДТБ виявилась меншою (26,4%), ніж в групі хворих, що неефективно лікувались раніше (43,5% ; RR 1,6 CI 0,92 – 2,95).

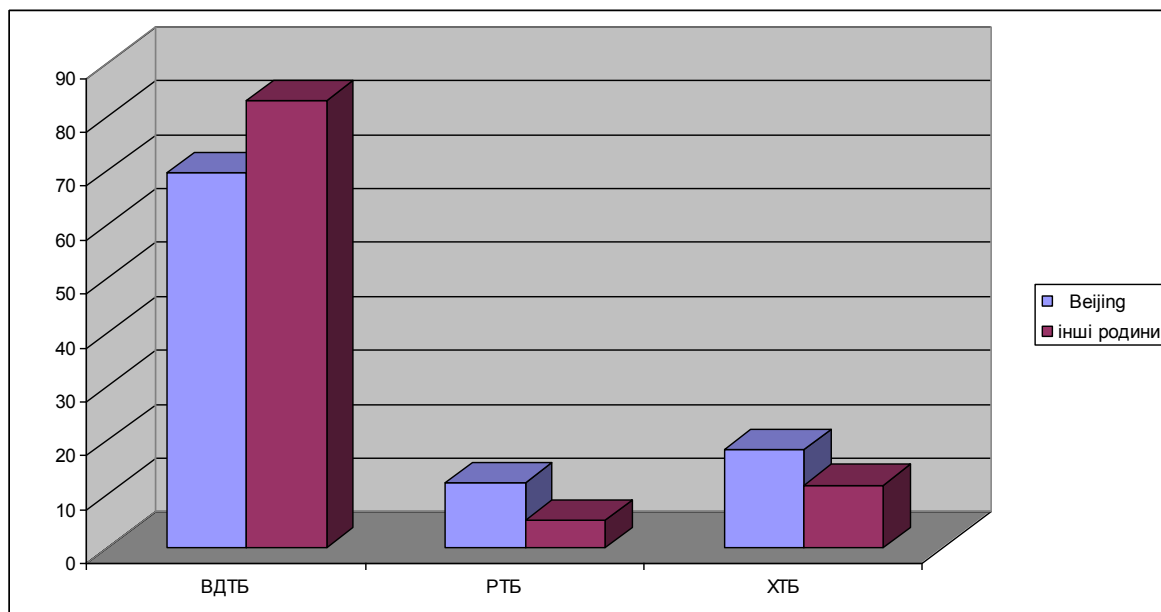


Рис 3.1 Частота виявлення збудників родини Beijing та інших генетичних родин в співвідношенні із формою туберкульозного процесу

У хворих досліджуваної групи спостерігались клінічні форми туберкульозу: дисемінована (57,2%), інфільтративна (35,5%), фіброзно-кавернозна (5,5%), вогнищева (0,9%), казеозна пневмонія (0,9%). Розподіл хворих за формами туберкульозного процесу представлений на рисунку 3.2.

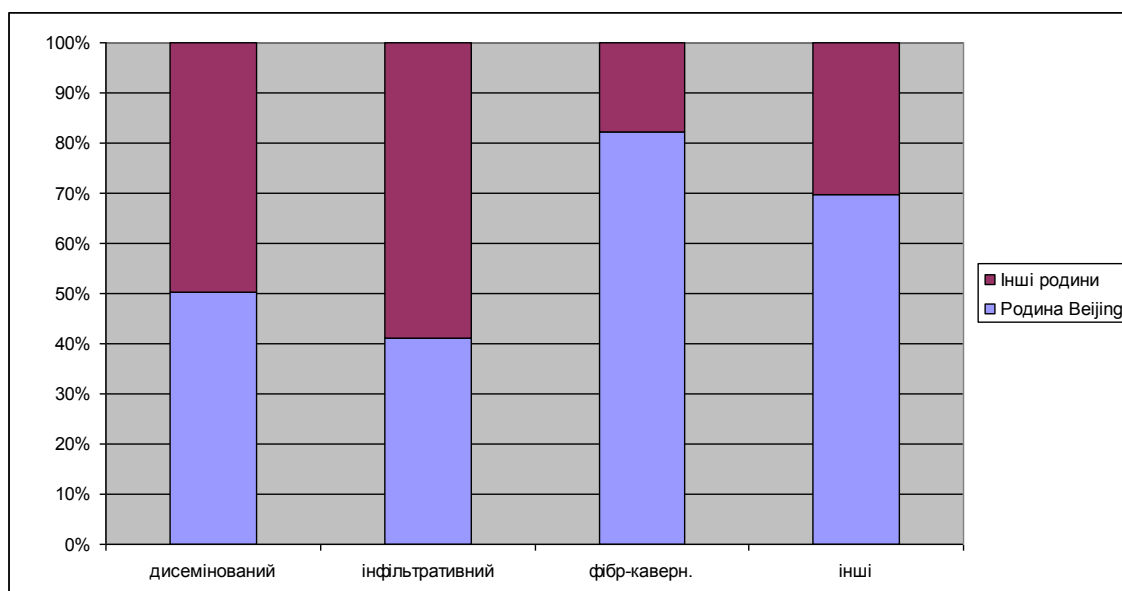


Рис 3.2 Розподіл хворих за формами туберкульозного процесу

Асоціації між інфікуванням *M.tuberculosis* родини Beijing та розвитком певної клінічної форми туберкульозу не знайдено. Підвищеною виявилась лише частота

виявлення штамів родини Beijing у хворих з фіброзно-кавернозною формою туберкульозу. Фіброзно-кавернозний туберкульоз характеризується наявністю фіброзної каверни, розвитком фіброзних змін у легеневій тканині, що оточує каверну, вогнищ бронхогенного відсіву різної давнини як навколо каверни, так і в протилежній легені, постійним або періодичним бактеріовиділенням, хронічним, хвилеподібним, як правило, прогресуючим перебігом. Він є наслідком довготривалого перебігу процесу та формується внаслідок прогресування будь-якої форми туберкульозу при зниженій схильності до рубцювання каверни [217]. Нездатність штамів Beijing обумовити ефективну Th-1 імунну відповідь знижує ефективність утворення гранульом, та сприяє розмноженню бактерій і хронізації інфекції, що може пояснити суттєве переважання цієї генетичної родини в хворих з фіброзно-кавернозним туберкульозом. Туберкульозна гранульома за патогенезом є імунною гранульомаю. Вона формується при умові неможливості повної елімінації внутрішньоклітинного патогену чи його складових частин. Запальний процес починається з ушкодження тканин з подальшим некрозом казеозного характеру. До вогнища запалення мігрують нейтрофіли, макрофаги, лімфоцити. Внаслідок злиття інфікованих макрофагів утворюються гігантські багатоядерні клітини Пірогова-Лангханса, вони оточені великими макрофагами – епітеліоїдними клітинами, на периферії – Т-клітини, більшість яких належить до Т-хелперів (CD4+). Утворення продуктивної гранульоми обмежує розповсюдження МБТ та запобігає їх розмноженню. В утворенні гранульоми ключову роль відіграють цитокіни, що продукуються макрофагами та лімфоцитами, зокрема TNF- α [8, 218]. У нокаут мишей *TNF- α* -/- показано, що при інфікуванні *M.tuberculosis* гранульоми не утворюються чи значно дезорганізована за структурою. При введенні мишам з хронічною туберкульозною інфекцією антитіл до TNF- α вже існуючі гранульоми розсмоктувались, а дослідні тварини гинули, що підтверджує роль TNF- α в підтриманні структури гранульоми [8]. Оскільки інфікування збудниками родини Beijing супроводжується зниженою, у порівнянні з іншими штамми, продукцією TNF- α [219,220], це може пояснити прогресування процесу у легенях з формуванням фіброзно-кавернозного туберкульозу. Перспективним напрямком

досліджень може стати вивчення генетичних особливостей збудника саме в групі хворих на фіброзно-кавернозний туберкульоз.

Статистичний аналіз не виявив зв'язку між поширеністю туберкульозного процесу, наявністю або відсутністю деструктивних процесів в легенях та належністю виділеного збудника до родини Beijing або інших генетичних родин. Отримані дані відповідають даним інших досліджень, в яких не виявлено різниці в рентгенологічній картині легеневих змін у хворих, інфікованих штамми родини Beijing та інших родин [221,222].

В обстеженій нами групі хворих позалегеневої туберкульоз (туберкульоз поза грудною порожниною) зустрічався тільки серед хворих, інфікованих збудниками родини Beijing (3/33, 9,1% в порівнянні з 0/77), проте це питання вимагає подальшого вивчення у зв'язку з малим числом хворих. В проведеному в Арканзасі (США) дослідженні позалегеневої туберкульоз втричі частіше спостерігався в групі хворих, інфікованих збудниками Beijing [223]. Розвиток позалегенового туберкульозу також може бути пов'язаним із здатністю мікобактерій родини Beijing уникати ефективної імунної відповіді у легенях, зокрема зниженою продукцією TNF- α . Так, серед хворих на ревматоїдний артрит та хворобу Крона, які отримували антитіла до TNF- α , спостерігалась підвищена захворюваність на туберкульоз з високим рівнем дисемінованого та позалегенового туберкульозу [224].

Одним з факторів, з яким пов'язують небезпеку розповсюдження штамів Beijing, є його підвищена медикаментозна резистентність, але дані стосовно резистентності до препаратів першого ряду значно варіюють у різних регіонах. Згідно епідеміологічному аналізу, проведеному ВООЗ [225], який включав результати 49 досліджень (більш 29000 пацієнтів з 35 країн миру), штамми родини Beijing представлені чотирма основними паттернами: 1) ендемічні, не асоційовані з медикаментозною резистентністю (високий рівень в більшості країн Східної Азії, низький – в США); 2) епідемічні, асоційовані з медикаментозною стійкістю (високий рівень в колишніх країнах Радянського Союзу, Кубі, В'єтнамі, Південній Африці, низький рівень – в деяких регіонах Західної Європи); 3) епідемічні, але чутливі до протитуберкульозних препаратів

(Малайї); 4) дуже низький рівень розповсюдженості або відсутність (деякі країни Європи та Африки). Для збудників генотипу Beijing в ряді досліджень виявлена підвищена частота виявлення мутацій *rpoB* (ген β -субодиниці ДНК-залежної РНК полімерази, стійкість до рифампіцину), *katG* (ген каталази пероксидази, стійкість до ізоніазиду), *inh A* (синтез міколової кислоти, стійкість до ізоніазиду) [226-229]. Для пояснення підвищеної частоти медикаментозної резистентності була запропонована гіпотеза про підвищену здатність до мутацій у штамів родини Beijing [230], але подальші дослідження показали, що множинна резистентність штамів цієї родини не пов'язана з зміненою здатністю до мутацій розвитку медикаментозної стійкості у порівнянні зі збудниками інших генетичних родин [231]. Підвищена мультирезистентність виявлена в певних генетичних субпопуляціях в середині родини Beijing [232]. За наявності інсерції IS6110 в регіоні NTF штами Beijing поділяють на «сучасні» (мають інсерцію) та «анцестральні» або вихідні (не мають інсерції). Резистентність до рифампіцину, піразинаміду та мультирезистентність частіше асоційована з анцестральними штамми, у той час як резистентність до ізоніазиду та стрептоміцину між сучасним та анцестральними лініями майже не відрізняється, чи, навіть зворотна [233].

З метою вивчення медикаментозної резистентності штамів родини Beijing, отриманих в Одеському регіоні чутливість до препаратів першого ряду була визначена бактеріологічним методом абсолютних концентрацій в ізолятах, отриманих від 108 хворих.

26,9 % ізолятів зберегли чутливість до всіх препаратів першого ряду. Медикаментозна стійкість в досліджуваній групі склала до ізоніазиду (H) – 40,7%; до рифампіцину (R) – 55,6%; піразинаміду (Z) – 45,4%; стрептоміцину (S) – 62,0%; етамбутолу (E) – 32,4%. Резистентність більш, ніж до одного препарату спостерігалась в 68,5%, у тому разі мультирезистентність (одночасна резистентність до рифампіцину та ізоніазиду) – в 31,5%. Одночасна резистентність до всіх протитуберкульозних препаратів першого ряду спостерігалась в 13,9 %.

Дані по асоціації між генотипом штаму мікобактерій та його лікарською стійкістю наведені в таблиці 3.4

Таблиця 3.4

Асоціація між генотипом штаму мікобактерій та його медикаментозною резистентністю

Медикаментозна резистентність	% резистентних штамів	Beijing (n =33)		Інший генотип		RR 95% CI
		Абс. кількість	%	Абс. кількість	%	
1	2	3	4	5	6	7
Чутливість до всіх препаратів I ^o ряду	26,9%	10	30,3%	20	26,8%	1,1(0,60-2,15)
S (1944)	62,0%	18	54,5%	48	64,0%	0,8 (0,60-1,22)
H (1952)	40,7%	15	45,5%	28	37,3%	1,3 (0,76-1,96)
E (1960i)	32,4%	13	39,4%	22	29%	1,3 (0,77-2,33)
R (1970i)	55,6%	16	48,5%	44	58,7%	0,8 (0,55-1,23)
Z (1980i)	45,4%	14	42,4%	34	45,3%	0,9 (0,59-1,50)
Мульти резистентність	31,5%	11	33,3%	22	29,3%	1,1 (0,63-2,06)
Резистентність 1 препарат	4,6%	3	9,1%	2	2,6%	3,4(0,60 -19,46)
S		1		1		
Z		2		-		
E		-		1		
2 препарати	13,9%	5	15,2%	10	13,3%	1,1(0,42 – 3,07)
HS		3		2		
HE		1		1		
HR		-		2		
RE		1		1		
RS		-		3		
RZ		-		1		
3 препарати	28,7%	5	15,2%	26	34,7%	0,4 (0,18-1,04)
HRS		-		6		
HRZ		1		-		
HZS		-		1		
HSE		-		1		
RSE		1		2		
RZS		2		13		
ZSE		1		3		

Продовження таблиці 3.4						
1	2	3	4	5	6	7
4 препарати	12,0%	3	9,1%	9	12,0%	0,7 (0,22-2,62)
HRSE		2		1		
HRSZ		1		4		
HRZE		-		1		
HSZE		-		1		
RZSE		-		2		
всі препарати I ^{го} ряду	13,9%	7	21,2%	8	10,6%	1,9 (0,79-5,03)

Примітки: S – стрептоміцин;

H – ізоніазид;

E – етамбутол;

R – рифампіцин;

Z – піразинамід.

У дужках вказані роки впровадження у клінічну практику

Підвищена резистентність до ізоніазиду та етамбутолу виявилась серед ізолятів генотипу Beijing, в той час як резистентність до стрептоміцину і рифампіцину виявилась більшою серед ізолятів іншого генотипу. Але рівень мультирезистентності, і, особливо, резистентності до всіх препаратів першого ряду був підвищеним серед збудників родини Beijing (21,2%). При аналізі первинної резистентності (ізоляти від хворих з ВДТБ, які отримували специфічне лікування менш ніж чотири тижні) та вторинної резистентності (ізоляти від хворих з РТБ, ХТБ та ВДТБ, які отримували протитуберкульозне лікування протягом більше, ніж 4 тижні), ця тенденція виявилась значнішою (табл.3.5).

Первинна резистентність до проти туберкульозних препаратів I^{го} ряду достовірно не відрізняється між ізолятами родини Beijing та інших генетичних родин, включаючи мульти- та полірезистентність. Ізоляти, виділені від хворих, що лікувались раніше, характеризувались переважанням одночасної резистентності до 4 або 5 протитуберкульозних препаратів першого ряду, в той час як серед ізолятів інших генетичних родин переважала одночасна резистентність до 2 або 3 протитуберкульозних препаратів.

Таблиця 3.5

Первинна та вторинна резистентність *M.tuberculosis* родини Beijing та інших генетичних родин

Проти туберкульозні препарати 1го ряду	Первинна резистентність			Вторинна резистентність		
	n = 71	Beijing (n =19)	Інший генотип (n =52)	n = 37	Beijing (n =14)	Інший генотип (n =23)
Ізоніазид (H)	24 (33,8%)	6 (31,6 %)	18 (34,6%)	19 ¹ (51,4%)	9 ¹ (64,3%)	10 (43,5%)
Рифампіцин (R)	36 (50,7%)	8 (42,1%)	28 (53,8%)	24 ¹ (64,9%)	8 (57,1%)	16 (69,6%)
Піразинамід (Z)	29 (40,8%)	8 (42,1%)	21 (40,4%)	18 (48,7%)	6 (42,9%)	12 (52,2%)
Стрептоміцин (S)	42 (59,1%)	10 (52,6%)	32 (61,5%)	23 (62,1%)	8 (57,1%)	15 (65,2%)
Етамбутол (E)	18 (25,4%)	7 (36,8%)	11 (21,2%)	16 ¹ (43,3%)	6 (42,9%)	10 (43,5%)
Мультирезистентність	17 (23,9%)	4 (21,1%)	13 (25,0%)	17 ¹ (46,0%)	8 ¹ (57,5%)	9 (39,1%)
Чутливість до всіх препаратів	21 (29,6%)	5 (26,3 %)	16 (30,8%)	10 (27,0%)	5 (35,7%)	5 (21,7 %)
Резистентність 1 препарат	4 (5,6%)	3 (15,8%)	1 (1,9%)	-	-	-
2 препарати	11 (15,4%)	3 (15,8%)	8 (15,4%)	4 (10,8%)	1 (7,2%)	3 (13,0%)
3 препарати	22 (31,0%)	4 (21,0%)	18 (34,6%)	10 (27,0%)	2 (14,2 %)	8 (34,9%)
4 препарати	8 (11,3%)	2 (10,4%)	6 (11,5%)	4 (10,8%)	1 (7,2%)	3 (13,0%)
всі препарати 1го ряду	5 (7,1%)	2 (10,4%)	3 (5,8%)	9 ¹ (24,4%)	5 ¹ (35,7%)	4 (17,4%)

Примітка. 1 – різниця між первинною та вторинною резистентністю в відповідній групі статистично достовірна ($p < 0,05$)

Суттєвим виявилось переважання вторинної мультирезистентності (57,5% проти 39,1%) та вторинної резистентності до всіх препаратів 1го ряду (35,7% проти 17,4%) серед ізолятів родини Beijing.

Одним з факторів, якими можливо пояснити підвищену резистентність штамів Beijing є їх краща здатність до виживання в умовах формування гранульоми. На

фоні двоетапної хіміотерапії туберкульозу (інтенсивна хіміотерапія для запобігання росту бактеріальної популяції та менш інтенсивна хіміотерапія для впливу на бактеріальну популяцію, що залишилась), медикаментозна резистентність формується шляхом селекції та адаптації. В середині туберкульозної каверни розмір бактеріальної популяції складає 10^8 - 10^{11} , в багато чисельній бактеріальній популяції завжди зустрічаються мало чисельні стійкі мутанти [234]. При підвищеному виживанні мікобактерій родини Beijing в умовах формування каверни створюються кращі умови для селекції резистентних мікобактерій з формуванням вторинної резистентності. Серед факторів виживання – поліморфізм за геном *mutT2*, що належить до суперродини Nudix гідролаз. Nudix гідролази - представники суперродини ферментів, які гідролізують широкий спектр органічних пірофосфатів (нуклеозид ді- та трифосфати, кеп РНК тощо). MutT (NudA) здатний до розщеплення потенційно мутагенних окислених нуклеотидів, які утворюються внаслідок дії реактивних форм кисню [235]. Штами W-Beijing характеризуються специфічною для них міссенс мутацією (G58R), яка обумовлює нестабільність протеїну, із зниженням антимутагенної дії, впливає на загальне сповільнення метаболічних процесів мікобактерії в умовах нестачі необхідних поживних речовин [236]. Це свідчить, що однонуклеотидні поліморфізми (SNPs) здатні обумовити селективні переваги мікроорганізму. У штамів Beijing знайдений 41 специфічний SNP, у тому разі в генах, що приймають участь в процесах реплікації, репарації та рекомбінації та мають потенційний вплив на еволюцію та адаптацію представників цієї генетичної лінії [237]. Підвищений рівень мультирезистентності та резистентності до всіх препаратів першого ряду серед ізолятів родини Beijing є одним з факторів небезпеки штамів цієї генетичної родини. З іншої сторони, частота високої, середньої та низької життєздатності мікобактерій і цитотоксичності в дослідженні на мишах, проведеному в Санкт-Петербурзькому НДІ фтизіатрії та пульмонології, достовірно не відрізнялась у чутливих та стійких штамів, але залежила від генотипу збудника. Максимальна загибель інфікованих макрофагів спостерігалась при інфікуванні штамом Beijing B0, найменша - при інфікуванні штамом LAM при приблизно однаковій частоті резистентності [227].

Виявлено кореляцію кількості лімфоцитів в периферичній крові хворих з генетичною належністю клінічних ізолятів, однак подібної залежності між чутливими та резистентними штамми виявлено не було [227]. Таким чином, підвищена цитотоксичність штамів Beijing не може бути пояснена тільки підвищеною частотою мультирезистентності мікобактерій.

3.2. Результати лікування хворих на вперше діагностований туберкульоз легень в залежності від генотипу виділених від них *M.tuberculosis*.

Середня тривалість перебування в стаціонарі хворих з ВДТБ (n = 87) склала $137,6 \pm 26,4$ днів. Умерло від туберкульозу за період стаціонарного лікування 6 (6,9%) хворих, вилікування спостерігалось в 1 (1,1%) випадку, 33 (38%) хворі перервали лікування, 47 (54%) хворих були виписані для продовження лікування амбулаторно. Всі пацієнти отримували протитуберкульозне лікування згідно стандартному режиму хіміотерапії для хворих з вперше діагностованим туберкульозом [185].

Як критерії ефективності лікування туберкульозу на стаціонарному етапі (проміжна оцінка результатів лікування) згідно стандартам діагностики та лікування туберкульозу враховувались: 1) стійке припинення бактеріовиділення, підтверджене мікроскопічним та культуральним дослідженням; 2) загоєння каверн в легенях та розсмоктування (або ущільнення) інфільтрації та вогнищ. Проміжна оцінка ефективності лікування проводилась після завершення стаціонарного лікування (у разі незавершеного основного курсу хіміотерапії) лише у хворих, в яких інтенсивна фаза протитуберкульозного лікування тривала не менше ніж 2 місяці відповідно стандартному режиму хіміотерапії.

Критерії проміжної оцінки ефективності лікування [238]:

- вилікування;
- значне покращання (повне зникнення клінічних проявів хвороби – кашлю, харкотиння, нормалізація температури тіла, показників крові,

припинення бактеріовиділення, загоєння каверн);

- покращання (повне зникнення клінічних проявів хвороби, припинення бактеріовиділення при недостатній рентгенологічній динаміці, зменшення розмірів каверн, витончення їх стінок, загоєння частини каверн, повне або часткове розсмоктування інфільтрації і вогнищ дисемінації);

- часткове покращання – зменшення клінічних проявів хвороби, зменшення масивності бактеріовиділення, часткове розсмоктування інфільтративних і вогнищевих змін, часткова регресія каверн);

- стан без змін;

- погіршення;

- смерть.

Середня тривалість перебування в стаціонарі хворих з вперше виявленим легеневим туберкульозом, інфікованих збудником родини Beijing (n = 23), склала (139,9±69,6) днів. 21 (91,3%) хворий був віднесений до першої категорії клінічного обліку, 2 (8,7%) хворих – до 2 категорії. Серед хворих з ВДТБ, інфікованих збудниками родини Beijing, переважала дисемінована форма туберкульозу (60,9%) (RR 2,0 CI 1,0 – 4,03; $\chi^2=4,2$ p=0,03), у порівнянні з інфільтративною (30,5%), фіброзно-кавернозний туберкульоз та вогнищевий туберкульоз – по 1 випадку (4,3%) (табл. 3.6).

В більшості випадків хвороба виявлена у фазі інфільтрації (82,6%), яка супроводжувалась обсіменінням чи розсмоктуванням; 3 хворих виявлено на фазі обсіменіння та розпаду (13,0%), 1 (4,4%) – розпаду. В цілому при рентгенологічному дослідженні легенів на початку лікування ознаки розпаду було виявлено у 18 хворих (78,3%). У трьох (13,0%) хворих легеневий туберкульоз супроводжувався позалегеновим туберкульозом (туберкульоз поза грудною порожниною: туберкульоз гортані – два випадки, туберкульозний менінгоенцефаліт – 1 випадок)

Середня тривалість перебування в стаціонарі хворих з вперше виявленим легеневим туберкульозом, інфікованих збудниками інших генетичних родини (n = 64), склала (134,3±53,4) днів. 58 (90,6%) хворих були віднесені до першої

категорії клінічного обліку, 6 (9,4%) хворих – до 2 категорії. Характеристика туберкульозного процесу на початку захворювання майже не відрізнялась в обох групах хворих. Але серед хворих з ВДТБ, інфікованих збудниками інших генетичних родин, інфільтративна форма туберкульозу (53,1%) спостерігалась декілька частіше, ніж дисемінована (43,7%). Позалегеновий туберкульоз в цій групі хворих не спостерігався.

Таблиця 3.6

Особливості перебігу туберкульозного процесу на етапі стаціонарного лікування при інфікуванні збудниками родини Beijing та інших генетичних родин

Характеристика туберкульозного процесу	Beijing (n = 23)	Інший генотип (n = 64)	RR 95% CI
Форма туберкульозного процесу			
дисемінований	14 (60,9%)	34 (53,1%)	1,1 (0,77-1,77)
інфільтративний	7 (30,5%)	28 (43,7%)	0,7 (0,35-1,37)
фіброзно-кавернозний	1 (4,3%)	1 (1,6%)	2,7 (0,18- 42,7)
Фаза туберкульозного процесу			
- інфільтрації	19 (82,6%)	42 (65,5%)	1,2 (0,97-1,63)
- обсіменіння	3 (13%)	19 (29,7%)	0,4 (0,14-1,35)
- розпаду	1 (4,4%)	3 (4,7%)	0,9 (0,10-8,48)
- розпаду	18 (78,3%)	53 (82,8%)	0,9 (0,74-1,20)
Наявність деструкції			
Позалегеновий туберкульоз	3 (13,0%)	-	

Серед хворих, інфікованих збудниками Beijing, навпаки, значно переважала дисемінована форма туберкульозного процесу (60,9% проти 30,5%, RR 2,0 CI 1,0 – 4,03; $\chi^2=4,29$ p=0,03). Дисемінований туберкульоз легень (ДТЛ) характеризується наявністю великої кількості специфічних вогнищ у легенях: на початку захворювання виникає переважно ексудативно-некротична реакція з подальшим розвитком продуктивного запалення. Процес розповсюджується гематогенним, лімфогенним та бронхогенним шляхом. Для розвитку дисемінованого туберкульозу необхідні, принаймні, три умови: наявність активного туберкульозного процесу; мікобактеріємія; імунологічна недостатність та специфічний сенсibilізований стан судин та легеневої тканини, який сприяє виходу МБТ з кров'яного руслу та фіксації їх у легенях

[239]. Розповсюджені форми ДТЛ характеризуються зниженою ефективністю лікування, а гострий спалах ДТЛ може обумовити швидкий прогресуючий перебіг захворювання [240]. Особливу патогенетичну роль в розвитку дисемінованого туберкульозу має порушення фагоцитарної функції макрофагів. Макрофаги руйнуються у зоні специфічного запалення у легенях. Це обумовлює виділення ферментів лізосом, простагландинів та TNF в оточуючі тканини, що обумовлює підвищену проникливість судинної стінки і створює умови для дисемінації МБТ. Підвищення частоти ДТЛ у порівнянні з інфільтративним при інфікуванні збудниками Beijing може бути обумовлено зниженою продукцією IFN γ та зниженою активацією дендритних клітин, внаслідок чого активація макрофагів не є достатньо ефективною, перетравлення МБТ блокується, а макрофаги руйнуються.

Важливим епідеміологічним аспектом перебігу туберкульозу є наявність та тривалість бактеріовиділення (табл 3.8).

Таблиця 3.8

Характеристика бактеріовиділення при інфікуванні збудниками родини Beijing та інших генетичних родин

Характеристика бактеріовиділення	Beijing (n = 23)	Інший генотип (n = 64)	RR 95% CI
МБТ+			
методом бактеріоскопії	17 (73,9%)	51 (79,7%)	0,9(0,71-1,22)
тривалість бактеріовиділення на етапі стаціонарного лікування	118,9 \pm 66,2	101,9 \pm 35,5	
Припинення бактеріовиділення при бактеріологічному дослідженні	5/14(35,7%)	29/52(55,8%)	1,6 (0,74-3,28)
Припинення бактеріовиділення за методом бактеріоскопії	7/14(50%)	46/52(88,5%)	0,5 (0,33-0,96)
Продовження бактеріовиділення більш 7 міс	2/14(14,3%)	1/52 (1,9%)	7,4(0,93-76,11)
Позитивна динаміка рентгенологічна	8/14 (57,1%)	34/52 (65,4%)	0,8 (0,53-1,43)

У 17 (73,9%) хворих з ВДТБ, від яких отримані збудники родини Beijing,

бактеріовиділення виявлялось як при бактеріоскопічному, так і культуральному дослідженні, у 6 (26,1%) тільки бактеріологічним методом. Подібна частота спостерігалась і при інфікуванні збудниками інших генетичних родин, що може свідчити про порівняльно однаковий ступінь бактеріального навантаження на початку захворювання.

Серед хворих з ВДТБ, інфікованих збудниками родини *Beijing* за період стаціонарного лікування померло 5 хворих (21,7%), 6 (26,1%) хворих перервало лікування, 12 (52,2%) хворих виписані зі стаціонару для продовження лікування амбулаторно.

Тривалість бактеріовиділення та рентгенологічна динаміка оцінювалась серед хворих, що вижили та отримували протитуберкульозне лікування більше, ніж 2 місяці. Серед хворих, від яких отримані ізоляти *Beijing* середня тривалість бактеріовиділення склала 3,9 міс., серед хворих, від яких отримані збудники інших генетичних родин - 3,3 міс (табл. 3.8). Припинення бактеріовиділення як при культурологічному, так і бактеріоскопічному дослідженні частіше спостерігалось при інфікуванні збудниками, що не належать до родини *Beijing*. При бактеріоскопічному дослідженні за методом Ціля-Нільсена мікобактерії туберкульозу виявляються лише тоді, коли є не менше ніж 50 тис. бактеріальних клітин в 1 мл патологічного матеріалу [9]. Бактеріовиділення методом бактеріоскопії реєструвалось весь період стаціонарного лікування у 50% хворих, інфікованих збудниками родини *Beijing*, и лише у 11,5% хворих, інфікованих збудниками інших генетичних родин (RR 1, 8 CI 1,04 – 3,01; $\chi^2=10,3$ p=0,001), що свідчить про підвищену епідеміологічну небезпеку саме мікобактерій генетичної родини *Beijing*. Також, продовження бактеріовиділення довше, ніж загальна тривалість стандартного режиму хіміотерапії при туберкульозі органів дихання (7 міс) спостерігалась у 14, 3% хворих, інфікованих збудниками родини *Beijing*, і лише в 1,9% хворих у разі інфікування збудниками інших генетичних родин ($\chi^2=3,8$ p=0,04). У хворих, що виділяли МБТ генотипу *Beijing* на протязі всій тривалості стаціонарного лікування, ізоляти були стійкими до 1 або більше

протитуберкульозних препаратів першого ряду, а у хворого, що виділяв МБТ 12 міс. – до всіх 5 препаратів. Тобто при інфікуванні штамами Beijing характерна знижена здатність до ефективного знищення/ізоляції мікобактерій, що може бути обумовлено подвійним фактором. По-перше, підвищена життєздатність до виживання в екстремальних умовах [144-147,236], по-друге – провокування менш ефективної імунної відповіді [138, 219,220].

Серед хворих, інфікованих збудниками генетичної родини Beijing, в 28,5% на рентгенограмі відмічено повне загоєння деструкцій. В цілому, позитивна рентгенологічна динаміка (загоєння, розсмоктування/ущільнення інфільтратів або часткове рубцювання) спостерігалась у 57,1% хворих. В 42,9% випадках зберігались інфільтративні зміни, обсіменіння та розпад. У всіх хворих з позитивною рентгенологічною динамікою під час виписки із стаціонару мікобактерій при бактеріоскопічному дослідженні мокротиння не виявлено.

Серед хворих, інфікованих збудниками інших генетичних родин, позитивна рентгенологічна динаміка спостерігалась у 65,4% хворих, у тому разі повне загоєння деструкцій - у 15,4% (RR 1, 8 CI 0,65 – 5,28; $\chi^2=1,3$ p=0,25) хворих. В 34,6% випадках зберігались інфільтративні зміни, обсіменіння та розпад. Таким чином, інфікування збудниками родини Beijing не мало достовірного впливу на характер рентгенологічної динаміки.

Проміжний аналіз результатів ефективності лікування показав, що серед хворих, інфікованих збудниками родини Beijing умерло від туберкульозу 5 (21,7%) хворих, стан покращився у 11 хворих (48%) (з них значне покращення спостерігалось у 3 хворих, покращання - у 2 хворих, часткове покращання – у 6 хворих); стан без змін залишився у 5 хворих (21,7%). 2 (8,6%) хворих перервали лікування раніше, ніж мінімальний термін інтенсивної фази лікування і були виключені з аналізованої групи. Серед хворих, інфікованих збудниками інших генетичних родин за період стаціонарного лікування померло від туберкульозу 1 (1,6%) хворих, стан покращився у 46 хворих (71, 9%), з яких значне покращення спостерігалось у 14 хворих, покращання - у 11, часткове покращання – у 21 хворих; стан без змін залишився у 9 хворих (14,1%). 8

(12,4%) хворих перервали лікування раніше, ніж 2 місячний мінімальний термін інтенсивної фази лікування (таблиця 3.9). Таким чином, покращення в групі хворих інфікованих збудниками інших генетичних родин спостерігалось частіше, ніж при інфікуванні збудниками генетичної родини Beijing (RR 1,5 CI 0,95 – 2,37; $\chi^2=4,3$ p=0,03), а летальність, навпаки, суттєво переважала серед хворих останньої групи (RR 13,9 CI 1,71-112,8; $\chi^2=10,7$ p=0,001). Вилікування на етапі стаціонарного лікування спостерігалось лише при інфікуванні збудниками, що не належать до родини Beijing.

Оскільки дворічний період є граничним терміном віднесення хворих до категорії обліку вперше діагностованого туберкульозу, через два роки був проведений віддалений аналіз результатів лікування у хворих, що вижили. Моніторування туберкульозу проводять за критеріями ефективності лікування [238]. Ефективним лікування вважають у разі: а) вилікування – завершений повний курс лікування, в результаті якого припинилося бактеріовиділення, загоїлися каверни, розсмокталася інфільтрація і туберкульозні вогнища; б) завершений повний курс лікування, припинилося бактеріовиділення, але деструкції не загоїлися. Неefективним лікування вважається, якщо завершений повний курс антимікобактеріальнорї терапії, але бактеріовиділення не припинилося, каверни не загоїлися, а у хворого, який не виділяв МБТ і не мав деструкції, інфільтрація і туберкульозні вогнища не розсмокталися (чи не ущільнилися). До групи, що продовжує лікування відносять хворих, що не завершили лікування або вже завершений основний стандартизований курс лікування був неefективним і лікування продовжено. Якщо результати лікування невідомі у разі зміни хворим місця перебування або переводу в інший район, хворого відносять до категорії «вибув/переведений». Віддалені результати лікування представлені в таблиці 3.9

Протягом дворічного періоду померло від туберкульозу ще 2 хворих, інфікованих збудниками родини Beijing. У одного з цих хворих при перебуванні в стаціонарі спостерігалось клінічне покращення, але лікування було перерване, у іншого – на момент виписки з стаціонару стан без змін.

Взагалі, протягом дворічного періоду після виявлення легеневого туберкульозу, серед хворих, інфікованих *M.tuberculosis* родини Beijing (n = 23) померло 7 (30,5%) хворих. Вилікувались 6 (26,1%) хворих (4 – 2006 р, 1 – 2007 р, 1 – 2008 р), хронічний туберкульоз зареєстровано у 3 (13,0%) хворих, продовжували лікування – 4 (17,4%) хворих, відсутня інформація про 3 (13,0%) хворих. Серед хворих з хронічним туберкульозом у двох продовжувалось бактеріовиділення. У цих хворих при стаціонарному лікуванні також відбулося клінічне покращання, але з перерваним лікуванням або стан без змін, як і в групі хворих, що через два роки продовжували лікування.

Таблиця 3.9

Проміжні та віддалені результати лікування хворих на ВДТБ легень, інфікованих збудниками родини Beijing та інших генетичних родин

Результати лікування	Beijing (n = 23)	Інший генотип (n = 64)	RR 95% CI
Проміжні результати лікування			
Вилікування	-	1 (1,6%)	
Покращення	11 (47,8%)	46 (71,9%)	0,7 (0,42-1,05)
Стан без змін	5 (21,7%)	9 (14,1%)	1,5 (0,58-4,14)
Померло	5 (21,7%)	1 (1,6%)	13,9(1,71-112,8)
Перервали лікування до завершення інтенсивної фази лікування	2 (8,7%)	7 (10,8%)	0,8 (0,18-3,55)
Віддалені результати			
Ефективне лікування	7 (30,4%)	24 (37,5%)	0,8 (0,41-1,62)
Продовжували лікування	4 (17,4%)	9 (14,0%)	1,2 (0,42-3,63)
Неефективне лікування	2 (8,7%)	9 (14,1%)	0,6 (0,14 – 2,65)
Померло - від туберкульозу - всього з моменту виявлення ТБ	2 (8,7%) 7 (30,4%)	7 (10,9%) 8 (12,5%)	0,8 (0,18 – 3,55) 2,4 (1,0 – 5,96)
Померло від інших причин	-	5 (7,8%)	
Вибули/переведені	3 (13,1%)	9 (14%)	0,9 (0,27-3,13)

Серед хворих, інфікованих збудниками інших генетичних родин протягом дворічного періоду померло від туберкульозу 7 (всього умерло від туберкульозу 8 - 12,5%) хворих, а від причин, не пов'язаних з туберкульозом – ще п'ятеро (7,8%). Хронічний туберкульоз зареєстрований у 13 (20,4%) хворих, у 9 з яких продовжувалось бактеріовиділення, у тому разі в 3 – сформувалась розширена медикаментозна резистентність (стійкість до всіх препаратів першого ряду та другого ряду), що можна пов'язати з перерваним лікуванням. Серед хворих, які умерли від туберкульозу або з хронізацією туберкульозного процесу, перевали лікування 52,6 % (10). Вилікувались 20 (31,3%) хворих (2 – 2005, 8 – 2006 р, 10 – 2007 р). Серед хворих, що вилікувались, перевали лікування лише 3 (15%).

Таким чином, відмінності в ефективності лікування хворих, від яких отримані ізоляти генетичної родини Beijing та ізоляти інших генетичних родин, суттєві переважно на етапі стаціонарного лікування (на початку захворювання).

3.3. Результати лікування хворих, що неефективно лікувались раніше, в залежності від генотипу виділених від них *M.tuberculosis*.

В групі хворих, що неефективно лікувались раніше ($n = 23$), термін середнього перебування в стаціонарі склав 118,8 днів. Для хворих, інфікованих збудниками штамів Beijing ($n = 10$), цей термін дорівнював в середньому $164,2 \pm 108,2$ дні; для хворих, інфікованих збудниками інших генетичних родин ($n = 13$) – $73,5 \pm 39,9$ днів. В першій групі хворих за період стаціонарного лікування померло 4 (40%) хворих, на протязі дворічного терміну – ще один (всього 50%). Перевали лікування 2/6 (33,3%) хворих. Головним критерієм успішного лікування в цій групі є припинення бактеріовиділення [238]. Припинення бактеріовиділення на момент завершення (або перерви стаціонарного лікування) спостерігалось лише у одного (16,7%) хворого (через 1 місяць негативні результати бактеріоскопії мокротиння, через 2 місяці – негативні результати бактеріологічного дослідження). Припинення

бактеріовиділення при аналізі через два роки спостерігалось у одного з трьох хворих, для яких отримані віддалені результати (таблиця 3.10)

Серед хворих, інфікованих збудниками інших генетичних родин, за період стаціонарного лікування умер лише один хворий (7,6%), на протязі дворічного періоду спостереження випадків смерті від туберкульозу в цій групі не спостерігалось. Переважили лікування 5 хворих (41,7%). На момент завершення (або перерви стаціонарного лікування) припинення бактеріовиділення відбулось у двох (15,4%) хворих. В обох випадках негативні результати бактеріоскопії мокротиння отримані через 1 міс., негативні результати бактеріологічного дослідження через 1 та 2 міс. Через два роки припинення бактеріовиділення спостерігалось у 2/8 хворих, для яких отримані віддалені результати.

Таблиця 3.10

Результати лікування хворих, що неефективно лікувались раніше, в залежності від генотипу збудника

Результати лікування	Beijing (n = 10)	Інший генотип (n = 13)	RR 95% CI
Умерло від туберкульозу в стаціонарі	4 (40%)	1(7,7%)	5,2 (0,68-39,1)
за 2 роки	1 (10%)	-	
всього	5 (50%)	1 (7,7%)	6,5 (0,9-47,2)
Припинення бактеріовиділення			
- в стаціонарі	1 (10%)	2 (15,4%)	0,65 (0,07 – 6,19)
- за два роки	1 (10%)	2 (15, 4%)	0,65 (0,07 – 6,19)
всього	2 (20%)	4 (30,8%)	0,65 (0,15 – 2,87)

Таким чином, середня тривалість перебування в стаціонарі хворих, інфікованих збудниками Beijing, виявилась вдвічі більшою. Як і в групі хворих з ВДТБ, серед хворих, що неефективно лікувались раніше, смерть від туберкульозу спостерігалась частіше в випадках інфікування збудником родини Beijing, переважно в період стаціонарного лікування.

Загальна летальність від туберкульозу в групі хворих, інфікованих збудниками генетичної родини Beijing (12/33,36,4%) суттєво перевищувала

летальність при інфікуванні збудниками інших генетичних родин (9/77, 11,7%)(RR 3,1 95%CI 1,45-6,67; $\chi^2=9,1$ p=0,003). Це дозволяє віднести інфікування штамми генетичної родини Beijing до факторів несприятливого перебігу захворювання (відносний ризик 2,42 95% CI 1,43-4,10; OR 4,32 95% CI 1,60-11,66).

Проведені розрахунки гематологічних індексів показали приховані зміни імунних показників, які, в першу чергу, стосуються лімфоцитарного компоненту імунної відповіді (Табл. 3.11). Суттєво зниженими ці показники є у разі інфікування збудниками родини Beijing, чим можна пояснити підвищення ризику несприятливого перебігу хвороби в цій групі хворих.

Таблиця 3.11

Показники лейкоцитарної формули та розрахункові лейкоцитарні індекси у хворих, інфікованих збудниками Beijing та інших генетичних родин

Показник	Інфікування штамми родини Beijing	Інфікування штамми інших генетичних родин	p
1	2	3	4
Загальна кількість лейкоцитів ($\cdot 10^9$ на л)	6,57 \pm 1,94	5,94 \pm 1,82	0,17
Еозинофіли (%)	1,70 \pm 1,45	1,81 \pm 1,51	0,77
Паличкоядерні лейкоцити (%)	9,04 \pm 7,52	7,42 \pm 4,54	0,21
Сегментоядерні лейкоцити (%)	63,29 \pm 7,55	59,24 \pm 10,67	0,09
Лімфоцити (%)	17,91 \pm 7,55	23,56 \pm 9,82*	0,01
Моноцити (%)	8,04 \pm 3,68	6,81 \pm 3,07	0,12
ШОЕ (мм/год)	28,08 \pm 16,41	21,86 \pm 15,78	0,10
Індекс алергізації (ІА)	0,59 \pm 0,31	0,79 \pm 0,66	0,13
Індекс нейтрофільного зсуву	0,14 \pm 0,12	0,13 \pm 0,08	0,51
Лейкоцитарний індекс інтоксикації	1,96 \pm 1,66	1,29 \pm 1,08*	0,04
Лейкоцитарний індекс	0,26 \pm 0,13	0,40 \pm 0,28*	0,03

Продовження таблиці 3.11			
1	2	3	4
Індекс співвідношення лімфоцитів та моноцитів	2,64±1,69	4,28±2,84*	0,008
Індекс співвідношення лімфоцитів та еозинофілів (ІСЛЕ)	12,99±7,64	17,7±10,17*	0,04
Індекс імунної реактивності (ІР)	2,77±1,73	4,64±3,05*	0,004

Примітка. * різниця між групами статистично достовірна

Роль зниженої імунної відповіді при інфікуванні штамми Beijing підтверджується достовірним зменшенням відносної кількості лімфоцитів у даної групи хворих, в порівнянні з хворими, інфікованими збудниками інших генетичних родин (17,91±7,55 проти 23,56±9,82; p= 0,01)

Розрахункові гематологічні показники виявили статистично достовірні зміни у співвідношення імунокомпетентних клітин.

Індекс алергізації (ІА) в нормі складає 0,79 – 1,08 та розраховується за формулою:

$$IA = \frac{\text{Лімф}\% + 10 \times (\text{Эо}\% + 1)}{\text{Нейтрофіли}\% + \text{Мон.}\% + \text{Базо}\%} \quad (3.1)$$

При туберкульозі характерним є зниження індексу алергізації на початку захворювання з його підвищенням у фазі рубцювання [241]. У хворих, інфікованих збудниками родини Beijing зниження індексу алергізації свідчить про понижену чутливість імунної системи до антигенів (алергенів). В той же час, при інфікуванні збудниками інших генетичних родин, індекс алергізації дорівнює нижній межі норми.

Лейкоцитарний індекс інтоксикації (ЛІІ) є показником процесів тканинної деградації та рівня ендогенної інтоксикації [242]. Розрахунок ЛІІ проводився за формулою:

$$ЛІІ = \frac{(4 \text{ мц.} + 3 \text{ ю} + 2 \text{ п} + \text{с}) \times (\text{пл.кл} + 1)}{(\text{лимф.} + \text{мон.}) \times (\text{э} + 1)} \quad (3.2)$$

Значення ЛШ в залежності від віку дорівнює від $0,62 \pm 0,09$ до $1,6 \pm 0,5$ [54]. Зростання показника свідчить про підвищення рівня ендогенної інтоксикації, яке достовірно більше виражено в групі хворих, інфікованих збудниками родини Beijing.

Лейкоцитарний індекс (ЛІ) [243] — відношення лімфоцитів до нейтрофілів. В нормі він складає $0,41 \pm 0,03$. У хворих інфікованих збудниками родини Beijing він є суттєво зниженим ($0,26 \pm 0,13$, $p = 0,03$).

Індекс співвідношення лімфоцитів та моноцитів (ІСЛМ) віддзеркалює співвідношення афекторної та ефекторної ланок імунологічного процесу. В нормі дорівнює $5,34 \pm 0,59$. Він є достовірно зниженим у хворих, від яких отримані ізоляти родини Beijing ($2,64 \pm 1,69$, $p = 0,008$)

Індекс співвідношення лімфоцитів та еозинофілів (ІСЛЕ) віддзеркалює співвідношення процесів гіперчутливості сповільненого та негайного типів. В нормі ІСЛЕ $8,73 \pm 1,26$, рівень його є підвищеним в обох групах хворих, але в групі хворих, від яких виділено збудники генотипу Beijing, він є значно нижчим, ніж в групі, інфікованих збудниками інших генетичних родин ($12,99 \pm 7,64$ проти $17,7 \pm 10,17$). Реакції сповільненого типу, опосередковані Т-лімфоцитами, є головними в формуванні гранульоми та локалізації інфекції. Зниження індексу свідчить про знижену активацію цих процесів.

Індекс імунної реактивності (ІР) [244] розраховується за формулою

$$\text{ІР} = \frac{\text{Лімфоц}\% + \text{еозін}\%}{\text{Моноц}\%} \quad (3.3)$$

Відносний вміст клітин – продуцентів цитокінів відображує зміщення балансу в бік лімфокінів чи монокінів, що має вплив на загальний цитокіновий профіль та характер формування імунної відповіді. В першій групі хворих цей показник є достовірно зниженим.

Підвищений ЛШ одночасно із зниженим ЛІ та ІР свідчить про наявність інтоксикації та низької імунологічної реактивності. Це може бути обумовлено як особливостями реактивності організму, так і характерними особливостями патогену.

Одним з факторів, що обумовлює підвищену патогенність штамів родини Beijing є здатність обумовлювати природжену та набуту імунну відповідь, що декілька відрізняється від імунної відповіді при інфікуванні штамми інших генетичних родин [245]. Цитокіни та хемокіни, що продукуються макрофагами та дендритними клітинами мають вирішальну роль у захисті проти МБТ [246, 247]. Відмінністю в індукції цих молекул можна пояснити варіабельну вірулентність, формування гранулеми, латентний перебіг чи активне захворювання з трансмісією збудника [248]. У порівнянні з референтними штамми *M. Tuberculosis* збудники родини Beijing характеризуються зміненою експресією інтерферона та цитокінів, як TNF, інтерлейкінів IL-1 β , IL-12p40, IL-6, IL-10 та інших. Так, гіпервірулентність збудників цієї родини у мишей була асоційована із чотирикратним зниженням у легенях рівня мРНК TNF α , IL-6, IL-12, IFN γ [220]. В культурі макрофагів та дендритних клітин людини інфікування штамми Beijing також провокувало, у порівнянні з іншими штамми, зниження продукції цитокінів TNF- α , IL-6, хемоатрактанта нейтрофілів GRO- α , IL-12p40 [219,245,249].

Стимуляція моноцитів, макрофагів та дендритних клітин мікобактеріями та їх продуктами обумовлює утворення TNF- α . TNF- α відіграє найважливішу роль у формуванні гранульоми та індукує активацію макрофагів, має імунорегуляторні властивості. IL-6 має як про- так і проти- запальні властивості та продукується на початку інфікування у вогнищі інфікування. Захисна роль IL-6 підтверджена у досліджах на мишах: IL-6-дефіцитні миші демонструють підвищену чутливість до туберкульозної інфекції, що пов'язують із зниженою продукцією IFN- γ на початку інфікування до повної експресії Т-клітинної імунної відповіді та підвищеною продукцією IL-4 [218,250]. IL-12 відіграє ключову роль у захисті проти *M. Tuberculosis*. IL-12 продукується переважно фагоцитами у відповідь на фагоцитування *M. Tuberculosis*, є найважливішим в індукції IFN- γ . При захворюванні IL-12 знайдено в легеневих інфільтратах, плеврі, гранульомах, при лімфаденітах. Одночасно підвищується експресія рецептору IL-12. Захисна роль IL-12 при легеневої патології пов'язана з

посилення продукції NO, стимулюванням Т-клітинної інфільтрації та посиленням цитотоксичної дії лімфоцитів під його впливом. Вважають, що IL-12 є цитокином, який поєднує природжену та набуту імунну відповідь на інфікування та здійснює свій захисний ефект переважно завдяки індукції IFN- γ [8,218,250].

Протекторна роль IFN- γ обумовлена, у першу чергу, стимуляцією антиген-специфічної Т-клітинної імунної відповіді. IFN- γ продукується Th1 клітинами, NK, CD8+, CD11+ клітинами за наявності допоміжних клітин, як моноцити, макрофаги, дендритні клітини тощо. В макрофагах, активованих Т-кілерах та NK кілерах IFN- γ індукує гени, продукти яких здатні знищувати мікобактерії туберкульозу. У експериментальних тварин відсутність IFN- γ призводила до швидкої загибелі від туберкульозу внаслідок нездатності до активації макрофагів. Активізація IFN- γ макрофагів відбувається через Янус тирозин-кіназу (JTK). JAK-STAT (**J**anus **K**inase, **S**ignal **T**ransducer and **A**ctivator of **T**ranscription) сигнальний шлях передає через клітинну мембрану інформацію від таких зовнішніх хімічних факторів, як інтерферон, інтерлейкіни, фактори росту, до промоторів певних генів, стимулюючи їх транскрипцію. Пригнічення цього шляху також може бути суттєвим в недостатній активації макрофагів. Інфікування мишей збудниками родини Beijing супроводжується відносно підвищеними рівнями мРНК ряду негативних регуляторів JAK-STAT сигнального шляху, як цитокинових сигналів (SOCS) 1, 4, та 5, CD45, білка інгібітора активованого Stat1 (PIAS1) тощо [251].

З іншого боку, мРНК протизапальних цитокинів IL-4, IL-5, IL-10, що обумовлюють формування переважно гуморальної ланки імунітету, була декілька підвищеною, а рівень IFN α , який виробляється В-лімфоцитами, при інфікуванні штамами Beijing був підвищеним суттєво [219,245,248].

IL-4 продукують активовані Th2 лімфоцити. Він є антагоністом IFN- γ , пригнічує продукцію TNF, IL-1, IL-6, IL-8, цитотоксичну активність Т-лімфоцитів, макрофагів. Рівень IL-4 у хворих на туберкульоз нижчий за такий у здорових донорів, а при експериментальному туберкульозі введення моноклональних антитіл

до IL-4 подовжувало життя мишей. IL-10 продукується макрофагами внаслідок фагоцитування *M. Tuberculosis* після взаємодії з ліпоарабіноманном (LAM) мікобактерій [252]. Індуковані Т-лімфоцити також здатні до продукування IL-10 [249,250]. У хворих на туберкульоз експресію IL-10 мРНК продемонстровано в циркулюючих мононуклеарах, плевральній рідині, альвеолярній рідині. IL-10 є антагоністом прозапальних цитокінів, знижуючи утворення IFN- γ , TNF- α , та IL-12 (218,250,253-255).

При мікобактеріальній інфекції провідною є Th-1 імунна відповідь. Ефективне внутрішньоклітинне знищення мікобактерії, у першу чергу, забезпечується достатньою інтенсивністю активацією Т-лімфоцитів. Суттєве значення має функціональний тип Т-лімфоцитів: Th1 клони характеризуються продукцією IFN- γ , Th2 клони характеризуються продукцією IL-4. Обидві типи утворюються з наївних Т лімфоцитів, на диференціювання яких впливають інтерлейкіни. IL-12, що продукується активованими макрофагами та дендритними клітинами, є головним індуктором утворення Th1-клітин, в той час як IL-4 стимулює індукцію Th2 [256]. Th-2 цитокіни пригнічують продукцію IFN- γ *in vitro* та активацію макрофагів [8], що послаблює імунну відповідь при туберкульозі. Знижений рівень IL-12 одночасно з підвищенням продукції IL-4 при інфікуванні штамами Beijing є причиною менш ефективної імунної відповіді.

Суттєвим є також зниження експресії рецепторів TLR2, TLR4 та MHC класу II макрофагів при інфікуванні штамами Beijing у порівнянні зі штамами Canetti та H37Rv [257]. Toll-рецептори (TLRs) – філогенетично консервативні трансмембранні протеїни. Активація макрофагів мікобактеріальними патоген-асоційованими молекулами гліколіпідної природи, як ліпоарабіноманн (LAM), ліпоманнани (LM), фосфатиділінозитол маннозиди (PIM2, PIM6), та 19-kDa ліпопротеїн, відбувається переважно через TLR2 молекули [163, 218]. Внаслідок починається утворення низки цитокінів, включаючи IL-12 та антибактеріальних сполук (NO). Показано, що активація TLR2 безпосередньо обумовлює внутрішньоклітинне знищення *M. Tuberculosis* в альвеолярних макрофагах *in vitro* [258,259].

Крім того, показано, що К-штам, який належить до родини Beijing обумовлює значно вищий рівень загибелі Th-1клітин шляхом некрозу, ніж апоптозу, у порівнянні з інфікуванням штамом H37Rv. Також при інфікуванні К-штамом були суттєво пригнічені анти-апоптичні фактори Bcl-2, Mcl-1, Bfl-1 та Bcl-xL у порівнянні з H37Rv [259].

Таким чином, можливими компонентами складного механізму, що обумовлює несприятливий перебіг туберкульозу при інфікуванні збудниками родини Beijing, є відмінності в експресії цитокінів, TLR та МНС II класу.

3.4. Результати лікування хворих на ВДТБ легенів в залежності від профілю медикаментозної резистентності

Медикаментозно-резистентний туберкульоз легень – це захворювання при якому в мокроті хворих виявляються штами МБТ резистентні до критичної концентрації протитуберкульозних препаратів. Чим більша кількість хворих на медикаментозно-резистентний туберкульоз, тим більше ризик розповсюдження туберкульозної інфекції та захворювання на туберкульоз. Сучасна ситуація з туберкульозом визначається змінами біологічних властивостей збудника захворювання та структури популяцій мікобактерій з абсолютним та відносним збільшенням кількості медикаментозно резистентних мікроорганізмів [260-264]. Важливого значення набуває своєчасна та точна діагностика медикаментозної резистентності, а також визначення факторів ризику інфікування резистентними штамми. Аналіз медикаментозної резистентності проведений в 184 (96,9%) з 192 хворих, в яких відмічалось бактеріовиділення при бактеріологічному дослідженні. На підставі аналізу даних про дату встановлення діагнозу, історію хвороби та лікування всі хворі згідно критеріям ВООЗ [265], були розподілені на дві групи: хворі (n=116; 60,8%), що раніше не лікувались від туберкульозу (первинна резистентність) та хворі (n=68; 39,2%), які раніше отримували протитуберкульозне лікування (набута резистентність). До останньої групи були віднесені хворі з хронічним туберкульозом, рецидивом туберкульозу та хворі з вперше

діагностованим туберкульозом, які отримували протитуберкульозне лікування протягом більше ніж чотири тижні. Порівняльний аналіз соціально демографічних даних пацієнтів двох груп не виявив суттєвих розбіжностей (табл. 3.12) між показниками. В обох групах переважали чоловіки, особи віком 31 – 60 роки та мешканці Одеської області ($p < 0,01$). У групі хворих, які раніше лікувались від туберкульозу, достовірно вищими, у порівнянні з першою групою, були частка чоловіків, та частка хворих, які раніше перебували в місцях позбавлення волі. Статистично достовірної різниці між групами відносно віку, місця мешкання хворих, шкідливих звичок а також частки ВІЛ-інфікованих осіб виявлено не було. В обох групах переважали хворі з дисемінованою формою, але в групі з вперше виявленим туберкульозом достовірно частіше переважали хворі з менш тяжкою інфільтративною формою туберкульозу та рідше розвивалась фіброзно-кавернозна форма у порівнянні з групою хворих, які лікувались раніше.

При аналізі соціально-демографічних показників в групах хворих, від яких отримані чутливі та резистентні ізоляти, виявилось, що в останній групі більше хворих, які зловживають алкоголем (24,6% проти 9,7%, RR2,5 CI 1,17 – 5,48), та курять (70,2% проти 58,3%, RR 1,2 CI 0,96 – 1,51). Отримані дані збігаються з результатами інших досліджень, де більшість хворих, від яких отримані резистентні ізоляти – це чоловіки середнього віку ($36,6 \pm 1,6$ р), які мають виражені риси соціально-маргінальної поведінки: алкоголь, наркоманія, злосні курці, перебували в місцях позбавлення волі, не мають родини, бездомні [266,267]. Для даного контингенту хворих мало ймовірно ретельне дотримання рекомендованого курсу хіміотерапії, яке є важливим фактором запобігання розвитку резистентності. Ймовірно було очікувати переважання резистентних штамів в групі хворих, що відмічають контакт з хворими на туберкульоз в анамнезі, але суттєвої різниці не було знайдено (43% проти 38,9%, RR 1,1 CI 0,77 – 1,58), що може свідчити про високий рівень резистентності штамів, які циркулюють а регіоні.

Таблиця 3.12

Соціально-демографічні дані про пацієнтів, в яких досліджувалась медикаментозна резистентність

Соціально-демографічні та клінічні характеристики	Хворі, що не лікувались раніше від туберкульозу (n=116)			Хворі, які раніше отримували протитуберкульозне лікування (n=68)			RR 95 % CI
	Всього	Ізоляти чутливі (n=45)	Ізоляти резистентні (n=71)	Всього	Ізоляти чутливі (n=29)	Ізоляти резистентні (n=43)	
1	2	3	4	5	6	7	8
Стать Чолов. 145 (77,9%) Жін. 41 (22,1%)	85(75,2%) 28(24,8%)	33 (71,4%) 12 (28,6%)	55 (77,5%) 16 (22,5%)	59 (82,2%) 13 (17,8%)	24 (82,7%) 5 (16,7%)	35 (81,4%) 8 (18,4%)	1,09 (0,94 – 1,27)
Вік до 30 38 (20,4%) 31 – 60 137 (73,6%) 60 - 65 років 11 (6%)	27 (23,9%) 81 (71,7%) 5 (4,4%)	11 (26,2%) 34 (73,8%) -	16 (22,5%) 50 (70,4%) 5 (7,1)	11 (15,1%) 56 (76,7%) 6 (8,2%)	3 (10,3%) 24 (79,4%) 3 (10,3%)	8 (18,6%) 32 (74,4%) 3 (7%)	1,07 (0,90 – 1,27)
Місце мешкання Одеса 12 (6,5%) Одеська область 174 (93,5%)	7 (6,2%) 106 (93,8%)	3 (7,1%) 39 (92,9%)	4 (5,6%) 67 (94,4%)	5 (6,8%) 68 (93,2%)	2 (6,7%) 27 (93,3%)	3 (7%) 40 (93%)	0,90 (0,30 – 2,74)
Куріння 122 (65,6%)	75 (66,4%)	24 (57,1%)	51 (71,8%)	47 (64,4%)	18 (60%)	29 (67,4%)	1,03 (0,83 – 1,28)
Зловживання алкоголем 35 (18,8%)	26 (23%)	6 (14,3%)	21 (29,6%)	9 (12,3%)	1 (3,3%)	8 (18,6%)	0,54 (0,27 – 1,08)

Продовження таблиці 3.12							
1	2	3	4	5	6	7	8
Вживання наркотиків 25 (13,4%)	16 (14,6%)	6 (14,3%)	10 (14,1%)	9 (12,3%)	4 (13,3%)	5 (11,6%)	0,87 (0,41 – 1,87)
Перебування у місцях позбавлення волі у минулому 44 (23,7%)	20 (17,7%)	7 (16,7%)	13 (18,3%)	24 (32,9%)	10 (33,3%)	14 (32,6%)	1,81 (1,11 – 3,11)
Контакт із хворими на туберкульоз 77 (41,4%)	47 (43,4%)	20 (47,6%)	27 (38,6%)	30 (41,1%)	8 (26,7%)	22 (51,2%)	1,01 (0,71 – 1,44)
ВІЛ інфіковані 27 (14,5%)	14 (12,3%)	5 (11,9%)	9 (12,6%)	13 (17,8%)	4 (13,3%)	9 (12,3)	1,43 (0,72 – 2,88)
Форма туберкульозу							
Інфільтративна	50 (44,2%)	20 (47,6%)	30 (42,3%)	20 (27,4%)	10 (33,3%)	10 (23,3%)	1,6 (1,05-2,48)
дисемінована	59 (52,2%)	21 (50%)	38 (53,5%)	43 (58,9%)	14 (46,7%)	29 (67,4%)	0,89(0,68-1,15)
фібр-каверн	2 (1,8%)	1 (2,4%)	1 (1,4%)	8 (12,3%)	4 (16,7%)	4 (9,3%)	6,97(1,55-31,3)
інші	2 (1,8%)	-	2 (2,8%)	1 (1,4%)	1 (3,3%)	-	
Наявність деструкцій	90 (79,6%)	32 (76,2%)	58 (81,7%)	61 (83,6%)	27 (90%)	34 (79,1%)	0,95(0,83-1,09)

Як в групі хворих з первинною, так і вторинною резистентністю, дисемінована форма туберкульозу зустрічалась частіше, ніж серед хворих, від яких отримані чутливі ізоляти. Спектр та частота резистентності до протитуберкульозних препаратів першого ряду представлені в таблиці 3.13

Таблиця 3.13

Показники медикаментозної резистентності до протитуберкульозних препаратів першого ряду хворих на туберкульоз легень за даними культуральних досліджень.

Чутливість до препаратів ряду I ^{го}	Всього хворих 184	Первинна резистентність (n=116)		Вторинна резистентність (n=68)		RR 95 % CI
		Абс. Кільк.	%	Абс. Кільк	%	
1	2	3	4	5	6	7
Чутливість до всіх препаратів	73 (38,7%)	45	38,8%	18	26,5%	1,5 (0,93 – 2,32)
S	105	61	52,6%	44	64,7%	1,2 (0,96 – 1,57)
H	63	37	31,9%	36	52,9%	1,6 (1,17 – 2,35)
E	45	21	18,6%	24	28,8%	1,9 (1,18 – 3,23)
R	88	49	42,2%	39	57,3%	1,3 (1,01 – 1,82)
Z	63	35	30,1%	28	41,2%	1,4 (0,92 – 2,03)
Мульти резистентність	54	26	22,4%	28	41,2%	1,8 (1,18 – 2,86)
Резистентність 1 препарат	9	7	6,1%	2	2,9%	2,1 (0,44-9,60)
S		3		2		
H		-		-		
E		1		-		
R		1		-		
Z		3		-		
2 препарати	30	20	17,2%	10	14,7%	1,1 (0,58 – 2,36)
HS		6		6		
HE		2		-		
HR		1		2		
HZ		1		1		
RE		1		1		
RS		6		-		
RZ		1		-		
SE		1		-		
SZ		1		-		

Продовження таблиці 3.13						
1	2	3	4	5	6	7
3 препарати	44	26	22,4%	18	26,5%	0,8 (0,5 -1,43)
HRS		8		7		
HRZ		-		1		
HZS		1		-		
HSE		1		-		
RSE		2		3		
RZS		11		6		
ZSE		3		1		
4 препарати	15	10	8,6%	5	7,3%	1,1 (0,42-3,29)
HRSE		4		1		
HRSZ		5		1		
HRZE		-		1		
HSZE		-		1		
RZSE		1		1		
всі препарати I ^{го} ряду	23	8	6,9%	15	22,1%	3,2 (1,43-7,15)

Серед ізолятів, отриманих від хворих, що не лікувалися раніше, чутливість до всіх препаратів першої лінії була збережена тільки у 45 з 116 (38,8%) хворих. Рівень резистентності (61,2%) виявився декілька вищим, ніж в середньому в Україні, де за даними різних регіонів серед хворих на вперше діагностований туберкульоз частота резистентності МБТ визначена в межах 18,8 – 29,3% [263].

Найвищою, як і в інших дослідженнях [263,268,269], виявилась первинна резистентність до стрептоміцину та ізоніазиду, що обумовлено часом введення цих препаратів в практику лікування туберкульозу. При порівнянні отриманих даних з даними досліджень в Одеському регіоні за 2003 – 2004 роки [270], спостерігається зростання резистентності до рифампіцину (9% - 2003 рік, 18% - 2004, 42,2% - 2005), стрептоміцину (32% в 2004 році) та піразинаміду (21,0% в 2004 році), в той час як рівень резистентності до ізоніазиду та етамбутолу змінюється мало (в 2004 році 29% та 16% відповідно). Дуже тривожним показником є значна розповсюдженість мультирезистентних штамів у групі хворих, що раніше не лікувалися, яка склала 22,4 % і зросла майже в 4 рази у порівнянні з 2003 роком (5,7 %). У МБТ туберкульозу можливо формування стійкості до будь-якої комбінації протитуберкульозних препаратів, але 80 – 90% рифампіцин резистентних штамів

резистентні також до ізоніазиду (мультирезистентність). За даними ВООЗ первинна резистентність до ізоніазиду і рифампіцину в країнах з високим рівнем резистентності (Казахстан, Ізраїль, окремі регіони Росії, Узбекистан, країни Балтики, деякі провінції Китаю) складає в середньому 7,8% [261]. В Україні рівень первинної мультирезистентності складає 4,9 – 17,1% [263]. На жаль, в останньому звіті ВООЗ по резистентності до протитуберкульозних препаратів дані щодо медикаментозної стійкості в Україні є фрагментарними і представлені лише даними Донецької області [271], яка включена в перелік 14 країн з рівнем первинної резистентності більш, ніж 5%. Результати, отримані в Донецькому регіоні, корелюють з результатами Одеського регіону та інших областей України, і показують значно вищу кількість мультирезистентних форм серед нових випадків туберкульозу, в той час як за даними ВООЗ, стабілізація епідемії туберкульозу можлива при рівні первинної мультирезистентності до 5%, а рівень мультирезистентності вище 7,5% свідчить про проблеми в організації діагностики та лікування хвороби [272].

Серед хворих, які отримували лікування раніше, кількість резистентних форм вище, і склала 73,5%, що відповідає рівню 63,7% - 72,5% для України [263]. Рівень вторинної резистентності вищий для всіх препаратів першого ряду, профіль частоти резистентних форм відповідає профілю первинної резистентності (максимальна для стрептоміцину та ізоніазиду). Рівень мультирезистентності 41,2% також відповідає середньому рівні в Україні (45,1 – 59,0%). Важливим фактом, що свідчить про високий рівень резистентних штамів в популяції є переважання полірезистентних штамів (резистентність до двох або більше протитуберкульозних препаратів одночасно), як в групі первинної, так і вторинної резистентності. Найчастіше реєструється стійкість до трьох препаратів, а в групі хворих з вторинною резистентністю друге місце посідає одночасна резистентність до всіх препаратів першої лінії.

Серед хворих, що не лікувались раніше ($n = 116$), 98 (84,5%) завершили інтенсивну фазу лікування в стаціонарі; 7 (6,0%) хворих умерло під час перебування в стаціонарі, 11(9,5%) хворих перервали лікування до закінчення

інтенсивної фази. Проміжна оцінка ефективності лікування проводилась після завершення стаціонарного лікування лише у хворих, в яких інтенсивна фаза протитуберкульозного лікування тривала не менше ніж 2 місяці відповідно стандартному режиму хіміотерапії. Як критерії ефективності лікування враховувались стійке припинення бактеріовиділення, підтвержене мікроскопічним та культуральним дослідженням; загоєння каверн в легенях та розсмоктування (або ущільнення) інфільтрації та вогнищ.

Оцінка проміжних результатів лікування представлена в таблиці 3.14

Таблиця 3.14

Проміжні результати лікування хворих на ВДТБ легень в залежності від чутливості/резистентності до протитуберкульозних препаратів першого ряду

Резистентність	Значне покращення/ покращення ¹	Часткове покращення ²	Без змін	помер
Чутливі (39)	20 (51,3%)	9 (23,1%)	9 (23,1%)	1 (2,5%)
Монорезистентність (6)	2 (33,4%)	2 (33,4%)	1 (16,6%)	1 (16,6%)
Резистентність до 2 препаратів (20)	9 (45,0%)	2 (10%)	8 (40,0%)	1 (5%)
Резистентність до 3 препаратів (25)	9 (36%)	9 (36%)	5(20%)	2 (8%)
Резистентність до 4 препаратів (8)	1 (12,5%)	6 (75%)	1(12,5%)	-
Резистентність до 5 препаратів (7)	1 (14,3%)	1(14,3%)	3(42,6%)	2(28,7%)
Мультирезистентність(22)	5 (22,7%)	9 (40,9%)	7(31,8%)	1 (4,5%)
Всього (105)	42	29	27	7

Примітки: 1. 1 - позитивна клінічна та рентгенологічна динаміка з припиненням бактеріовиділення;

2. 2 - зменшення клінічних проявів хвороби зі збереженням бактеріовиділення.

Отримані дані не суперечують існуючим поглядам на зв'язок полі- та мультирезистентності з більш тяжким перебігом процесу. Виражена позитивна клінічна та рентгенологічна динаміка з припиненням бактеріовиділення достовірно

частіше зустрічається в групі хворих, інфікованих чутливими МБТ (51,3%) у порівнянні з хворими, які виділяють штами, резистентні до 4 та 5 протитуберкульозних препаратів першого ряду (26,8%) (RR 3,8 CI 1,02 – 14,48; p=0,01). Навпаки, збереження бактеріовиділення з/без клінічного покращення або смерть в першій групі хворих спостерігалась в 48,7% випадків у порівнянні з 86,7% в другій групі (RR 0,56 CI 0,39 – 0,82; p = 0,01).

В випадку мультирезистентності результати лікування відповідають результатам при резистентності до 4 – 5 препаратів: припинення бактеріовиділення з клінічним покращенням лише в 22,7%, збереження бактеріовиділення в 72,7% випадків. Важливий епідеміологічний аспект туберкульозу – наявність бактеріовиділення.

Таблиця 3.15

Строки припинення бактеріовиділення на етапі стаціонарного лікування в групі хворих, інфікованих чутливими/резистентними штамми МБТ.

Штами	За методом бактеріоскопії			За бактеріологічним методом		
	1міс 2міс	3міс 4міс	5міс і більше	1міс 2міс	3міс 4міс	5міс і більше
Чутливі (n=39)	31 (79,5%)			27 (69,2%)		
	24 (77,4%)	6 (15,4%)	1 (3,2%)	18 (66,7%)	7 (25,9%)	2 (7,4%)
Резистентні (66)	36 (54,5%)			28 (42,4%)		
	26 (72,2%)	7 (19,4%)	3 (4,5%)	18 (64,3%)	7 (25%)	3 (10,7%)

Середня тривалість бактеріовиділення майже не відрізнялась в групі хворих, інфікованих чутливими та резистентними штамми МБТ ($2,3 \pm 1,1$ та $2,6 \pm 1,4$ міс за методом бактеріоскопії та $2,7 \pm 1,2$ і $3,3 \pm 1,8$ міс. за бактеріологічним методом). Припинення бактеріовиділення (табл.3.15) на етапі стаціонарного лікування достовірно частіше спостерігалось в групі хворих, які інфіковані чутливими штамми у порівнянні з групою хворих, інфікованих резистентними штамми (RR 1,5 CI 1,1 – 1,9; p = 0,01 за методом бактеріоскопії, RR 1,6 CI 1,1 – 2,3; p = 0,008 за більш чутливим бактеріологічним методом)

Аналіз віддалених результатів лікування (через 2 роки, табл. 3.16), також показав

зниження відсотку вилікуваних та зростання відсотку хронізації процесу при інфікуванні резистентними МБТ. У разі інфікування штамами, резистентними до всіх 5 препаратів першого ряду, жодного випадку вилікування не спостерігалось.

Таблиця 3.16

Віддалені результати лікування хворих на ВДТБ легень в залежності від чутливості/резистентності до протитуберкульозних препаратів першого ряду

Резистентність	Вилікування	Продовжує лікування	Хронізація процесу	Смерть
Чутливі або монорезистентні (n=34)	18 (52,9%)	4 (11,8%)	5 (14,7%)	7 (20,5%)
Резистентність до 2 – 3 препаратів (n=38)	14 (36,8%)	6 (11,8%)	7 (18,4%)	6 + 5 з інших причин (15,8% +13,2%)
Резистентність до 4 –5 препаратів (n=13)	5 (38,5%)	2 (15,4%)	3 (23,1%)	3 (23,1%)
Всього 85	37	12	15	16 + 5

Якщо прийняти до уваги, що результат дослідження медикаментозної резистентності лікар отримує через 5 тижнів – три місяці і призначає в інтенсивну фазу хіміотерапії стандартну комбінацію з 5 основних протитуберкульозних препаратів, то в дійсності, у хворих з резистентністю до отримання результатів лікування проводиться тільки одним – двома препаратами. Це зменшує ефективність інтенсивної фази хіміотерапії та збільшує ризик виникнення вторинної лікарської резистентності. Крім того, за даними літератури виявлено пригнічення клітинного імунітету у хворих з резистентними штамами МБТ. Хворі на інфільтративний та дисемінований туберкульоз, які виділяють резистентні МБТ, демонструють менший рівень Т-хелперів, цитотоксичних лімфоцитів, CD25+ клітин периферичної крові [273, 274]. У хворих на медикаментозно-резистентні форми туберкульозу індекс CD4+/CD8+ знижений в середньому в 1,5 рази [275]. Про пригнічення активності Т-хелперів 1-го типу також свідчить зниження продукції ІЛ-12, індукованої ФГА [276]. Відмічено значна тенденція до зниження індексу стимуляції продукції ІЛ-8 (відношення індукованої продукції ІЛ-8 до спонтанної) у хворих на туберкульоз легень при наростанні лікарської

резистентності та ступеню життєздатності збудника [275].

При наростанні медикаментозної резистентності та ступені життєздатності мікобактерій імунна відповідь розвивається переважно по гуморальному типу, у тому разі як клітинна імунна відповідь, що має головну захисну роль при туберкульозі, пригнічується. Максимальне пригнічення клітинного імунітету виявлено у хворих з мультирезистентними штамми мікобактерій [273,275]. З іншого боку, дослідження, проведені в Санкт-Петербурзькому НДІ фтізіопульмонології [277], показало, що частота високої, середньої та низької життєздатності і цитотоксичності достовірно не відрізнялась у чутливих та стійких штамів, і залежало, у першу чергу, від генотипу. Максимальна загибель інфікованих макрофагів спостерігалась при інфікуванні Beijing B0, найменша – при інфікуванні збудниками Латиноамериканської родини LAM, при приблизно однаковій частоті резистентності. Також виявлено кореляцію кількості лімфоцитів в периферичній крові хворих з генетичною належністю клінічних ізолятів, однак не з їх чутливістю/резистентністю. В нашому дослідженні жоден випадок інфікування штамом Beijing чутливим до всіх препаратів першого ряду не закінчився вилікуванням. Вивчення питання про співвідношення біологічних властивостей збудника, як генотип, медикаментозна резистентність, життєздатність, вірулентність, та відповіді макроорганізму на інфекцію потребує подальших досліджень.

Таким чином, інфікування збудниками генетичної родини Beijing супроводжується більш тяжким перебігом хвороби, що проявляється:

-переважанням дисемінованої форми туберкульоза над інфільтративною (60,9% проти 30,5%, $\chi^2=4,29$ $p=0,03$), в той час, як серед хворих, інфікованих збудниками інших генетичних родин декілька переважала інфільтративна форма захворювання (53,1% проти 43,7%);

-розвитком позалегенового туберкульозу лише в групі хворих, інфікованих збудниками генетичної родини;

-зниженням лімфоцитарним компонентом імунної відповіді зі зменшенням відносної кількості лімфоцитів у даної групи хворих, в порівнянні з хворими, інфікованими збудниками інших генетичних родин ($17,91\pm 7,55$ проти $23,56\pm 9,82$; $p=0,01$), зниженими лейкоцитарним індексом ($0,26\pm 0,13$ проти $0,40\pm 0,28$, $p=0,03$),

індексом співвідношення лімфоцитів та моноцитів ($2,64 \pm 1,69$ проти $4,28 \pm 2,84$, $p = 0,008$), індексом співвідношення лімфоцитів та еозинофілів ($12,99 \pm 7,64$ проти $17,7 \pm 10,17$, $p = 0,04$) та індексом імунної реактивності ($2,77 \pm 1,73$ проти $4,64 \pm 3,05$, $p = 0,004$); підвищеним лейкоцитарним індексом інтоксикації ($1,96 \pm 1,66$ проти $1,29 \pm 1,08$, $p = 0,04$);

-подовженим терміном бактеріовиділення (методом бактеріоскопії реєструвалось весь період стаціонарного лікування у 50% хворих, інфікованих збудниками родини *Beijing*, и лише у 11,5% хворих, інфікованих збудниками інших генетичних родин ($\chi^2 = 10,3$ $p = 0,01$) Продовження бактеріовиділення довше, ніж загальна тривалість стандартного режиму хіміотерапії при туберкульозі органів дихання (7 місяців) спостерігалась у 14, 3% хворих, інфікованих збудниками родини *Beijing*, і лише в 1,9% хворих у разі інфікування збудниками інших генетичних родин;

-переважанням вторинної мультирезистентності (57,5% проти 39,1%) та вторинної резистентності до всіх препаратів 1го ряду (35,7% проти 17,4%);

-гіршими результатами лікування: покращення на етапі стаціонарного лікування спостерігалось в 82,5% випадків у порівнянні з 52,3% при інфікуванні збудниками родини *Beijing* ($\chi^2 = 7,28$ $p = 0,007$). Летальність від туберкульозу в групі хворих, інфікованих збудниками генетичної родини *Beijing* (12/33,36,4%) суттєво перевищувала летальність при інфікуванні збудниками інших генетичних родин (9/77, 11,7%)(RR 3,1 95% CI 1,45-6,67; $\chi^2 = 9,1$ $p = 0,003$);

-отримані результати дозволяють віднести інфікування штамми генетичної родини *Beijing* до факторів несприятливого перебігу захворювання (відносний ризик 2,42 95% CI 1,43-4,10; OR 4,32 95% CI 1,60-11,66).

Матеріали розділу представлені в наступних наукових працях:

1. Чеснокова М. М. Особливості перебігу туберкульозу при інфікуванні штамми *M. tuberculosis* родини *Beijing* / М. М. Чеснокова // Досягнення біології та медицини. – 2009. – № 1. – С. 39-43.

2. Пат. 49910 Україна МПК (2009) А61В 10/00. Спосіб прогнозування

несприятливого перебігу туберкульозу легень / Чеснокова М. М., Бажора Ю. І., Сметюк О.О. ; заявник та патентовласник Одес. держ. мед. ун-т. - № U201000146 ; заявл. 11.01.2010 ; опубл. 11.05.10, Бюл. № 9. – 4 с.

3. Чеснокова М. М. Спосіб прогнозування тяжкості перебігу легеневого туберкульозу / О. К. Асмолов, В. Й. Кресюн, Ю. І. Бажора, М. М. Чеснокова, О. А. Бабуріна ; ОНМедУ ; НДР «Імуногенетичні, епідеміологічні, фармакогенетичні та клініко-мікробіологічні аспекти взаємовідносин у системі „паразит-хазяїн” при туберкульозній інфекції в умовах зростання захворюваності на туберкульоз» ДР 0104U010501 2005-2010 // Реєстр галузевих нововведень. – 2011. – Вип. № 34/35. – Реєстр. № 243/34/11. – С. 142

4. Чеснокова М. М. Зростання резистентності до протитуберкульозної терапії: проблеми діагностики чи незавершеність лікування? / В. Й. Кресюн, О. К. Асмолов, Ю. І. Бажора, М. М. Чеснокова, К. О. Антоненко, П. Б. Антоненко, О. А. Бабуріна // Сучасні проблеми туберкульозу в Україні: причини та шляхи їх подолання : науково-практ. конф. АМН України, 28 лист. 2008 р., Київ : матеріали. – К., 2008. – С. 50–54.

5. Чеснокова М. М. Місце штамів родини Beijing в резистентності *M. tuberculosis* до протитуберкульозних препаратів у хворих Одеського регіону / Ю. І. Бажора, М. М. Чеснокова // Український пульмонологічний журнал. – 2008. – № 3 (Додаток). – С. 237–238 (IV з'їзді фтизіатрів і пульмонологів України, 20-22 жовт. 2008 р., Київ : тези доп.)

6. Чеснокова М. М. Ефективність лікування хворих на легеневий туберкульоз при інфікуванні штамми *M. tuberculosis* родини Beijing / М. М. Чеснокова // Наукові дослідження – теорія та експеримент 2009 : V міжнар. наук.-практ. конф., 18-20 травня 2009 р., Полтава : тези доп. – Полтава : ІнтерГрафіка, 2009.

7. Чеснокова М. М. Значение выявления *M. tuberculosis* семейства Beijing у больных с туберкулезом легких / Ю. И. Бажора, М. М. Чеснокова, Е.А. Сметюк // Интегративный подход к проблемам туберкулеза и ВИЧ-инфекции : II междунар. науч.-практ. конф., 12-13 мая 2011 г., Гомель : материалы. – Гомель, 2011. – С. 22–23.

РОЗДІЛ 4

ПАТОГЕНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ТУБЕРКУЛЬОЗУ ЛЕГЕНЬ В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД ПОЛІМОРФІЗМУ ЗА ГЕНАМИ *GSTT1* та *GSTM1*

Одним з найважливіших факторів неспецифічної імунної відповіді є продукція активних кисневих радикалів мікро- та макрофагами. Взаємодія бактерій з поверхнею фагоцита обумовлює збільшення іонної проникливості клітинної мембрани, посилення окиснення глюкози та значне збільшенню утилізації кисню з утворенням активних форм кисню, тобто респіраторному вибуху. Основою респіраторного вибуху є значне підвищення утворення НАДФ у клітині внаслідок активації гексозомонофосфатного шунту та окиснення НАДФН розташованим у клітинній мембрані ферментним комплексом – НАДФН-оксидазою з утворенням супероксиданіон радикалу [278]. Останній обумовлює не тільки мікробіцидний та цитотоксичний ефект, але володіє також імунорегуляторною дією. Так, показано, що супероксидний аніон-радикал приймає участь в утворенні хемотаксичних пептидів [279] та індукції синтезу інтерлейкін-1 подібного фактору [280], він здатний посилювати мітоген-стимульовану проліферацію лімфоцитів [281], та, можливо, сам є мітогеном [282]. Фермент мієлопероксидаза лейкоцитів обумовлює утворення сильних біоцидних сполук гіпогалогенів [283]. Наприклад, іони гіпохлориту здатні безпосередньо руйнувати мембранні білки та ліпіди при реакції прямого йодування. Гіпохлорид реагує з аміногрупами структур мембрани бактерій з утворенням хлорамінів, а також діє опосередковано шляхом утворення синглетного кисню [284]. Таким чином, активація фагоцитів обумовлює утворення спочатку O_2^- , а потім й більш сильних окислювачів – HO^{\cdot} , $HOCl$ та 1O_2 , які обумовлюють модифікацію тканинних та сироваткових білків і ліпідів. Важливе значення від бактерій підтверджується тим, що при мутаціях з інактивацією ферменту НАДФН-оксидази виникає хронічний септичний

гранульоматоз: фагоцитовані клітинами мікроорганізми залишаються живими, що обумовлює повторні хронічні інфекції та септичний стан [64].

Патологічні наслідки оксидативного вибуху (оксидативний стрес) зумовлені надмірним накопиченням АФК, пероксидів та їх вторинних продуктів (супероксиданіон радикал O_2^- , гідроперекисний радикал HO_2^- , гідроксильний радикал OH , синглетний кисень 1O_2 та пероксид водню H_2O_2 -) при значній вираженості запалення з активацією нейтрофілів та макрофагів. Активація фагоцитів сприяє викиду вільних протеїназ [285], руйнівна активність яких стримується α -1 антитрипсином. Під впливом оксидантів, які продукуються макрофагами (особливо $HOCl$), виникає дефіцит α -1 антитрипсину [286]. В наслідок цього активуються деструктивні реакції, що може призводити до руйнування тканин. Модифікація білків є причиною зміни їх антигенних властивостей, а окиснення ліпідів (у першу чергу арахідонової кислоти), приводить до утворення хемоатрактантів. Таким чином, активація фагоцитів є автокаталітичним процесом, що може обумовити самопідтримання запального процесу [287]. Ненасичені альдегіди та малоновий альдегід, що утворюється у процесі перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) є мутагенами та мають значну цитотоксичність [288]. Вони пригнічують активність гліколізу та окислювального фосфорилування, синтез білків та нуклеїнових кислот, окислюють білкові SH -групи, пригнічують ряд цитозольних та зв'язаних з мембраною ферментів. Проміжні ПОЛ – гідроксильний та алкоксильний радикали індують фрагментацію та поперечні зшивки білкових молекул. Окиснення ліпідних молекул під дією АФК призводить до незворотних змін та пошкодження мембранних структур, порушенню їх проникливості для іонів [280, 289]. Оксидативний стрес із накопиченням в біологічній рідині АФК спостерігається при старінні, та більше ніж 60 захворюваннях і патологічних процесах [64]. Значною є участь вільно радикальних процесів в патогенезі бактеріальних захворювань, включаючи туберкульоз. Так, в динаміці розвитку експериментального розвитку експериментального туберкульозу легень відбувалась активація вільно радикального окиснення в легенях та плазмі крові.

При цьому інтенсивність процесів ПОЛ залежала від ступеню вираженості запального процесу [280]

В організмі існують природні механізми захисту від продуктів ПОЛ, які здійснюються за участю антиоксидантної системи. Найважливішими антиоксидантними ферментами є супероксиддисмутаза, каталаза, селенова глутатіонпероксидаза, глутатіонтрансферази, фосфоліпідгідропероксид-глутатіонпероксидаза. Супероксиддисмутаза відновлює супероксид; каталаза – перекис водню; глутатіонпероксидаза – перекис водню та органічні гідропероксиди $ROOH$ вільних жирних кислот, нуклеотидів, нуклеїнових кислот, білків; фосфоліпідгідропероксид глутатіонпероксидаза – відновлює $ROOH$ жирних кислот у складі фосфоліпідів. Глутатіонтрансферази відновлюють тільки $ROOH$, але кон'югація з глутатіоном є одним з основних механізмів детоксикації продуктів ПОЛ, електрофільних ксенобіотиків та їх метаболітів. Вони володіють вираженою глутатіонпероксидазною активністю по відношенню до гідропероксидів поліненасичених жирних кислот (лінолевої та арахідонової); знешкоджують такі продукти ПОЛ як холестерол- α -оксид, 4-гідроксиалк-2-єнали [61-66].

Ферментний білок глутатіон-S-трансферази складається з двох субодиниць: одна слугує для зв'язку ферменту з глутатіоном, інша має низку специфічність та забезпечує зв'язок з електрофільним субстратом. Реакції, що здійснюються глутатіон-S-трансферазою, можна поділити на декілька основних типів [290]:

- приєднання до субстрату (R) повної молекули відновленого глутатіону (GSH): $R + GSH \rightarrow HRSG$. Таким чином відбуваються реакції GSH з алкенами, в особливості α , β -ненасиченими карбонілами та епоксидами, у тому разі лейкотрієном A, епоксидами бенз(a)трієна та холестерола.

- нуклеофільне заміщення: $RX + GSH \rightarrow RSG + HX$, де група, що заміщується, представлена Hal^- , NO_2^- , HSO_4^- , RO^- , RS^- та ін. Реакції заміщення відбуваються по електрофільному атому карбону, нітрогену, сірки, фосфору.

- відновлення органічних пероксидів (гідропероксидів та ендпероксидів) до спиртів: $ROOH + 2GSH \rightarrow ROH + GSSG + H_2O$.

- ізомеризація. Механізм реакції включає проміжне приєднання GSH.

Найбільша активність ферменту спостерігається в печінці, легенях, нирках, слизової оболонки кишечника. Вміст глутатіону в епітеліальному секреті дихальних шляхів більше ніж в 140 разів перевищує його рівень у плазмі, що свідчить про його важливу роль в захисті дихальних шляхів від оксидативного стресу.

Оскільки оксидативний вибух з утворенням АФК є необхідним фактором для знищення мікобактерій внутришньоклітинно [14,21], він повинен супроводжуватися процесами ПОЛ та передбачає участь ферментів глутатіон-S-трансфераз. Атмосферні полутанти індустриальних районів та токсичні сполуки тютюнового диму, які пошкоджують епітелій дихальних шляхів і впливають на перебіг туберкульозу [74-76], також знешкоджуються за участю глутатіон-S-трансфераз.

Метою проведеної нами роботи було вивчення впливу поліморфізму за генами ферментів глутатіон-S-трансфераз M1 та T1 на особливості перебігу легеневого туберкульозу.

4.1 Характеристика груп хворих в залежності від поліморфізму ферментів глутатіон-S-трансфераз M1 та T1

Поліморфізм генів *GSTT1* та *GSTM1* обумовлений наявністю двох алельних варіантів: функціонально активного и неактивного «нульового» аллелю, внаслідок делеції ділянки відповідних генів.

При визначенні поліморфних варіантів ферментів глутатіон-S-трансфераз M1 та T1 методом мультиплексної ПЛР, *GSTT1*- (*GSTT1*-null) та *GSTM1*- (*GSTM1*-null) варіанти відповідають гомозиготності за мутацією та повній відсутності активності ферменту; *GSTT1*+ та *GSTM1*+ варіанти включають як гомозиготний, так і

гетерозиготний генотипи.

Оскільки частота делеції обох генів характеризується значною етнічною варіабельністю [67,82,88,291,292], як в контрольну групу (здорові особи віком 18 - 24 роки), так і в групу хворих на туберкульоз були включені лише слов'яни. Частота поліморфних варіантів *GSTT1* та *GSTM1* достовірно не відрізнялась між групою хворих на туберкульоз та контрольною групою (табл. 4.1).

Частота нульових алелей генів серед мешканців Одеської області за власними даними для *GSTM1* виявилась декілька нижчою чим визначена у європеїдів: 47,1% і 54,0% відповідно [293], та декілька вищою для *GSTT1*: 22,9% і 17,1% відповідно [294]. Подібну тенденцію може бути пов'язана з історично обумовленими особливостями слов'янського генофонду, оскільки для представників монголоїдної раси характерна більша частота делеції *GSTT1* та менша *GSTM1* [81,295].

Таблиця 4.1.

Розподіл поліморфних варіантів *GSTT1* та *GSTM1*

Група	<i>GSTT1</i> +	<i>GSTT1</i> -	<i>GSTM1</i> +	<i>GSTM1</i> -
Контрольна група (n=70)	54 (77,1%)	16 (22,9%)	37 (52,9%)	33 (47,1%)
Хворі на легеневий туберкульоз (n=191)	161 (84,3%)	30 (15,7%)	106 (55,5%)	85 (44,5%)
Достовірність між хворими та контрольною групою за критерієм χ^2	$\chi^2=1,3$ p=0,2		$\chi^2=0,05$ p=0,81	

Розподіл генотипів за генами *GSTT1* та *GSTM1* не виявилось можливим перевірити на відповідність очікуваному за законом Харді-Вайнберга, оскільки гетерозиготне носійство делеції за методом ПЛР виявити не можливо.

Групи хворих з наявністю та відсутністю активності ферментів *GSTT1* та *GSTM1*, як і очікувалось, достовірно не відрізнялись за такими соціально-демографічними характеристиками (табл. 4.2), як місце проживання, стать, вік. Як нами було показано раніше у здорових людей, частота делеції гена *GSTM1* не відрізняється між різними віковими групами, а зменшення частоти делеції *GSTT1* спостерігається починаючи із старечого (75 років) віку [296], тобто в

групі, яка не була включена до дослідження. Серед хворих на туберкульоз вікових розбіжностей між групами хворих за варіантами *GSTT1* та *GSTM1* також виявлено не було.

Таблиця 4.2

Деякі соціально-демографічні характеристики груп хворих, що відрізняються за поліморфними варіантами *GSTT1* та *GSTM1*

Група	<i>GSTT1</i> + n= 161	<i>GSTT1</i> - n= 30	p	<i>GSTM1</i> + n=106	<i>GSTM1</i> - n=85	p
Стать чоловіки жінки	123(76,4%) 38 (23,6%)	24(80,0%) 6 (20,0%)	0,60	78(73,6%) 28 (26,4%)	69(81,2%) 16 (28,8%)	0,21
Вік	42,0±12,6	41,1±13,5		41,7±12,5	40,9±12,5	0,84
18-30	36 (22,4%)	4 (13,3%)	0,26	26 (24,5%)	16 (18,8%)	0,34
31-60	110(68,3%)	22	0,58	70 (66,0%)	60 (70,6%)	0,50
61-65	15 (9,3%)	(73,3%) 4 (13,3%)	0,50	10 (9,4%)	9 (10,6%)	0,79
Мешкання						
м. Одеса	8 (4,9%)	1(3,3%)		5(4,6%)	4(4,7%)	
Одеська обл.	153 (95,1%)	29 (96,7%)	0,69	101(95,4%)	81(95,3%)	0,99

У хворих з наявністю та відсутністю активності ферментів *GSTT1* (табл.3.3) та *GSTM1* (табл.4.3) були проаналізовані основні характеристики туберкульозного процесу.

Основні характеристики туберкульозного процесу у хворих на легеневий туберкульоз не відрізнялись в залежності від поліморфізму за геном *GSTT1*. Як з наявністю, так і відсутністю активності ферменту *GSTT1* переважали:

- наявність бактеріовиділення (73,9% (n=119) проти 26,8% (n=42), $\chi^2 = 73,65$, $p < 0,001$; RR = 2,83, CI 2,15 – 3,73 для *GSTT1*+; та 76,7% (n=23) проти 23,3% (n=7), $\chi^2 = 17,07$, $p < 0,01$; RR = 3,28, CI 1,67 – 6,47 для *GSTT1*-)

- наявність деструктивних процесів ($\chi^2 = 8,02$, $p = 0,005$; RR = 1,25, CI 1,07 – 1,47 для *GSTT1*+; $\chi^2 = 6,67$, $p = 0,01$; RR = 1,25, CI 1,14 – 3,52 для *GSTT1*-)

- поширене ураження легеневої тканини з залученням у процес більш ніж однієї легеневої частки (84,5% (n=136) проти 15,5% (n=25), $p < 0,001$ для *GSTT1*+ та; 73,3% (n=22) проти 26,7% (n=8) для *GSTT1*-, $p < 0,001$).

Однак у хворих з *GSTT1-null* генотипом достовірно частіше спостерігалась

дисемінована форма туберкульозу у порівнянні з інфільтративною ($\chi^2 = 4,34$, $p = 0,03$; $RR = 1,89$, $CI 1,01 - 3,55$), в той час як у хворих з *GSTT1+* генотипом переважання дисемінованої форми не було статистично достовірним ($\chi^2 = 3,34$, $p = 0,06$; $RR = 1,26$, $CI 0,9 - 1,61$).

Таблиця 4.3

Характеристика туберкульозного процесу в залежності від варіантів *GSTT1*

Характер перебігу захворювання	<i>GSTT1+</i> n= 161	<i>GSTT1-</i> n= 30	RR 95% CI
Тип туберкульозного процесу			
ВДТБ	125 (77,6%)	23 (76,7%)	1,01(0,82 – 1,25)
РТБ	16 (9,9%)	1(3,3%)	2,98(0,41 - 2,64)
ХТБ	20 (12,5%)	6(20%)	0,67(0,27 – 1,42)
Клінічні форми			
Дисемінований	82 (50,9%)	17(56,7%)	0,89(0,63-1,27)
Інфільтративний	65(40,4%)	9(30,0%)	1,34(0,76-2,40)
Фіброзно-кавернозний	5(3,1%)	3 (10,0%)	0,31(0,08-1,23)
Вогнищевий	6(3,7%)	1(3,3%)	1,10(0,14-8,96)
Інші	3 (1,9%)	-	
Наявність бактеріовиділення			
МБТ+	119 (73,9%)	23(76,7%)	0,96(0,78-1,20)
За методом бактеріоскопії	95(59,0)	17(56,7%)	1,04 (0,74-1,46)
Наявність деструкції			
Наявність	108 (67,1%)	20(66,7%)	1,01 (0,76-1,32)
Відсутність	53 (32,9%)	10 (33,3%)	0,98(0,57-1,72)
Поширеність процесу			
1 легеня	46 (28,6%)	10 (33,3%)	0,86(0,49-1,50)
1 частка	25(54,3%)	8 (80%)	0,67(0,45 – 1,02)
2 частки	19 (41,3%)	1(10%)	4,10(0,62-27,37)
3 частки	2(4,3%)	1(10%)	0,43(0,04-4,34)
2 легені	115(71,4%)	20(66,7%)	1,07(0,82-1,41)
2 частки	49 (42,6%)	7(35,0%)	1,21(0,65-2,29)
3 частки	20 (17,4%)	2(10,0%)	0,68 (0,44-6,87)
4 частки	10(8,7%)	1(5,0%)	1,74(0,24-12,85)
5 часток	36 (31,3%)	10(33,3%)	0,93(0,53-1,67)
ХОЗЛ	79(49,1%)	13(43,3%)	1,13 (0,73-1,76)

Такі ж самі особливості туберкульозного процесу виявились при аналізі

поліморфізму за геном *GSTTM* (табл.4.4). Але поліморфізм гена *GSTTM1* більш суттєво впливає на особливості туберкульозного процесу, що може бути пов'язано з різною активністю типів глутатіонтрансфераз у легеневій тканині. Активність глутатіонтрансферази θ в дихальних шляхах не є провідною. У вйчастій каймі проксимальних дихальних шляхів максимально активними є GST ρ , μ та α , в альвеолярних клітинах та макрофагах - ρ та μ [69-71].

Таблиця 4.4

Характеристика туберкульозного процесу в залежності від варіантів *GSTTM1*

Характер перебігу захворювання	<i>GSTTM1+</i> n=106	<i>GSTTM1-</i> n=85	RR 95% CI
Тип туберкульозного процесу			
ВДТБ	77(72,6%)	71(83,5%)	0,87(0,75 – 1,01)
РТБ	11(10,4%)	5 (5,9%)	1,70(0,64 - 4,88)
ХТБ	18 (17,0%)	9 (10,6%)	1,60(0,76 – 3,39)
Клінічні форми			
Дисемінований	57 (53,8%)	42(49,4%)	1,08(0,82-1,44)
Інфільтративний	39 (36,8%)	35(41,2%)	0,89(0,63-1,28)
Фіброзно-кавернозний	3(2,8%)	5(5,9%)	0,49(0,12-1,96)
Вогнищевий	4(3,8%)	3(3,5%)	1,07(0,25-4,65)
Інші	3(2,8%)	-	
Наявність бактеріовиділення			
МБТ+	74(69,8%)	68(80,0%)	0,87(0,74-1,03)
За методом бактеріоскопії	59(55,7%)	54(63,5%)	0,87(0,69-1,11)
Наявність деструкції			
Наявність	64(60,4%)	65(76,5%)	0,79 (0,65-0,96)
Відсутність	42(39,6%)	20(23,5%)	1,68(1,07-2,64)
Поширеність процесу			
1 легеня	29(27,4%)	27(31,8%)	0,86(0,55-1,34)
1 частка	17(58,6%)	17(62,9%)	0,93(0,61-1,42)
2 частки	9(31,0%)	10(37,1%)	0,83(0,40-1,74)
3 частки	3(10,4%)	-	
2 легені	77(72,6%)	58(68,2%)	1,06(0,88-1,28)
2 частки	30(38,9%)	26(44,8%)	0,87(0,58-1,30)
3 частки	12(15,6%)	10(17,2%)	0,90(0,42-1,95)
4 частки	5(6,5%)	6(10,4%)	0,63(0,20-1,96)
5 часток	30(39,0%)	16(27,6%)	1,41 (0,85-2,33)
ХОЗЛ	42(39,6%)	49(57,6%)	0,68(0,51-0,93)

Деструктивні процеси у легенях значно менше спостерігаються в групі хворих з наявністю ферменту *GSTM1* (χ^2 5,57; $p = 0,01$). Формування деструкцій безпосередньо пов'язано з імунопатогенетичними процесами в легеневій тканині. Фагоцити містять головні продуценти реактивних форм кисню - NADPH-залежні оксидази, внаслідок оксидативного вибуху утворюються такі джерела супероксидів як мієлопероксидаза (нейтрофіли та макрофаги), еозінофил-пероксидаза (еозінофіли, макрофаги), гемопероксидаза (макрофаги). Недостатньо ефективного внутрішньоклітинного знищення мікобактерій приводить до того, що багато макрофагів і поліморфно ядерних лейкоцитів руйнуються з вивільненням значної кількості потужних протеолітичних ферментів. Це, у свою чергу, обумовлює руйнування тканин організму хазяїна і тромбоз локальних кровоносних судин, тобто утворюються мікроінфаркти легені, які згодом розріджуються. Створюється добре живильне середовище для прогресивного розмноження мікобактерій туберкульозу, які розташовані поза клітинами. Ступінь запалення наростає доти, поки не відбудеться вираженого руйнування місцевих тканин з утворенням порожнин у легенях. В такій ситуації наявність *GSTM1-null* генотипу у хворих на туберкульоз негативно впливає на протидію протеолізу та ПОЛ і сприяє формуванню деструктивних процесів. Так, показано, що *GSTM1* є одним з 7 генів-кандидатів, що впливають на тяжкість емфіземи легенів [297]. Серед пацієнтів з ехінококозом встановлене значне збільшення долі осіб з множинними кістами легенів у носіїв *GSTM1-null* генотипу [298].

Серед хворих з *GSTM1-null* генотипом також частіше спостерігається поєднання туберкульозу з хронічним обструктивним захворюванням легенів, що супроводжувалось емфіземою, пневмосклерозом та дихальною недостатністю I – II ступеню ($\chi^2=6,14$, $p = 0,01$). Бронхо-обструктивний синдром зустрічається при всіх формах туберкульозу легенів, частота його виявлення залежить від тривалості перебігу специфічного процесу та ступеня прояву остаточних змін у легенях. У хворих з обмеженими процесами виражені та значно виражені порушення бронхіальної провідності виявляються в середньому в 40,1% випадків, при

розповсюджених змінах – до 83,3% випадків[299]. Розвитку бронхіальної обструкції за наявності туберкульозу легенів сприяє порушення архітекτονіки легеневої ткани, при якому відбувається деформація бронхів, що найчастіше спостерігається при кавернозній, фіброзно-кавернозній, циротичній та дисемінованій формі туберкульозу легенів. Відмінною рисою розвитку бронхіальної обструкції при туберкульозі є поєднання «неспецифічних» етіологічних факторів ХОЗЛ: куріння, хронічне подразнення, обумовлене побутовим чи промисловим запиленням, промисловим забрудненням повітря, із специфічними компонентами (інтоксикація, запалення, подразнення дренажних бронхів) [7]. Оскільки глутатіонтрансферази приймають участь у детоксикації як зовнішніх, так і внутрішніх сполук - потенційних факторів ризику пошкодження легеневої тканини, хворі з нульовою активністю GSTM1 більш схильні до розвитку ХОЗЛ, як супутнього туберкульозу стану.

4.2 Вплив поліморфізму *GSTT1* та *GSTTM1* на перебіг та результат вперше діагностованого туберкульозу легень

У хворих з ВДТБ (n=148) розподіл за поліморфними варіантами *GSTT1* та *GSTTM1* не відрізнявся від виявленого в загальній групі хворих. Характеристики туберкульозного процесу у хворих з ВДТБ в залежності від *GSTT1* та *GSTTM1* поліморфізму представлені в табл. 4.5.

У групі хворих з ВДТБ зберігаються тенденції, знайдені у загальній групі хворих. Звертає увагу те, що асоціація між наявністю/відсутністю деструктивних процесів в легенях у хворих з ВДТБ є більш значною. Деструкція суттєво частіше спостерігається в групі хворих з відсутністю ферменту GSTM1 (χ^2 7,96 p = 0,005; RR 1,38 CI 1,10-1,73), одночасно наявність ферменту асоційована з відсутністю деструкції (RR 2,02 CI 1,21-3,41). Таким чином, наявність ферменту GSTM1 можна враховувати як протективний фактор щодо розвитку деструкцій у легенях (OR 0,36 CI 0,17 - 0,74). Фіброзно-кавернозний туберкульоз, який розвивається при відсутності схильності каверн до рубцювання, спостерігався лише у хворих з

GSTM1-null генотипом ($\chi^2 = 3,3$ $p = 0,06$).

Таблиця 4.5

Характеристика туберкульозного процесу у хворих з ВДТБ в залежності від поліморфних варіантів *GSTT1* та *GSTTM1*

Характер перебігу захворювання	<i>GSTT1+</i> n= 125 (84,5%)	<i>GSTT1-</i> n=23 (15,5%)	<i>GSTM1+</i> n= 77 (52,0%)	<i>GSTM1-</i> n= 71 (48,0%)
Клінічні форми				
Дисемінований	64 (51,2%)	13(56,5%)	41(53,2%)	35(49,3%)
Інфільтративний	52(41,6%)	8 (34,8%)	30(38,9%)	31(43,7%)
Фіброзно-кавернозний	2(1,6%)	1(4,3%)	-	3 (4,2%)
Вогнищевий	5 (4,0%)	1(4,3%)	4 (5,1%)	2 (2,8%)
Інші	2 (1,6%)	-	2 (2,6%)	-
Наявність бактеріовиділення				
МБТ+	88 (70,4%)	16 (69,6%)	51(66,2%)	54 (76,0%)
За методом бактеріоскопії	72 (57,6%)	13 (56,5%)	41 (53,2%)	45 (63,4%)
Тривалість бактеріов. на стаціонарному етапі (дні)	92,0±50,9	87,4±30,1	83,7±33,2	107±38,9*
Наявність деструкції				
Наявність	84 (67,2%)	16 (69,6%)	44 (57,1%)	56*(78,9%)
Відсутність	41(32,8%)	7(30,4%)	33(42,9%)	15*(21,1%)
Поширеність процесу				
1 легень	41(32,8%)	9(39,1%)	24(31,2%)	25(35,2%)
1 частка	23(56,1%)	7(77,8%)	14(58,3%)	16(64,0%)
2 частки	15(36,6%)	1(11,1%)	7(29,2%)	9(36,0%)
3 частки	2(4,9%)	1(11,1%)	3 (12,5%)	-
2 легені	84(67,2%)	14(60,8%)	53(68,8%)	46(64,8%)
2 частки	35(41,7%)	5(35,7%)	19(35,8%)	22(47,8%)
3 частки	15(17,9%)	1(7,1%)	9(16,9%)	7(15,2%)
4 частки	7(8,3%)	-	2(3,7%)	5(10,8%)
5 часток	27(32,1)	8(57,1%)	23(43,4%)	12(26,1%)
ХОЗЛ	60(48,0%)	9(39,1%)	29(37,6%)	40* (56,3%)

Примітка. * - відмінності між поліморфними варіантами достовірні за критерієм χ^2

GSTM1- null генотип також був асоційований з підвищеною частотою ХОЗЛ (χ^2 5,17 $p = 0,02$; RR 1,49 CI 1,05-2,13). Розрізняють три форми поєднання бронхо-

обструктивного синдрому з туберкульозом легенів: паратуберкульозний (передує туберкульозу) – виникає внаслідок ХОЗЛ або інших причин; метатуберкульозний – виникає при тривалому перебігу туберкульозу легенів; посттуберкульозний – після вилікування активного туберкульозу на тлі залишкових посттуберкульозних змін у легенях. Обструктивні зміни у хворих з ВДТБ найімовірніше можна віднести до паратуберкульозних [300]. Асоціацію *GSTM1*-null генотипу з хронічним обструктивним захворюванням легень було знайдено у ряді досліджень [102-107]. Її пов'язують з меншою захищеністю дихальних шляхів від дії атмосферних полутантів та тютюнового диму. Закономірною є підвищена частота ХОЗЛ у хворих з хронічним туберкульозом у порівнянні з хворими з вперше діагностованим туберкульозним процесом. У хворих з хронічним туберкульозом розбіжність між частотою ХОЗЛ в групах *GSTM1*+ та *GSTM1*-null (9/18, 50% та 7/9, 77,8%) є навіть більшою ніж у хворих з ВДТБ, що свідчить про вплив поліморфізму за глутатіонтрансферазою М1 на формування метатуберкульозного ХОЗЛ.

В групі хворих з ураженням обох легенів розповсюджений процес із залученням всіх 5 часток частіше зустрічається в групі хворих з *GSTT1*- генотипом (χ^2 3,26 p = 0,056 RR 1,77 CI 1,03-3,08)

Частота комбінацій генотипів *GSTT1* та *GSTM1* у хворих на ВДТБ достовірно не відрізнялись від контрольної групи (таблиця 4.6)

Таблиця 4.6.

Частоти комбінацій поліморфних варіантів *GSTT1*- та *GSTM1*-

Досліджувана група	<i>GSTT1</i> + <i>GSTM1</i> +	<i>GSTT1</i> + <i>GSTM1</i> -	<i>GSTT1</i> - <i>GSTM1</i> +	<i>GSTT1</i> - <i>GSTM1</i> -
Хворі на ВДТБ легенів (n=148)	61 (41,2%)	64 (43,2%)	15 (10,1%)	8 (5,4%)
Контрольна група (n=70)	30 (42,8%)	24 (34,3%)	7 (10,0%)	9 (12,9%)
p	0,82	0,21	0,97	0,06

Статистично достовірні відмінності між характеристиками туберкульозного процесу в групах хворих з різними комбінаціями активності ферментів *GSTT1* та *GSTM1* знайдені лише стосовно наявності деструктивних процесів. В групі хворих

з одночасною наявністю *GSTM1* та *GSTT1* спостерігались лише в 45, 9% (28/61), найвищою частота деструкцій були в групі хворих з комбінацією *GSTT1+* *GSTM1-* (78,1%, 50/64) (χ^2 13,82 $p < 0,001$ RR 1,70 CI 1,26-2,30), в групі хворих з комбінаціями *GSTT1-* *GSTM1+* та *GSTT1-* *GSTM1-* частота формування деструктивних процесів склала 66,7% та 75% відповідно. В групі хворих з комбінацією *GSTT1+* та *GSTM1-* також найвищою була наявність хронічної обструкції бронхів з пневмосклерозом та дихальною недостатністю (56,2%, 36/64 проти 37,7% 23/61 в групі *GSTT1+* *GSTM1+*, χ^2 4,31 $p=0,038$ RR 0,67 CI 0,45 - 0,99). За наявності комбінацій *GSTT1-* *GSTM1+* та *GSTT1-* *GSTM1-* частота супутнього ХОЗЛ була подібна частоті в групі *GSTT1+* *GSTM1+* (40% та 37,5% відповідно). Таким чином, наявність ферменту *GSTT1+* з одночасною відсутністю активності ферменту *GSTM1-* забезпечує найменш ефективний метаболізм ксенобіотиків та ПОЛ, які утворюються при розгортанні імунної відповіді та сприяє наростанню запалення і формуванню деструктивних процесів.

Оскільки куріння є одним з факторів ризику розвитку туберкульозу легенів, а тютюновий дим містить субстрати глутатіонтрансфераз [66,95], було проаналізовано вплив поліморфізму за генами *GSTT1* та *GSTM1* у хворих на туберкульоз в залежності від статусу куріння. Закономірним стало переважання частоти деструктивних процесів у хворих з *GSTM1-null*, що курять - 78,9% (45/57), в той час як у хворих з наявністю ферменту, що курять, частота деструкцій склала лише 59,6% (34/57) ($\chi^2 = 4,98$ $p=0,026$ RR 0,75 CI 0,59 - 0,97) У хворих з наявністю ферменту, що не курять, частота деструкцій була найменшою – 50% (10/20). Отримані результати можуть свідчити, що внесок продуктів ПОЛ в розвиток деструкцій на тлі поліморфізму ферменту є більш суттєвим, ніж внесок продуктів тютюнового диму. При відсутності ферменту *GSTM1* різниці в частоті деструкцій між групами, що курять та не курять, не має (78,9% проти 78,6%). Для *GSTT1-null* подібної залежності не знайдено.

Вплив поліморфізму за генами *GSTT1* та *GSTM1* на результат захворювання був проаналізований у хворих з ВДТБ, що отримували специфічне протитуберкульозне лікування протягом не менше, ніж 2 місяці (тривалість інтенсивної фази лікування).

19 (15,2%) хворих з ВДТБ *GSTT1+* та 5 (20,8%) хворих з *GSTT1-* перервали лікування до завершення інтенсивної фази лікування і були виключені з досліджуваної групи. Проміжні та віддалені результати лікування представлені в таблиці 4.7.

Таблиця 4.7.

Результати лікування хворих з ВДТБ в залежності від *GSTT1* поліморфізму

Результати лікування	<i>GSTT1+</i> n= 106	<i>GSTT1-</i> n= 18	RR 95% CI
Припинення бактеріовид. при бактеріологічному дослідженні	35/79 (44,3%)	6/12(50,0%)	0,89 (0,48-1,64)
Припинення бактеріовид. за методом бактеріоскопії	56/79(70,9%)	8/12(66,7%)	1,06 (0,70-1,63)
Загоєння деструкцій	24/74(32,4%)	1/12 (8,3%)	3,89(0,58-26,16)
Проміжні результати лікування			
Вилікування	3(2,83%)	-	-
Покращення	81(76,4%)	14 (77,8%)	0,98 (0,75-1,29)
Стан без змін	18 (16,9%)	2 (11,1%)	1,53 (0,39-6,03)
Умерло	4 (3,8%)	2 (11,1%)	0,34 (0,07-1,72)
Віддалені результати лікування			
Ефективне лікування	44 (41,5%)	11(61,1%)	0,68 (0,44-1,05)
Продовжує лікування	12 (11,3%)	1 (5,6%)	2,03(0,28-14,73)
Неефективне лікування	12 (11,3%)	1 (5,6%)	2,03(0,28-14,73)
Умерло від туберкульозу	16 (15,09%)	2 (11,1%)	1,35(0,34-5,41)
Умерло від інших причин	5 (4,7%)	2 (11,1%)	0,42(0,09-2,02)
Вибули/переведені	17 (16,0%)	1(5,5%)	2,88(0,41-20,37)

Проміжні та віддалені результати лікування хворих з ВДТБ в залежності від поліморфізму за геном *GSTM1* представлені в таблиці 4.8.

13 (16,9%) хворих з ВДТБ *GSTM1+* та 11 (15,5%) хворих з *GSTM1-* перервали лікування до завершення інтенсивної фази лікування і були виключені з досліджуваної групи.

Таблиця 4.8.

Результати лікування хворих з ВДТБ в залежності від *GSTT1* поліморфізму

Результати лікування	<i>GSTM1</i> + n= 64	<i>GSTM1</i> - n= 60	RR 95% CI
Припинення бактеріовид. при бактеріологічному дослідженні	23/42 (54,8%)	24/49 (48,9%)	1,10(0,75-1,66)
Припинення бактеріовид. за методом бактеріоскопії	32/42 (76,2%)	37/49 (75,5%)	1,01(0,80-1,27)
Загоєння деструкцій	8/36 (22,2%)	17/50(34,0%)	0,65(0,32-1,35)
Проміжні результати лікування			
Вилікування	3 (4,7%)	-	-
Покращення	50 (78,1%)	45 (75,0%)	1,04 (0,86-1,27)
Стан без змін	9 (14,1%)	12(20,0%)	0,70 (0,32-1,55)
Умерло	2 (3,1%)	3 (5,0%)	0,63 (0,11-3,61)
Віддалені результати лікування			
Ефективне лікування	31 (48,4%)	23 (38,3%)	1,26 (0,84-1,90)
Продовжує лікування	5 (7,8%)	8 (13,3%)	0,59 (0,20-1,69)
Неефективне лікування	5 (7,8%)	9 (15,0%)	0,52(0,19 – 1,47)
Умерло від туберкульозу	10(15,6%)	7 (11,7%)	1,34(0,54 - 3,29)
Умерло від інших причин	4(6,3%)	3 (5,0%)	1,25(0,29 - 5,36)
Вибули/переведені	9(14,1%)	10(16,7%)	0,84(0,37-1,93)

Суттєвих відмінностей у проміжних та віддалених результатах захворювання між групами хворих з наявністю та відсутністю активності ферменту *GSTT1* та *GSTM1* не знайдено. Звертає увагу зменшення частоти загоєння деструкцій на стаціонарному етапі лікування у хворих з *GSTT1-null* генотипом (8,3% проти 32,4%). Найменшою частота загоєння деструкцій є в групі хворих з комбінацією *GSTT1- GSTM1+* (0/8), в той час як в групі *GSTT1+ GSTM1-*, де деструкція спостерігається найчастіше, частота загоєння склала 37,5% (17/46) (χ^2 4,31 $p=0,038$) Вилікування на стаціонарному етапі спостерігається лише в групі хворих з одночасною наявністю ферментів *GSTT1* та *GSTM1*.

Таким чином, аналіз впливу поліморфізму за генами *GSTT1* та *GSTM1* виявив наступне:

- частота поліморфних варіантів *GSTT1* та *GSTM1* достовірно не відрізнялась між групою хворих на туберкульоз та контрольною групою, що свідчить про відсутність асоціації поліморфізму ферменту з ризиком розвитку захворювання;

- у хворих з *GSTT-null* генотипом достовірно частіше спостерігалась дисемінована форма туберкульозу ($\chi^2 = 4,34$, $p = 0,03$) у порівнянні з інфільтративною;

- *GSTM1-null* генотип асоційований з підвищеною частотою деструктивних процесів у легенях, особливо в групі хворих з ВДТБ ($\chi^2 = 7,96$ $p = 0,005$). Наявність ферменту *GSTM1* можна враховувати як протективний фактор щодо розвитку деструкцій у легенях (OR 0,36 CI 0,17 - 0,74);

- комбінація *GSTT1+* *GSTM1-* асоційована з найвищою частотою деструкцій ($\chi^2 = 13,82$ $p < 0,001$), що може свідчити про найменш ефективний метаболізм ксенобіотиків та продуктів ПОЛ в дихальних шляхах при цьому генетичному варіанті;

- максимальною є частота деструктивних процесів в легенях у хворих з *GSTM1-null*, що курять, що, у порівнянні з частотою деструкцій серед курців з наявністю ферменту ($\chi^2 = 4,98$ $p = 0,026$ RR 0,75 CI 0,59 - 0,97), свідчить про суттєвий внесок ферменту в ефективний метаболізм продуктів тютюнового диму;

- серед хворих з *GSTM1-null* генотипом частіше спостерігається поєднання туберкульозу з хронічним обструктивним захворюванням легень з емфіземою, пневмосклерозом та дихальною недостатністю I – II ступеню ($\chi^2 = 6,14$, $p = 0,01$).

Матеріали розділу представлені в наступних наукових працях:

1. Чеснокова М. М. Роль поліморфізму генів *GSTT1* та *GSTM1* у перебігу туберкульозу легень / М. М. Чеснокова, Ю. І. Бажора, О. О. Сметюк // Актуальні проблеми акушерства і гінекології, клінічної імунології та медичної генетики : зб. наук. праць. – Київ-Луганськ, 2010. – Вип. 18. – С. 343–348.

2. Tchesnokova M. The study of glutathione-transferase M and T polymorphism in

patients with lung tuberculosis in Odessa region / Marina Tchesnokova, Yuri Bazhora, Vlad Utzekhovsky, Vlad Nikolaevsky // 27th Annual Conference of the European Society of Mycobacteriology, 9–12 July 2006, London, Great Britain : abstracts – P. 18.

3. Чеснокова М. М. Значення молекулярно-генетичного дослідження глутатіонтрансфераз Т та М для прогнозу перебігу туберкульозного процесу / М. М. Чеснокова, Ю. І. Бажора, А. В. Шевеленкова // Актуальні питання медичної генетики : наук.-практ. конф. з між нар. участю, 22 травня 2007 р., Київ : тези доп. – К., 2007. - С. 5–6.

4. Чеснокова М. М. Про можливість зв'язку між поліморфізмом генів GSTT1 та GSTM1 і патогенезом тяжкості перебігу туберкульозу / Ю. І. Бажора, М. М. Чеснокова // Патологія. – 2008. – Т. 5, № 2. – С. 128

РОЗДІЛ 5

СТАН МІСЦЕВОГО ТА СИСТЕМНОГО ГОМЕОСТАЗУ ХВОРИХ НА ЛЕГЕНЕВИЙ ТУБЕРКУЛЬОЗ ЗА ДАНИМИ ЛАЗЕРНОЇ КОРЕЛЯЦІЙНОЇ СПЕКТРОСКОПІЇ.

Збереження сталості внутрішнього середовища є одним з основних принципів існування біологічної системи. Патолофізіологічні процеси, що завжди мають місце будь-якому захворюванню, призводять до порушення гомеостатичних показників як на системному, так і на місцевому рівнях, із неминучими змінами в складових біологічних рідинах. Лазерна кореляційна спектроскопія (ЛКС) дозволяє аналізувати полідисперсні гетерогенні системи, у тому числі таких складні, як конденсат видихуваного повітря та плазма крові. Сумарна гістограма субфракційного складу рідини, що вивчається, адекватно віддзеркалює співвідношення в ній біосубстратів та дозволяє одержати інтегральні показники, що відбивають динамічний стан досліджуваної системи.

5.1. Стан гомеостазу дихальних шляхів у хворих на вперше діагностований туберкульоз (ВДТБ) легенів за даними ЛКС

Провідним патогенетичним механізмом розвитку та прогресування більшості захворювань легенів є запалення дихальних шляхів, що супроводжується порушенням балансу оксидантно-антиоксидантної системи та системи протеоліз-антипротеоліз. Це супроводжується зміною вмісту великої кількості біологічно активних сполук рідини, що вкриває епітелій дихальних шляхів. Більшість з цих сполук можуть бути використані у якості біомаркерів [301,302], що обумовлює активне впровадження у клінічну практику дослідження конденсату вологи видихуваного повітря (КВВП). Застосування методу лазерної кореляційної спектроскопії (ЛКС) в дослідженні КВВП дає можливість отримати інтегральну інформацію про функціональний стан дихальної системи. Тому визначення стану

місцевого і системного гомеостазу та виявлення типів гуморально-обмінних зсувів в дихальній системі й організмі в цілому, тобто комплексу фенотипних проявів (обумовлених особливостями системи „паразит-хазяїн”) у хворих на легеневий туберкульоз проводилось методом лазерної кореляційної спектроскопії.

Як клітини інших епітеліальних тканин, клітини бронхо-альвеолярних шляхів постійно знаходяться в різноманітних станах: частково відмирають (апоптоз та дистрофічні процеси), поновлюються (проліферативні процеси), зберігають високу обмінну активність (метаболічні процеси). Кожний з перерахованих процесів супроводжується екскрецією у міжклітинний простір різних по розміру біосубстратів: найбільш низькомолекулярних при дистрофічних процесах (гідродинамічний радіус часток складає від 1 до 100 нм), відносно середньо-молекулярних при активному метаболізмі (гідродинамічний радіус часток складає від 101 до 1000 нм) і високо-молекулярних при активній проліферації (гідродинамічний радіус складає від 1001 і вище нм) [166,179,180].

Дослідження методом ЛКС КВВП юнаків і дівчин 18-25 років (81 спостереження) без будь-якої верифікованої патології показало, що усереднений ЛК-спектр досліджуваної вибірки представлений трьома фракціями: 1. низькомолекулярна (гідродинамічний радіус біосубстратів складає від 1 до 100 нм); 2. середньо-молекулярна (гідродинамічний радіус біосубстратів складає від 101 до 1000 нм) і високомолекулярна (гідродинамічний радіус складає від 1001 і вище нм). Співвідношення всіх трьох мод у ньому близько до 1:1:1 (тобто світлорозсіювальна ефективність кожної з мод складає приблизно 30%), і, оскільки досліджувались зразки від здорових осіб, цей розподіл може вважатись нормологічно зваженим [179,180,303]. Таким чином, при нормальній функції бронхо-альвеолярних шляхів реєструється внесок вище зазначених процесів, що супроводжують клітинний гомеостаз.

Будь які патологічні зсуви супроводжуються зміною співвідношення фракцій біосубстратів в конденсаті (табл 5.1), що віддзеркалює патогенетичні зсуви в стані бронхо-легеневої системи [180,182,183].

Класифікатор ЛК-спектрів для КВВП

Характер патогенетичних зсувів	Розміри часток, нм			
	1 - 10	11 - 100	101 - 1000	>1000
1. Виражено дистрофічний	70 – 100%	до 10 %	до 10 %	до 10%
2. Виражено аутоімунний	до 30 %	до 30%	до 30 %	більше 40%
3. Виражено змішаний	30 - 50 %	до 10 %	до 10 %	30 - 50 %
4. АLEGRO-аутоімунний	до 10 %	до 10 %	30 - 50 %	30 - 50 %
5. Виражено інтоксикаційний	10 - 70 %	10 - 70 %	до 10 %	до 10 %
6. Нормологічно подібний	10 - 30 %	10 - 30 %	10 - 30 %	10 - 30 %
7. Початково алергічний	до 10 %	30 - 50 %	30 - 50 %	до 10 %
8. Помірно змішаний	30 - 50 %	до 10 %	30 - 50 %	до 10 %
9. Виражений аLEGRO-подібний	до 10 %	до 10 %	70 - 100 %	до 10 %

При дослідженні КВВП у хворих з ВДТБ легенів на початку захворювання звертають увагу зміни співвідношення часток, що віддзеркалюють патоморфологічні процеси, типові для туберкульозу (рис.5.1).



Рис 5. 1 Характер гомеостатичних зсувів КВВП у хворих на легеневий туберкульоз

Переважають дистрофічні процеси (41%), зсуви, характерні для алергоподібних та аутоімунних змін, посідають друге місце (28%), змішані та інтоксикаційні зміни реєструються в 15% та 11% хворих відповідно. Таким чином, катаболічно спрямовані зміни (дистрофічні та інтоксикаційні) значно переважають над синтетичними (52% у порівнянні з 28%, $\chi^2 = 12$, $p = 0,001$; RR 1,86 CI 1,29 – 2,68) (табл. 5.2)

Таблиця 5.2

Диференціація гомеостатичних зсувів конденсату видихуваного повітря хворих на ВДТБ легенів

Характер зсувів	Абс.кількість	%
1. Виражено дистрофічний	41	41
2. Виражено аутоімунний	5	5
3. Виражено змішаний	7	7
4. Алерго-аутоімунний	2	2
5. Виражено інтосикаційний	11	11
6. Нормологічно подібний	3	3
7. Начально алергічний	13	13
8. Помірно змішаний	8	8
9. Виражено алергоподібний	8	8
10 Недиференційовані зсуви	2	2
Всього	100	100,00%

Групи хворих з різними типами субфракційного складу КВВП не відрізнялись за гендерним та віковим складом, звичкою до куріння (табл 5.3) та наявністю супутньої туберкульозу хронічної обструкції дихальних шляхів (ХОБ) з дихальною недостатністю. Це дозволяє припустити, що зміни субфракційного складу КВВП, що реєструвались, обумовлені переважно специфічним процесом у легенях.

Специфічне туберкульозне запалення супроводжують три класичні

тканинні реакції: явища альтерації, ексудації та проліферації. В залежності від імунологічного стану організму, ступені патогенності мікроорганізму та стадії розвитку захворювання переважає один з можливих компонентів. Альтерація супроводжується пошкодженням тканин аж до некрозу, що проявляється збільшенням вкладу низькомолекулярної субфракції, характерної для дистрофічних процесів.

Табл. 5.3.

Характеристика груп хворих з різними типами субфракційного складу КВВП.

Група	Дистрофічні зсуви n=41	Інтоксикаційні зсуви n=11	Алергічні та алерго-аутоімунні зсуви n=28	Змішані n=15
Характеристика групи хворих				
Стать: чоловікі жінкі	30 (73,2%) 11 (26,8%)	8 (72,7%) 3 (27,3%)	24 (85,7%) 4 (14,3%)	14 (93,3%) 1 (6,7%)
Вік: до 30 років 30-60 років більше 60 років	11 (26,8%) 25 (61%) 5 (12,2%)	1 (9,1%) 9 (81,8%) 1 (9,1%)	4 (14,3%) 20 (71,4%) 4 (14,3%)	3 (20%) 11 (73,3%) 1 (6,7%)
Куріння	33 (80,5%)	9 (81,8%)	23 (82,1%)	14 (93,3%)
Тип туберкульозного процесу				
ВДТБ РТБ ХТБ	28 (68,3%) 5 (12,2%) 8 (19,5%)*	9 (81,8%) 1 (9,1%) 1 (9,1%)	21 (75%) 6 (21,4%) 1 (3,6%)	14 (93,3%) - 1 (6,7%)
Форма туберкульозного процесу				
Дисемінований Інфільтративний Фіброзно-кав. інші	20 (48,8%) 15 (36,6%) 3 (7,3%) 3 (7,3%)	9 (81,8%)* 2 (18,2%) - -	15 (53,6%) 12 (42,6%) - 1 (3,6%)	3 (20%) 10 (66,7%) - 2 (13,3%)
Характеристика туберкульозного процесу				
МБТ + Наявність деструкції Розповсюдження процесу	34 (82,9%)* 26 (63,4%)	8 (72,6%) 9 (81,8%)*	18 (64,3%) 13 (46,4%)	8 (53,3%) 10 (66,7%)
1 частка 2 частки 3 та більше	1 (2,4%)* 16 (39,1%) 19 (46,3%)	1 (9,6%) 3 (27,3%) 7 (63,6%)	6 (21,4%) 12 (42,9%) 9 (32,1%)	6 (40%) 3 (20%) 6 (40%)
ХОБ	21 (51,2)	5 (45,5%)	11 (39,3%)	6 (40%)

Примітка. * - відмінності достовірні за критерієм χ^2

Інфіковані макрофаги, які вбивають і перетравлюють МБТ, виділяють у внутрішньоклітинний простір фрагменти мікобактерій, протеолітичні ферменти, інтерлейкіни. Якщо фагоцитоз є малоефективним, відбувається активне розмноження МБТ з вивільненням значної кількості токсичних для клітини сполук, що обумовлює порушення внутрішньоклітинного метаболізму макрофагів та Т-лімфоцитів. Відбувається пригнічення синтезу АТФ, білків, агрегація лізосом з виходом їх вмісту у міжклітинний простір та пошкодженням внутрішньоклітинних структур. Такі імунокомпетентні клітини є функціонально неповноцінними, та підлягають апоптозу. Апоптоз клітин імунної системи обумовлює формування вторинного імунодефіциту. Це сприяє розвитку ексудативного компонента запалення з формуванням некрозу [239] можливим проривом некротичних мас у бронхи або судини. Гематогенне/лімфогенне розповсюдження інфекції обумовлює розвиток дисемінованої форми туберкульозу, що супроводжується вираженою інтоксикацією. Зазначений комплекс патогенетичних процесів може пояснити переважання низькомолекулярних фракцій КВВП з реєстрацією катаболічно-спрямованих змін (дистрофічні та інтоксикаційні зсуви).

Важливим механізмом у формуванні клітинного протитуберкульозного імунітету є гіперчутливість сповільненого типу, спрямованої на локалізацію інфекції з формуванням гранульоми, що може призвести до гомеостатичних зсувів КВВП з переважаючою імунною (алергічною, алерго-аутоімунною) компонентою.

Спираючись на особливості патогенезу, можна передбачити відмінності у характеристиках туберкульозного процесу у хворих з переважанням дистрофічних та алергоподібних гомеостатичних зсувів КВВП, що підтвердилось результатами нашого дослідження. У групі хворих з дистрофічними змінами КВВП частіше спостерігається ХТБ ($\chi^2 = 3,7$, $p = 0,05$), наявність бактеріовиділення ($\chi^2 = 3,1$, $p = 0,06$), процес є більш розповсюдженим ($\chi^2 = 6,5$, $p = 0,01$) у порівнянні з групою хворих, в яких спостерігаються алергічні та алерго-аутоімунні зміни. За характеристиками

туберкульозного процесу група хворих з інтоксикаційними змінами КВВП подібна до групи з дистрофічними змінами. Але у хворих з переважанням інтоксикаційних зсувів в КВВП частіше зустрічалась дисемінована форма процесу ($\chi^2 = 3,8$, $p = 0,05$), яка є більш тяжкою і зазвичай супроводжується вираженою інтоксикацією, та деструктивні процеси в легенях ($\chi^2 = 4,0$, $p = 0,04$) у порівнянні з групою хворих з дистрофічними та алергоподібними змінами.

Більш несприятливі характеристики туберкульозного процесу на початку лікування у хворих на ВДТБ з дистрофічними гомеостатичними зсувами в КВВП обумовлюють відмінності в проміжних результатах лікування (табл. 5.4).

Табл. 5.4.

Проміжні та віддалені результати лікування хворих на ВДТБ легенів в залежності від субфракційного складу КВВП

Результати лікування	Дистрофічні зсуви n=28	Алергічні та алерго-аутоімунні зсуви n=20	Інтоксикаційні зсуви n=9	Змішані n=12
Проміжні результати ефективності лікування				
покращання	10 (35,7%)*	15 (75%)	5 (55,5%)	7 (58,3%)
часткове покращання	10 (35,7%)	3 (15%)	3 (33,4%)	3 (25%)
стан без змін	5 (17,8%)	1 (5%)	1 (11,1)	2 (16,7%)
смерть	3 (10,7%)	1 (5%)	-	-
Віддалені результати				
	n=24	n=20	n=8	n=9
Одужання ХТБ чи продовжує лікування	7 (29,2%)*	12 (60,0%)	4 (50%)	5 (55,6%)
Смерть	13 (54,1%)	6 (30%)	3 (37,5%)	2 (22,2%)
	4 (16,7%)	2 (10%)	1 (12,5%)	2 (22,2%)

Примітка. * - відмінності достовірні за критерієм χ^2

На кінцевому етапі стаціонарного лікування покращання спостерігається достовірно частіше в групі хворих з алергічними та аутоімунно-алергічними зсувами ($\chi^2 = 7,2$, $p = 0,05$, RR 2,1, CI 1,20 – 3,67). Виявлення дистрофічних зсувів у КВВП на початку захворювання, таким чином, може стати фактором прогнозування меншої ймовірності зникнення клінічних проявів хвороби з

припиненням бактеріовиділення на етапі стаціонарного лікування (OR 0,19, CI 0,05 – 0,66).

Подібна тенденція зберігається й при аналізі віддалених результатів, де одужання також спостерігалось частіше в групі хворих з алергічними та алерго-аутоімунними зсувами ($\chi^2 = 4,2$, $p = 0,04$, RR 0,49, CI 0,24 – 1,0;). Виявленні дистрофічних гомеостатичних зсувів на початку захворювання асоціюється з меншою ймовірністю одужання протягом двох років для хворих з ВДТБ легенів (OR 0,27, CI 0,08 – 0,96).

5.2. Стан гомеостазу дихальних шляхів в залежності від деяких особливостей генотипу хазяїна та патогену

Особливості субфраційного складу КВВП у хворих на легеневий туберкульоз були проаналізовані у хворих, інфікованих збудниками родини *Beijing* та в групах хворих, що відрізняються за активністю ферментів GSTT1 та GSTM1 (табл. 5.5.)

У 56 (82,3%) з 68 хворих з бактеріовиділенням було проведено молекулярно-генетичне дослідження отриманих ізолятів. Статистично достовірних відмінностей між частотою інфікування штамми генетичної групи *Beijing* та інших генетичних груп серед хворих з різними типами гомеостатичних зсувів не знайдено. У 14 хворих, від яких були отримані ізоляти групи *Beijing* (25%), катаболічно-спрямовані зсуви (дистрофічні та інтоксикаційні) спостерігались в 50% (7/14) та в 50% (7/14) випадків алергоподібні зсуви зсуви. Нормоподібний стан не зареєстрований.

В групі хворих, інфікованих мікобактеріями інших груп, дистрофічні зсуви зустрічались в 59,5%, також наявні ЛК спектри, характерні для змішаних зсувів (14,3%) та нормоподібний суфраційний стан КВВП (7,2%). Таким чином, як і слід було очікувати, при інфікуванні хворих штамми *Beijing* спостерігаються певні особливості в макромолекулярному складі КВВП. У всіх випадках констатуються або інтоксикаційні, або алергоподібні зсуви, що свідчить про глибокі порушення в

місцевому гомеостазі дихальної системи хворих на туберкульоз легенів. При інфікуванні штамами інших генетичних груп характер ЛК-спектрів більш різноспрямований: при переважанні дистрофічно-подібних та інтоксикаційних зсувів в значній кількості зустрічаються ЛК-спектри змішаного типу та ті, що мають нормоподібний тип.

Табл. 5.5

Особливості субфракційного складу КВВП в залежності від генетичних особливостей МБТ та поліморфізму *GSTT1* та *GSTM1*

Групи хворих	Генетична родина <i>M.tuberculosis</i> (n=56)		Генотип хворого за генами <i>GSTT1</i> і <i>GSTM1</i> (n=79)			
	Beijing (n=14, 25%)	Інші генетичні групи (n=42, 75%)	<i>GSTT1</i> + (n=65, 82,3%)	<i>GSTT1</i> - (n=14, 17,7%)	<i>GSTM1</i> + (n=38, 48,1%)	<i>GSTM1</i> - (n=41, 51,9%)
Характер гомеостатичних зсувів						
Катаболічно-спрямовані зсуви (всього)	7 (50%)	25 (59,5%)	39*	6 (42,8%)	20 (52,6%)	25*
в тому числі:						
-інтоксикаційні	2 (14,3%)	6 (14,3%)	8 (12,3%)	1 (7,1%)	5 (13,1%)	4 (9,8%)
-дистрофічні	5 (35,7%)	19 (45,2%)	31 (47,7%)	5 (35,7%)	15 (39,5%)	21 (51,2%)
Синтетично-спрямовані зсуви(всього)	7 (50%)	8 (19,0%)	17 (26,2%)	5 (35,8%)	12 (31,6%)	10 (24,4%)
в тому числі:						
-аутоімунні	5 (35,7%)	6 (14,3%)	2 (3,2%)	2(14,3%)	2(16,6)	2(4,9%)
-алерго-аутоімунні	-	-	1(1,5%)	1(7,2%)	1(8,3%)	1(2,4%)
-алергічні	2 (14,3%)	2 (5,7%)	14 (21,5%)	2 (14,3%)	9 (23,6%)	7 (17,1%)
Змішані	-	6 (14,3%)	9 (13,8%)	3 (21,4%)	6 (15,8%)	6 (14,6%)
Нормо подібний стан	-	3 (7,2%)	-	-	-	-
	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Примітка. * - відмінності між синтетично- та катаболічно спрямованими зсувами достовірні за критерієм χ^2 ; $p \leq 0,001$

При дослідженні генотипу хворих делеція *GSTT1* була виявлена у 17,7% (14/79), делеція *GSTM1* у 51,9% (41/79). В групі хворих з *GSTM1-null* генотипом дистрофічні зсуви (21/41, 51,2%) зустрічались частіше, ніж алергоподібні (10/41, 24,4%)($\chi^2 = 6,3$, $p = 0,01$, RR 2,1, CI 1,13 – 3,89), при наявності гена дистрофічні та алергоподібні зміни були знайдені з майже однаковою частотою (15/38, 39,5% та 12/38, 31,6%). Частота виявлення інтоксикаційно-спрямованих зсувів виявилась майже однаковою при наявності та відсутності ферменту *GSTM1* (5/38, 13,2% та 4/41, 9,8%). Переважання дистрофічних змін над анаболічно-спрямованими в групі хворих з *GSTM1-null* генотипом можливо пов'язати з біологічною роллю ферменту, який захищає бронхо-альвеолярний тракт від наслідків хімічного та оксидативного стресу. Субфракційний склад КВВП, характерний для інтоксикаційних (4/41, 9,8% та 5/38, 13,2%) і змішаних (6/41, 14,6% та 6/38, 15,8%) зсувів був зареєстрований приблизно з однаковою частотою у хворих як з відсутністю так і наявністю гена *GSTM*.

При аналізі складу КВВП у хворих з різним *GSTT1* генотипом ситуація виявилась зворотною: у хворих з *GSTT1-null* генотипом дистрофічні та алергоподібні зміни виявились з однаковою частотою (5/14, 35,7%), у 21, 4% (3/14) хворих спостерігались змішані зсуви, у 1/14 (7,1%) – інтоксикаційні. При наявності гена дистрофічні зсуви знайдені в 47,7% (31/65), алергоподібні – в 26,1% (17/65) %)($\chi^2 = 6,4$, $p = 0,01$, RR 1,8, CI 1,13 – 2,95), інтоксикаційні та змішані зсуви - в 12,3% (8/65) та 13,8% (9/65) хворих.

При аналізі комбінацій генотипів *GSTT1* та *GSTM1* закономірним стало переважання поєднання *GSTT1+* та *GSTM1-* в групі з дистрофічними змінами КВВП (23/45, 51,1%), в той час як при алергоподібних зсувах найчастішою стала комбінація *GSTT1+ GSTM1+*(10/22, 45,5%). Відмінності між частотою виявлення варіантів наявності/відсутності ферментів *GSTT* та *GSTM* при різних типах гомеостатичних зсувів КВВП знайдені лише для комбінації *GSTT+ GSTM-* (n= 34). У хворих з даною комбінацією дистрофічні зсуви (55,9% , 19/34)спостерігались суттєво частіше, ніж алергоподібні (20,6 % , 7/34) ($\chi^2 = 8,9$, $p = 0,003$, RR 2,7, CI 1,32 – 5,6).

Отримані результати можна пояснити роллю, яку відіграють ферменти *GSTM* та *GSTT* в обміні глутатіона, одного з основних учасників як першої, так і другої фаз біотрансформації ксенобіотиків [290]. У хворих на туберкульоз ця ланка біотрансформації ксенобіотиків працює зі значним навантаженням, оскільки в організмі внаслідок вираженого катаболізму накопичується значна кількість агресивних радикалів ендogenousного походження. Суттєвий внесок додають компоненти оксидативного вибуху при включенні імунної системи хазяїна у відповідь на агресію *M.tuberculosis*. Комплексна специфічна та тривала хіміотерапія обумовлює значний тиск на процеси біотрансформації, в тому числі і на глутатіон. Необхідно мати на увазі, що хворі на туберкульоз в Одеському регіоні мешкають в екологічно небезпечному районі, де в організм людини потрапляють різні за походженням ксенобіотики, які потребують біотрансформації в організмі.

В такій ситуації наявність *GSTM1-null* та *GSTT1-null* генотипів у хворих на туберкульоз негативно впливає на процеси детоксикації та накопичення в організмі активних метаболітів, які обумовлюють інтоксикацію та алергізацію організму. Подібне припущення ув'язується із характером ЛК-спектрів КВВП хворих на туберкульоз.

При аналізі особливостей гомеостатичних зсувів при різних комбінаціях генотипів *GSTT* та *GSTM* і належності збудника до генотипу Beijing статистично достовірні розбіжності між різними групами не знайдені, можливо, у зв'язку з невеликою кількістю хворих у кожній групі.

5.3. Стан гомеостазу плазми крові хворих на вперше діагностований туберкульоз (ВДТБ) легенів за даними ЛКС

У хворих на туберкульоз легенів порушення метаболізму мають системний характер і спостерігаються у клітинах різних органів та систем, що в значній мірі визначає різноманітність клінічних проявів захворювання [7,9,239]. При туберкульозному процесі у кров виходять не тільки ендотоксини мікобактерій, але

й велика кількість ендопатогенів, що утворюються внаслідок активації протеоліза. При цьому відбувається накопичення в плазмі крові великої кількості продуктів деградації білків, альдегідів, амінів тощо, що утворюють пул з молекулярною масою 300 – 5000 Д (молекули середньої маси), який вважають неспецифічним маркером інтоксикації [304]. Імунна відповідь супроводжується утворенням великої кількості цитокінів, синтезу глобулінів та білків «гострої фази» запалення, зокрема, порушується співвідношення білкових фракцій сироватки крові, збільшується концентрація фібриногену, α -протеазного інгібітору, рівень гаптоглобіну, сіалових кислот, з'являється С-реактивний білок [239,304]. При порушенні або зміні газообміну, викликаного патологічними процесами в легеневій тканині, трахео-бронхіальному дереві, відбувається перебудова окислювально-відновних реакцій, активуються компенсаторно-приспосувальні механізми, спрямовані на відновлення вироблення макроергічних сполук. Всі ці процеси мають відображення в плазмі (сироватці) крові, що може бути зареєстровано методом ЛКС.

При вивченні ЛКС спектру плазми крові увесь діапазон спектру (від 1 нм до 10 мкм) поділяється на 5 дискретних зон в залежності від діаметру світлорозсіювачих часток. В I-у зону (0-10 нм) потрапляють низкомолекулярні мономерні альбуміни та вільні гліколіпідні комплекси, в II-у зону (11 - 30 нм) – глобулярні білки та низкомолекулярні ліпопротеїди, в III-ю зону (31-70 нм) високомолекулярні глікопротеїди, низкомолекулярні імунні комплекси, ДНК та РНК- частки, в IV-ту зону (71-150 нм) – переважно імунні комплекси середнього розміру та ліпопротеїди дуже низької щільності. V-а зона (частки більше за 150 нм) представлена високомолекулярними комплексами, які найчастіше утворюються при внаслідок процесів алергізації та аутоімунної сенсibilізації організму чи накопичення значної кількості хіломікронів [305].

Основною характеристикою ЛК спектру плазми крові здорової людини є переважання світлорозсіювачих часток з гідродінамичним радіусом 80 – 600 нм (середньо та крупно-молекулярні білки плазми), з бімодальною гістограммою розподілу часток [166]. При різних патологічних процесах відбуваються зміни

субфракційного складу плазми крові (табл 5.6).

Таблиця 5.6

Основні напрямки зсувів ЛК спектрів плазми крові при різних патологічних процесах (класифікатор) [306]

Характер гомеостатичних зсувів	Напрямок спектральних зсувів
Алергізація організму	Збільшення відсоткового вмісту молекул білка, що входять у IV-у зону гістограми, а також асоціати білка у V-ій зоні
Інтоксикація організму	Збільшення відсоткового вмісту молекул білка, що входять у II-у зону гістограми з помірним збільшенням часток в III-ій зоні
Катаболічні зміни	Значно збільшується відсотковий вклад молекул в III-ій зоні з незначним підвищенням вмісту часток в II-ій зоні
Аутоімунні процеси	Збільшується відсотковий вміст молекул білку в V-ій зоні
Дегенеративно-дистрофічні процеси	Збільшується відсотковий вміст молекул білка в I-ій зоні
Алергізація на тлі інтоксикації	Збільшення відсоткового вмісту молекул білка в IV-ій зоні з одночасним підвищенням відносного вмісту білків в II-ій зоні
Аутоімунні зсуви на тлі інтоксикації	Збільшення відсоткового вмісту молекул білка у V-ій зоні з одночасним підвищенням вмісту білків в II-ій зоні
Алергізація на тлі дегенеративно-дистрофічних змін	Збільшення відносного вмісту білкових молекул в V-ій зоні з одночасним підвищенням вмісту білків малої молекулярної маси в I-ій зоні

У хворих на туберкульоз легень результати ЛКС дослідження плазми крові відповідають результатам дослідження КВВП (табл 5.7). Звертає увагу значне переважання хворих з гідролітично-спрямованими та змішаними зсувами ЛК-спектру плазми крові. Сума дистрофічно-, інтоксикаційно- та катаболічно-подібних (катаболічно-спрямовані) зсувів складає 54,6%, змішаних зсувів - 32,4%, тоді як синтетично спрямовані зсуви зустрічаються лише в 9,1%. Для туберкульозу характерне збільшення рівня α_2 -глобулінов, при хронічних процесах може спостерігатися збільшення γ -глобулінової фракції, які рееструються у II зоні, а наявність деструктивних процесів в легенях пояснює збільшення вкладу в ЛК

спектр часток розміром до 10 нм (І зона, дистрофічно-подібні зсуви).

Таблиця 5.7

Диференціація гомеостатичних зсувів плазми крові хворих на вперше діагностований легеневий туберкульоз

Характер зсувів	Абс.кількість	%
0- Норма	3	3,9%
1 - алергоподобні	6	7,8%
2 – інтоксикаційно-подібні	14	18,2%
3 - катаболично-подібні	3	3,9%
4 - атоіmunно-подібні	1	1,3%
5 - дистрофічно-подібні	25	32,5%
6 – змішані алерго-інтоксикаційні	18	23,4%
7 – змішані аутоіmunно-інтоксикаційні	4	5,1%
8 – змішані алерго-дистрофічні	3	3,9%
Всього	77	100,00%

Ступінь прояву синтетичних змін спостерігалась значною у всіх хворих, тоді як при катаболично спрямованих зсувах виявились значні (22%), помірні (46,3%) слабо виражені зсуви (31,7%). Ступінь прояву змішаних гомеостатичних зсувів у всіх хворих була помірною.

Звертає увагу менша ступень відповідності між характеристикою туберкульозного процесу та характерами гомеостатичних зсувів плазми крові у порівнянні з КВВП (табл 5.8). Статистично достовірним є лише переважання інфільтративної форми туберкульозу у хворих з синтетичними характером гомеостатичних зсувів в порівнянні з групою хворих з гідролітичним напрямком зсувів, що реєструються в плазмі крові ($\chi^2 = 4,4$, $p = 0,03$, RR 0,5, CI 0,32-0,79), що відповідає результатам дослідження КВВП. Слід також зазначити підвищення відсотку ХТБ серед хворих з синтетичними гомеостатичними зсувами у порівнянні з групою хворих, в яких виявлені гідролітично-спрямовані зсуви ($\chi^2 = 4,5$, $p = 0,03$,

RR 0,39, CI 0,03-1,00), що, можливо, відображує циркуляцію високомолекулярних імунних комплексів

Таблиця 5.8.

Характеристика груп хворих з різними типами субфракційного складу плазми крові.

Характеристика груп хворих	Катаболічно-спрямовані зсуви n=42	Змішані n=25	Синтетично спрямовані зсуви n=7
Стать: чоловікі жінкі	30 (71,4%) 12 (28,6%)	19 (76%) 6 (24%)	7(100%) -
Вік: до 30 років 30-60 років більше 60 років	10 (23,8%) 27 (64,3%) 5 (11,9%)	7 (28%) 16 (64%) 2 (8%)	- 6(85,7%) 1 (14,3%)
Куріння	35 (83,3%)	18 (72%)	7(100%)
ВДТБ РТБ ХТБ	36 (85,7%) 4 (9,5%) 2 (4,7%)	23 (92%) 1(4%) 1 (4%)	5 (71,4%) - 2 (28,6%)*
Дисемінований Інфільтративний Фібринозно-кав. інші	17 (40,5%) 18 (42,9%) 4 (9,5%) 3 (7,1%)	14(56%) 11(44%) - -	1 (14,3%) 6 (85,7%)* - -
МБТ + Наявність деструкції Розповсюдженість процесу	27 (64,3%) 26 (61,9%)	14 (56%) 17 (68%)	7 (100%) 5 (71,4%)
1 частка 2 частки 3 та більше	12(28,6%) 14 (33,3%) 16 (38,1%)	4 (16%) 8 (32%) 12(48%)	1 (14,3%) 3 (42,9%) 3 (42,9%)

Примітка. * - відмінності достовірні за критерієм χ^2

Ступінь та характер гомеостатичних зсувів, що реєструються при ЛКС досліджені плазми крові відповідає змінам таких гематологічних показників, як лейкоцитоз, швидкість осідання еритроцитів (ШОЕ), гематологічний показник інтоксикації(ГПІ). Останній показник, запропонований для оцінювання ступеню ендогенної інтоксикації у хворих на туберкульоз, розраховується за формулою

$$\text{ГПІ}=\text{ЛПІ}\times\text{KL}\times\text{KШОЕ}\times\text{KEp}\times\text{КТр}, \quad (5.1)$$

де KL – поправний коефіцієнт на лейкоцитоз

KШОЕ – поправний коефіцієнт на ШОЕ

К_{Ер} – поправний коефіцієнт на еритроцитопенію

К_{Тр} – поправний коефіцієнт на тромбоцитопенію

ЛШ – лейкоцитарний індекс інтоксикації, який визначається за формулою

$$\text{ЛШ} = (2\text{П} + \text{С}) / (\text{Мо} + \text{Л}) \times (\text{Е} + 1)$$

Значення ГПШ 1,21 – 1,50 відповідає I-му ступеню ендогенної інтоксикації; 1,5 – 4,0 – II-му ступеню; 4,0 – 30,0 – III-му ступеню інтоксикації. Значення ГПШ більше 30 відповідає IV-му ступеню інтоксикації та є фатальним для хворих на туберкульоз[202].

Якщо при синтетично-спрямованих зсувах ГПШ у межах норми, то середнє значення ГПШ при катаболічно-спрямованих зсувах відповідає I ступеню інтоксикації, а при змішаних зсувах – II ступеню.

Ступінь прояву гомеостатичних зсувів також відповідає ступені зміни гематологічних показників (табл. 5.9):

Таблиця 5.9

Деякі показники гемограми хворих з різними типами гомеостатичних зсувів плазми крові

Гематологічний показник	Характер гомеостатичних зсувів			Ступінь прояву гомеостатичних зсувів	
	Катаболічно спрямовані зсуви	Змішані зсуви	Синтетично спрямовані зсуви	Легка ступінь зсувів	Виражені зсуви
Лейкоцити (10 ⁹ /л)	6,09 ± 1,66	5,75 ± 1,2	5,28 ± 1,07	5,29 ± 1,12	6,64 ± 1,9
ЛШ	1,05 ± 0,7	1,00 ± 0,5	0,9 ± 0,23	0,90 ± 0,49	1,5 ± 0,9
ШОЕ	17,3 ± 13,7	22,5 ± 17,1	17,5 ± 7,8	15,33 ± 12,94	18,66 ± 12,44
ГПШ	1,42 ± 1,05	1,66 ± 1,00	1,07 ± 0,39	1,23 ± 0,72	2,02 ± 1,4

ГПШ на межі норми та відповідає легкій ступені інтоксикації при незначних гомеостатичних зсувах та II ступень інтоксикації при виражених плазматичних гомеостатичних зсувах. Подібна відповідність характеру гомеостатичних зсувів та гематологічного індексу інтоксикації характерна і для ЛК спектру КВВП. В групі хворих з дистрофічними гомеостатичними зсувами КВВП показник ГПШ склав 1,89 ± 1,54 (II ступінь інтоксикації), ШОЕ 18,11 ± 11,5, тоді як в групі хворих з

синтетично спрямованими гомеостатичними зсувами ГПП залишився на межі норми ($1,19 \pm 0,55$), ШОЕ $12,25 \pm 9,03$. Високі показники ШОЕ характерні для швидко прогресуючих формах туберкульозу та ексудативного характеру процесу. Підвищення ШОЕ при туберкульозі також пов'язують зі збільшенням рівню глобулінів, фібриногену, мукополісахаридів, що може пояснити максимальне середнє значення цього показника при змішаному характері гомеостатичних зсувів ($22,5 \pm 17,1$), який характеризується наявністю як низькомолекулярних так і високомолекулярних компонентів.

Відповідності між проміжними результатами ефективності лікування та характером змін ЛК спектрів плазми, на відміну від ЛК спектрів КВВП, не виявлено, що можна пояснити меншою відповідністю між характеристикою туберкульозного процесу та характерами змін у плазмі крові у порівнянні з КВВП (табл. 5.10).

Таблиця 5.10.

Проміжні та віддалені результати лікування хворих на ВДТБ легенів в залежності від характеристики ЛК спектрів плазми

Результат	Катаболічно спрямовані зсуви n=38	Змішані n=21	Синтетично спрямовані n=5
Проміжні результати ефективності лікування			
покращання	24(63,2%)	10 (47,6%)	2 (40%)
часткове покращання	6 (15,8%)	8 (38,1%)	1 (20%)
стан без змін	6 (15,8%)	3 (14,3%)	2 (40%)
смерть	2(5,2%)	-	-
Віддалені результати			
	n=24	n=15	n=5
Одужання	18 (75%)	9(60%)	1 (20%)
ХТБ чи продовжує лікування	5 (20,8%)	6(40%)	3 (60%)
Смерть	1(3,1%)	-	1 (20%)

У разі виявлення на початку лікування синтетично спрямованих ЛК спектрів плазми через два роки частіше визначається перехід процесу у хронічну форму або хворі ще продовжують лікування ($\chi^2 = 3,1$, $p = 0,07$, RR 0,34, CI 0,12-1,00). Як і в

групі хворих з ХТБ, переважання синтетично спрямованих зсувів може бути пов'язано з циркуляцією високомолекулярних імунних комплексів.

Статистично достовірні відмінності між особливостями гомеостатичних зсувів плазми крові між групами хворих, що відрізняються за генотипом отриманих ізолятів *M.tuberculosis* та генотипом *GSTT* і *GSTM* не виявлено (табл. 5.11)

Таблиця 5.11

Особливості гомеостатичних зсувів плазми крові при різних генотипах МБТ та генотипу *GSTT* і *GSTM*

Характер гомеостатичних зсувів	Генетична родина <i>M.tuberculosis</i>		Генотип хворого за генами <i>GSTT1</i> і <i>GSTM1</i>			
	Beijing	Інший генотип	<i>GSTT1</i> +	<i>GSTT1</i> -	<i>GSTM1</i> +	<i>GSTM1</i> -
Катаболічно спрямовані	4 (22,1%)	14 (77,9%)	21 (77,8%)	6 (22,2%)	11 (40,7%)	16 (59,3%)
Синтетично спрямовані	2 (33,3%)	4 (66,7%)	5 (71,4%)	2 (28,6%)	4 (57,1%)	3 (42,9%)
Змішані	1 (12,5%)	7 (87,5%)	15 (88,2%)	2 (11,8%)	9 (52,9%)	8 (47,1%)

5.4 Стан гомеостазу сечі хворих на вперше діагностований туберкульоз (ВДТБ) легенів за даними ЛКС

У хворих на туберкульоз легенів порушення метаболізму з мембранопшкоджуючим ефектом мають системний характер та спостерігаються у клітинах різних органів та систем, що в значній мірі визначає різноманітність клінічних проявів при даній патології. Ці зміни мають параспецифічний характер і їх морфологічним еквівалентом є порушення функції багатьох органів та систем, включаючи нирки. Нирки приймають активну участь у процесах детоксикації, екскреції метаболітів та медикаментозних препаратів. При тяжких порушеннях функції дихальної системи [182] спостерігаються порушення центральної гемодинаміки, кислотно-основного стану, водно-електролітного обміну - тобто тих параметрів гомеостазу, у регуляції яких нирка бере

безпосередню участь. Все це не може залишити орган функціонально інтактним і повинне приводити, принаймні, до компенсаторних змін окремих ниркових функцій, що може відображатись зміною ЛК-спектрів.

Для аналізу ЛК-спектрів сечі було виділено чотири інформативні зони: I-а – зона низькомолекулярних сполук (1-50 нм); II-а – зона середньо молекулярних інгредієнтів (51–200 нм); III-я – зона високомолекулярних інгредієнтів (201-600 нм); IV-а – зона над високомолекулярних інгредієнтів (більш, ніж 600 нм) [166]. Загальна спрямованість змін ЛК спектрів, що реєструються при дослідженні сечі, відповідає характеру змін ЛК спектрів плазми при різних патологічних процесах. Інтоксикаційно-подібні зсуви характеризуються кластерами зі зниженням внеску високомолекулярних субфракцій за рахунок підвищення вмісту середньо-молекулярних. Катаболічно-подібні зсуви, що відповідають більшому ступеню гідролізу високомолекулярних субфракцій, характеризуються ще більшим перерозподілом в сторону середньо молекулярних (51 – 200 нм) і, частково, низькомолекулярних (до 50 нм) субфракцій. Дистрофічно-подібні зсуви характеризуються значним переважанням низькомолекулярної фракції (до 50 нм). Алергоподібні зсуви відповідають підвищеній екскреції із сечею високомолекулярних субстратів (201-600 нм). Аутоімунноподібні зсуви відповідають характеризуються максимальним переважанням найбільш високомолекулярної зони спектру (більше 600 нм).

Аналіз зсувів ЛК спектру сечі хворих на легеневий туберкульоз продемонстрував кореляцію з результатами досліджень плазми крові (табл. 5.12). Спостерігається значне переважання спектрів, характерних для гідролітично спрямованих змін (інтоксикаційних, дистрофічних, катаболічних) – 67%, що може бути пов'язано, у першу чергу, з прямою екскрецією низькомолекулярних компонентів плазми крові. Аутоімунні та алерго-аутоімунні зсуви спостерігаються лише в 10,1%. На відміну від розподілу ЛК спектрів КВВП та плазми, значно збільшений відсоток хворих, в яких спостерігаються нормологічні спектри (11% у порівнянні з 3% КВВП, $\chi^2 = 5,0$, $p = 0,02$, RR 3,6, CI 1,07-12,63). Ступінь гомеостатичних зсувів, що реєструються у сечі хворих, варіює від початкових

(n=35, 36,1%) до помірних (n=26, 26,8%) та виражених (n=36, 37,1%). Але розподіл ступеню змін нерівномірний при різних типах гомеостатичних зсувів: в групі хворих з аутоімунно-спрямованими зсувами виражені зміни відсутні, значно переважають початкові зміни (94,1% у порівнянні 36,1%, $\chi^2 = 19,7$, $p < 0,01$, RR 2,61, CI 1,95-3,49).

Таблиця 5.12

Диференціація гомеостатичних зсувів сечі хворих на вперше діагностований легеневий туберкульоз

Характер зсувів	Абс.кількість	%
0 – норма	12	11,0%
1 – алергоподібні	-	0%
2 - інтоксикаційні	31	28,4%
3 – дистрофічні	35	32,2%
4 – аутоімунні	7	6,4%
5 – катаболічні	7	6,4%
6 – алерго-інтоксикаційні	-	0%
7 – алерго-аутоімунні	4	3,7%
8 - недиференційовані	13	11,9%
Всього	109	

Характер гомеостатичних зсувів сечі у хворих з різною характеристикою туберкульозного процесу корелює з даними, отриманими при дослідженні плазми: у хворих з гідролітично спрямованими змінами рідше зустрічається інфільтративна форма туберкульозу ($\chi^2 = 3,7$, $p = 0,05$, RR 0,52, CI 0,30-0,91). Інших статистично достовірних розбіжностей за характером гомеостатичних зсувів між різними групами хворих за типом, формою та характеристикою туберкульозного процесу не виявлено.

Загальне клінічне дослідження сечі було проведено у всіх хворих. У 85% хворих спостерігалась лейкоцитурія, у 20% - помірна протеїнурія. Незначна лейкоцитурія (до 5 в п/з) переважала (78,5%), до 20 лейкоцитів в полі зору спостерігалась у 17,2% хворих, значна лейкоцитурія – у 3,2%. Розподіл типів

гомеостатичних зсувів при дослідженні сечі у групах хворих з незначною, помірною та вираженою лейкоцитурією, протеїнурією майже не відрізнялись та відповідали загальному розподілу. Таким чином, можна припустити, що ЛК спектри, що реєструються при дослідженні сечі хворих на туберкульоз легень без специфічного процесу в нирках, у більшій мірі відображують загальні організмові процеси, ніж локальні ниркові. Це також підтверджується збіжністю між характером гомеостатичних зсувів плазми та сечі: дистрофічно спрямовані зсуви реєструються одночасно в обох біологічних рідинах в 75% випадках. Ступень відповідності між ЛК спектрами КВВП та плазми і КВВП та сечею виявилась менш суттєвою (44,8% та 56,3% відповідно).

Цікавим виявилось переважання *GSTM-null* генотипу в групі хворих з дистрофічно спрямованими змінами в сечі (69,6%) у порівнянні з групою з інтоксикаційними зсувами (45,8%) ($\chi^2 = 2,7$, $p = 0,01$, RR 1,78, CI 0,99-3,65). Фермент GSTM, який є найважливішим фактором захисту від оксидативного стресу та приймає участь у знешкодженні багатьох сполук, є функціонально активним у нирках. При відсутності ферменту порушені процеси інактивації продуктів реактивних форм кисню, що супроводжується процесами пошкодження клітин з утворенням низькомолекулярних сполук та, можливо, проявляється реєстрацією дистрофічно спрямованих зсувів, які відповідають вираженому гідролізу гліколіпопротеїнових інгредієнтів клітини.

Таким чином, у хворих на туберкульоз легень дослідження КВВП, плазми та сечі методом ЛКС продемонструвало наступне:

- переважання катаболічно-спрямованих гомеостатичних зсувів над синтетично-спрямованими;
- у групі хворих з дистрофічними змінами КВВП частіше виявляється ХТБ ($\chi^2 = 3,7$, $p = 0,05$), наявність бактеріовиділення ($\chi^2 = 3,1$, $p = 0,06$), процес є більш розповсюдженим ($\chi^2 = 6,5$, $p = 0,01$) у порівнянні з групою хворих, в яких спостерігаються алергічні та алерго-аутоімунні зміни;
- у хворих з переважанням інтоксикаційних зсувів в КВВП частіше зустрічалась дисемінована форма процесу ($\chi^2 = 3,8$, $p = 0,05$), яка є більш тяжкою і зазвичай

супроводжується вираженою інтоксикацією, та деструктивні процеси в легенях ($\chi^2 = 4,0$, $p = 0,04$) у порівнянні з групою хворих з дистрофічними та алергоподібними змінами;

- найбільша відповідність між характеристиками туберкульозного процесу та гомеостатичними зсувами, що реєструються методом ЛКС спостерігається при дослідженні КВВП;

- в групі хворих з дистрофічно-спрямованими змінами, виявленими в КВВП та сечі частіше зустрічається *GSTM1-null* генотип, що можна пояснити біологічною функцією ферменту GSTM1;

- наявність катаболічно-спрямованих змін у конденсаті видихуваного повітря на початку захворювання асоційовано з більш тяжким перебігом захворювання та гіршими проміжними і віддаленими результатами лікування. Виявлення дистрофічних зсувів у КВВП на початку захворювання, таким чином, може стати фактором прогнозування меншої ймовірності зникнення клінічних проявів хвороби з припиненням бактеріовиділення на етапі стаціонарного лікування (OR 0,19, CI 0,05 – 0,66) та меншою ймовірністю одужання протягом двох років для хворих з ВДТБ легенів (OR 0,27, CI 0,08 – 0,96).

Матеріали розділу представлені в наступних наукових працях

1. Чеснокова М. М. Вплив на стан місцевого гомеостазу дихальних шляхів хворих на туберкульоз генетичних чинників глутатіон-S-трансфераз та особливостей генотипу *M. tuberculosis* / Ю. І. Бажора, М. М. Чеснокова, В. В. Шишкін // Одеський медичний журнал. – 2011. – Т. 124, № 2. – С. 34–36.

2. Чеснокова М. М. Оцінювання місцевого гомеостазу дихальної системи хворих на туберкульоз за даними лазерної кореляційної спектроскопії конденсату вологи видихуваного повітря / Ю. І. Бажора, М. М. Чеснокова, В. В. Шишкін // Досягнення біології та медицини – 2011. – № 1. – С.15–18.

3. Чеснокова М. М. Дослідження конденсату видихуваного повітря у хворих на легеневий туберкульоз / М. М. Чеснокова // ІХ читання ім. В.В.Підвисоцького, 27-28 травня 2010 р., Одеса : матеріали. – Одеса : Одес. держ. мед. ун-т, 2010. – С. 156.

РОЗДІЛ 6

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

При туберкульозній інфекції між організмами патогену та хазяїна формуються складні взаємовідносини, які можуть підтримуватись тривалий час. Перший контакт з *M. tuberculosis* супроводжується рядом імунних взаємодій, які визначають результат інфікування. Однак характер відповіді характеризується індивідуальною варіабельністю. Переважна більшість інфікованих залишається здоровими, а серед хворих маніфестація туберкульозу та імунна відповідь, як показано *in vitro* на прикладі Т- та В- клітинної реактивності [307] значно варіює. В патогенезі легеневого туберкульозу визначають чотири стадії [308]. Перша починається з вдихання мікобактерії туберкульозу та поглинання їх альвеолярними макрофагами. На цій стадії можливість знищення мікобактерії залежить від мікробіцидної активності макрофагів хазяїна та ступені вірулентності збудника. Мікобактерії, що не були знищені, починають розмножуватись та викликають руйнування макрофагу. Це обумовлює стимуляцію міграції моноцитів та інших запальних клітин у легені (друга стадія). Моноцити трансформуються у макрофаги, як поглинають, але не знищують мікобактерії. На цій симбіотичній стадії відбувається експоненціальний ріст кількості мікобактерії та акумуляція макрофагів, але пошкодження легеневої тканини є незначним. Через два-три тижні після інфікування розгортається Т-клітинна імунна відповідь, з активною проліферацією антиген-специфічних Т-лімфоцитів у місці первинного пошкодження та активацією макрофагів. На цьому (третьому) етапі активний ріст популяції мікобактерій закінчується. У центрі вогнища формується зона центрального казеозного некрозу, яка знижує парціальний тиск кисню та створює несприятливі для позаклітинного розмноження мікобактерій умови. Розвиток продуктивного запалення з формуванням гранульоми характерний для високого рівня неспецифічної та специфічної імунологічної реактивності організму. Інфекція стабілізується, але будь-які порушення імунного балансу може призвести до реактивації процесу.

Розплавлення некротичних тканин створює оптимальні умови для розмноження мікобактерій, прорив казеозного вмісту у порожнину бронху обумовлює дисемінацію процесу, а у порожнину судин – його генералізацію. Таким чином, кінцевий результат інфікування залежить від а) балансу між розмноженням та знищенням мікобактерій, б) ступеню некрозу, фіброзу і регенерації легеневої тканини, тобто визначається взаємодією генетично детермінованих факторів мікобактерії і організму хазяїна.

Проведене нами дослідження показало суттєвий вплив належності збудника генетичної родини Beijing на характер перебігу захворювання. Родина Beijing, або Східно-Азіатська філогеографічна лінія, вважається однією з найбільш успішних, оскільки знайдена в різних регіонах світу, часто асоційована зі спалахами хвороби та мультирезистентністю. Належність збудника до родини Beijing в хворих Одеського регіону нами було виявлено в ізолятах, отриманих від 30% хворих. Це відповідає розповсюдженості родини Beijing в Харківській області, де у хворих на тяжкі форми туберкульозу збудники Beijing виявляються в 32% і декілька більше, ніж в Миколаївській області (17,5%). Дані стосовно розповсюдженості родини Beijing в інших регіонах України відсутні, але наявна інформація свідчить про значну розповсюдженість цієї родини та актуальність вивчення особливостей туберкульозу при інфікуванні мікобактеріями цієї родини. Генотип Beijing частіше зустрічався в групі хворих, що є мешканцями міста Одеси ($\chi^2=4,3$, $p=0,03$; $RR=3,89$, CI 1,0-15,34) у порівнянні з мешканцями Одеської області, що дозволяє розцінювати проживання у місті як один з факторів ризику інфікування даним штамом (OR 4,29, CI 0,96 – 19,14).

Проведений аналіз патогенетичних особливостей туберкульозного процесу виявив відмінності в характеристиках туберкульозного процесу у разі інфікування збудниками, що належать до генетичної родини Beijing. В обстеженій нами групі частота інфікування штамми родини Beijing у хворих з вперше діагностованим туберкульозом легень (ВДТБ) склала 26,4%, в той час, як серед хворих, що неефективно лікувались раніше (рецидив туберкульозу або хронічний процес), частота інфікування штамми родини Beijing склала 43,5%. Серед хворих з ВДТБ,

інфікованих збудниками цієї родини більш важка дисемінована форма зустрічалась суттєво частіше, ніж інфільтративна (60,9% проти 30,5%, $\chi^2=4,29$ $p=0,03$), в той час як у хворих, інфікованих збудниками інших генетичних родин декілька переважала інфільтративна форма (53,1% проти 43,7%) захворювання. Позалегеневий туберкульоз (туберкульоз поза грудною порожниною) зустрічався тільки серед хворих, інфікованих збудниками родини Beijing. Важливим патогенетичним фактором, що пояснює підвищену здатність як до дисемінації, так і до генералізації процесу може бути зниження продукції TNF- α , який є вирішальним в формуванні гранульоми та обмежені інфекції.

Нами також виявлена підвищена тривалість бактеріовиділення при інфікуванні *M. tuberculosis* родини Beijing. Методом бактеріоскопії бактеріовиділення реєструвалось весь період стаціонарного лікування у 50% хворих, інфікованих збудниками родини Beijing, и лише у 11,5% хворих, інфікованих збудниками інших генетичних родин ($\chi^2=10,3$ $p=0,01$) при практично однаковій тривалості стаціонарного лікування. Продовження бактеріовиділення довше, ніж загальна тривалість стандартного режиму хіміотерапії при туберкульозі органів дихання (7 місяців) спостерігалась у 14,3% хворих, інфікованих збудниками родини Beijing, і лише в 1,9% хворих у разі інфікування збудниками інших генетичних родин. Отримані дані відповідають результатам проведеного в Індонезії в 2010 році дослідження, де після 6 місяців лікування в культурі з мокротиння мікобактерії виявлялись вдвічі частіше у хворих, інфікованих збудниками родини Beijing не залежно від профілю медикаментозної резистентності [309]. Суттєвим фактором в підвищеній тривалості бактеріовиділення може бути зниження рівню IFN γ з недостатньою для знищення мікобактерій активацією макрофагів та підвищена здатність мікобактерій родини Beijing до виживання в умовах гранульоми.

Наявність більш вираженої інтоксикації та зниженої імунологічної реактивності у хворих, інфікованих збудниками родини Beijing, в порівнянні з групою, від якої отримані збудники інших генетичних родин, підтверджується виявленими нами особливостями лейкоцитарної формули та розрахункових

гематологічних показників. У хворих, від яких отримані ізоляти родини Beijing, є суттєво зниженими лейкоцитарний індекс (відношення лімфоцитів до нейтрофілів, $0,26 \pm 0,13$ проти $0,40 \pm 0,28$, $p=0,03$), індекс співвідношення лімфоцитів та моноцитів (віддзеркалює співвідношення афекторної та ефекторної ланок імунологічного процесу, $2,64 \pm 1,69$ проти $4,28 \pm 2,84$, $p=0,008$), індекс співвідношення лімфоцитів та еозинофілів (віддзеркалює співвідношення процесів гіперчутливості сповільненого та негайного типів, $12,99 \pm 7,64$ проти $17,7 \pm 10,17$, $p=0,04$), індекс імунної реактивності ($2,77 \pm 1,73$ проти $4,64 \pm 3,05$, $p=0,004$). З іншого боку, лейкоцитарний індекс інтоксикації, який є показником процесів тканинної деградації та рівня ендогенної інтоксикації, в групі хворих, інфікованих збудниками родини Beijing, є достовірно підвищеним ($1,96 \pm 1,66$ проти $1,29 \pm 1,08$, $p=0,04$).

Питання стосовно підвищеної медикаментозної резистентності штамів родини Beijing не є остаточно з'ясованим, оскільки дані про резистентність збудників цієї родини значно варіюють у різних регіонах. В обстеженій нами групі серед ізолятів генотипу Beijing підвищеною виявилась резистентність до ізоніазиду та етамбутолу ($45,5\%$ проти $37,3\%$ та $39,4\%$ проти 29% відповідно) вторинної мультирезистентності ($57,5\%$ проти $39,1\%$) та, особливо, одночасної резистентності до всіх препаратів першого ряду ($21,2\%$ проти $10,6\%$). Є декілька гіпотез, що пояснюють підвищену резистентність: підвищена мутабельність штамів [230,236], особливості будови клітинної стінки, що створюють субоптимальну концентрацію протитуберкульозних препаратів [142,146,310], але *in vitro* підвищена частота формування резистентності у штамів родини Beijing не підтвердилась [231,311]. Отримані нами дані свідчать на користь гіпотези про оптимальні умови для селекції резистентних особин в умовах кращого виживання збудників цієї родини всередині гранульоми [245], оскільки первинна резистентність до протитуберкульозних препаратів I ряду достовірно не відрізнялась між ізолятами родини Beijing та інших генетичних родин, в той час як вторинна мультирезистентність та резистентність до всіх препаратів I ряду значно переважала.

Таким чином, інфікування збудниками родини Beijing супроводжується

розвитком більш тяжкої форми захворювання, та підвищеною тривалістю бактеріовиділення з формуванням одночасної резистентності до всіх препаратів першого ряду, що, з точки зору патогенезу, обумовлено недостатньо ефективною імунною відповіддю. Так, у ряді досліджень на трансгенних мишах та *in vitro* при інфікуванні мишиних і людських макрофагів, показано, що збудники цієї родини не достатньо стимулюють дозрівання антигенпрезентуючих дендритних клітин; на поверхні макрофагів спостерігається зниження експресії рецепторів TLR2, TLR4 та MHC класу II тощо. Наслідком є зниження продукції цитокінів, що індукують Th1-імунну відповідь (рис 5.1), та менший рівень утворення IFN- γ з недостатньою для знищення мікобактерій активацією макрофагів.



Рис. 5.1 Особливості імунної відповіді при туберкульозі при інфікуванні штамми *M.tuberculosis* родини Beijing

Відмінностями в імунній відповіді можна пояснити особливості перебігу

хвороби та знижену ефективність лікування в цієї групі хворих.

Проведений аналіз показав, що ефективність лікування хворих з вперше діагностованим туберкульозом, інфікованих збудниками родини Beijing та інших генетичних родин достовірно відрізнялась на стаціонарному етапі: покращення спостерігалось в 82,5% випадків у порівнянні з 52,3% при інфікуванні збудниками родини Beijing ($\chi^2=7,28$ $p=0,007$), померло на етапі стаціонарного лікування 5 (21,7%) хворих, від яких отримані ізоляти Beijing та лише 1 хворий (1,6%), інфікований *M. tuberculosis* інших генетичних груп ($\chi^2=10,7$ $p=0,001$). Це дозволяє віднести інфікування штамми генетичної родини Beijing до факторів несприятливого перебігу захворювання (95% CI 1,43-4,10; OR 4,32 95% CI 1,60-11,66). Результати проведеного дослідження свідчать, що визначення належності отриманих від хворих ізолятів до генетичної родини Beijing є доцільним для формування групи ризику по несприятливому перебігу легеневого туберкульозу для ретельного спостереження за перебігом захворювання та своєчасної корекції лікування. З епідеміологічної точки зору небезпечною є підвищена тривалість бактеріовиділення в останній групі, що вимагає постійного моніторингу розповсюдження цього штаму в популяції.

Оскільки необхідною умовою внутрішньоклітинного знищення мікобактерій є активація фаголізосоми, яка супроводжується оксидативним вибухом з утворенням реактивних форм кисню, важливим фактором у стані легеневої тканини є баланс між оксидативною та антиоксидантною системами. Реактивні форми кисню утворюються не лише клітинами імунної системи, але клітинами епітелію дихальних шляхів, ендотелію, потрапляють в у дихальні шляхи з тютюновим димом та атмосферними поллютантами. Найважливішими антиоксидантами є глутатіон-залежні ферменти, тому ступінь оксидативного стресу, і, відповідно, пошкодження клітин продуктами ПОЛ, залежить від активності глутатіонтрансфераз. Аналіз впливу генетично обумовленого поліморфізму ферментів GSTT1 та GSTM1 на особливості перебігу захворювання виявив переважання більш важкої дисемінованої форми туберкульозу у хворих з *GSTT1-null* та підвищення частоти деструктивних процесів у легенях у хворих з *GSTM1-*

null генотипом. Наявність ферменту GSTM1 виявилась протективним фактором щодо розвитку деструкцій у легенях (OR 0,36 CI 0,17 - 0,74). Про найважливішу роль GSTM1 у захисті проти реактивних форм кисню, що утворюються при імунній відповіді свідчить більш суттєві відмінності у частоті деструкцій між групами хворих з наявністю та відсутністю ферменту без звички до куріння, ніж між групами хворих з наявністю ферменту, які відрізняються звичкою до куріння. Найвищою частота деструкцій виявилась при наявності ферменту GSTT1+ з одночасною відсутністю активності GSTM1. Подібна комбінація за даними літератури була також асоційована з максимальною чутливістю до негативних ефектів пасивного куріння у дітей [111] та підвищеного ризику розвитку бронхіальної астми [115] Можливо, це пов'язано з найважливішою роллю ферменту GSTM1 у легеневої тканині, коли навіть функціональна алель ферменту GSTT1 не компенсує нестачі, але це питання потребує подальшого вивчення з детальним аналізом субстратів та продуктів глутатіонтрансфераз в дихальних шляхах. Роль *GSTM1-null* генотипу у розвитку хронічних обструктивних захворювань легенів показана у ряді досліджень [102-105], тому передбачуваним виявилось частіше поєднання туберкульозу з пара- та мета-туберкульозним ХОЗЛ серед хворих з відсутністю GSTM1.

Місцеві імунні реакції, оксидантно-антиоксидантні процеси супроводжується зміною вмісту великої кількості біологічно активних сполук рідини, що вкриває епітелій дихальних шляхів. Дослідження конденсату вологи видихуваного повітря (КВВП) методом ЛКС дозволяє оцінити стан місцевого гомеостазу, що при туберкульозній інфекції проведено нами вперше. У хворих з вперше діагностованим туберкульозом взагалі переважають низькомолекулярні фракції КВВП з розміром часток до 100 нм, що пояснюється альтерацією тканин аж до некрозу, зі збільшенням вкладу низькомолекулярної субфракції, характерної для дистрофічних процесів Це віддзеркалює більш важкий перебіг туберкульозу: переважає дисемінована форма ($\chi^2 = 3,8$, $p = 0,05$), процес є більш розповсюдженим ($\chi^2 = 6,5$, $p = 0,01$), частіше зустрічається деструкція ($\chi^2 = 4,0$, $p = 0,04$). З іншого боку, важливим механізмом у

формуванні клітинного протитуберкульозного імунітету є реакції гіперчутливості сповільненого типу, спрямовані на формування гранульоми, що супроводжується реєстрацією в конденсаті видихуваного повітря високомолекулярних сполук (алергічна, алерго-аутоімунна компонента). Нами виявлено, що проміжні та віддалені результати лікування є кращими в групі хворих з наявністю високомолекулярних сполук в КВВП ($\chi^2 = 7,2$, $p = 0,05$, RR 2,1, CI 1,20 – 3,67). Наявність дистрофічно спрямованих зсувів у КВВП на початку захворювання дозволяє прогнозувати меншу ймовірність зникнення клінічних проявів хвороби та припинення бактеріовиділення на етапі стаціонарного лікування (OR 0,19, CI 0,05 – 0,66). Подібна тенденція зберігається й при аналізі віддалених результатів, де одужання також спостерігалось частіше в групі хворих з алергічними та алерго-аутоімунними зсувами ($\chi^2 = 4,2$, $p = 0,04$, RR 0,49, CI 0,24 – 1,0;) на початку захворювання. Виявленні дистрофічних гомеостатичних зсувів на початку захворювання асоціюється з меншою ймовірністю одужання протягом двох років для хворих з ВДТБ легенів (OR 0,27, CI 0,08 – 0,96). Інфікування хворих штамами Beijing супроводжується вираженими порушеннями в місцевому гомеостазі дихальної системи хворих, про що свідчить виявлення інтоксикаційних або алергоподібних зсувів. При інфікуванні штамами інших генетичних груп в значній кількості зустрічаються ЛК-спектри змішаного типу та ті, що мають нормоподібний тип. Цікавим є, що групі з наявністю гену *GSTM1* катаболічно-та алергоподібно-спрямовані зміни були знайдені з майже однаковою частотою, у той час як в групі з *GSTM1-null* генотипом дистрофічні зсуви зустрічались суттєво частіше, ніж алергоподібні, а найчастішою комбінацією при дистрофічних змінах (як і при наявності деструктивних процесів у легенях) стала *GSTM1+* *GSTM1-*. Таким чином, дослідження конденсату видихуваного повітря є інформативним методом визначення місцевого гомеостазу дихальних шляхів та може бути використаний для прогнозування ефективності лікування.

Між характеристикою туберкульозного процесу та характером гомеостатичних зсувів плазми крові і сечі у порівнянні з КВВП існує менша відповідність. Статистично достовірним є лише переважання інфільтративної форми

туберкульозу у хворих з синтетичними характером гомеостатичних зсувів в порівнянні з групою хворих з катаболічним напрямком зсувів, що рееструються в плазмі крові ($\chi^2 = 4,4$, $p = 0,03$, RR 0,5, CI 0,32-0,79).

Таким чином, отримані результати є одним з кроків до розв'язання надзвичайно важливого та складного завдання – за дослідженням особливостей генотипу *M.tuberculosis* та особливостей генотипу інфікованої людини, що впливають на патогенетичні процеси у системі «хазяїн-патоген», прогнозувати перебіг туберкульозного процесу. Нами визначений фактор ризику несприятливого перебігу захворювання – інфікування збудниками генетичної родини Beijing, показаний вплив поліморфізму за генами *GSTT1* та *GSTM1* на особливості ураження легеневої тканини та продемонстрована можливість використання ЛКС дослідження КВВП для прогнозування результату легеневого туберкульозу. Результати дослідження можуть бути використані в практичній роботі протитуберкульозних при удосконаленні лікувальних та профілактичних заходів. Своєчасне формування групи ризику та моніторинг перебігу процесу дозволить оптимізувати лікування, знизити ризик несприятливого результату, виділити групу найбільш епідеміологічно небезпечних хворих, що надає нові можливості у профілактиці та контролі захворювання.

Матеріали розділу представлені в наступних наукових працях:

1. Чеснокова М. М. Патогенетичні особливості взаємодії у системі “Паразит-хазяїн” при інфікуванні *M. tuberculosis* родини Beijing / Ю. І. Бажора, М. М. Чеснокова, Н. А. Левицька // Одеський медичний журнал. – 2009. – № 1. – С. 33–36.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено нове розв'язання актуального наукового завдання патологічної фізіології - встановлення впливу патогенетичних особливостей легеневого туберкульозу, які визначаються певними генетичними особливостями організмів збудника та хазяїна, встановлені патогенетичні критерії виявлення груп ризику за тяжкістю туберкульозного процесу.

1. У хворих на туберкульоз легенів, інфікованих збудниками родини Beijing, захворювання характеризується більш важким перебігом з переважанням дисемінованої форми захворювання над інфільтративною та більшою тривалістю бактеріовиділення. Покращення на етапі стаціонарного лікування спостерігалось в 82,5 % випадків порівняно з 52,3 при інфікуванні збудниками родини Beijing ($p < 0,01$).

2. Встановлено, що частота поліморфних варіантів *GSTT1* та *GSTM1* достовірно не відрізняється між групою хворих на туберкульоз і контрольною групою. У хворих з *GSTT1-null* генотипом частіше спостерігається дисемінована форма туберкульозу порівняно з інфільтративною. *GSTM1-null* генотип асоційований з підвищеною частотою деструктивних процесів у легенях, особливо в групі хворих з ВДТБ, в той час як наявність ферменту *GSTM1* можна враховувати як протективний фактор щодо розвитку деструкцій у легенях. З найвищою частотою деструкцій асоційована комбінація *GSTT1+* *GSTM1-* ($p < 0,05$), що може свідчити про менш ефективний метаболізм ксенобіотиків та продуктів перекисного окиснення ліпідів при цьому генетичному варіанті. Серед хворих з *GSTM1-null* генотипом достовірно частіше спостерігається поєднання туберкульозу з ХОЗЛ з емфіземою, пневмосклерозом та дихальною недостатністю I–II ступеней.

3. Тяжкість перебігу легеневого туберкульозу у хворих з різними варіантами *GSTT1* та *GSTM1* не залежить від особливостей генотипу різних штамів *M. tuberculosis* (належності до генетичної родини Beijing)

4. При інфікуванні штамми родини Beijing порівняно з іншими генетичними

родинами спостерігається переважання вторинної мультирезистентності (57,5 проти 39,1 %) та вторинної резистентності до всіх протитуберкульозних препаратів І ряду (35,7 проти 17,4 %).

6. У хворих на туберкульоз легенів встановлені суттєві зрушення системного та місцевого гомеостазу за даними ЛКС плазми крові та КВВП. Як на місцевому, так і на системному рівні переважають катаболічно спрямовані зсуви над синтетично спрямованими. Найбільша відповідність між характеристиками туберкульозного процесу та гомеостатичними зсувами, що реєструються методом ЛКС, спостерігається при дослідженні КВВП.

7. Наявність катаболічно-спрямованих змін у конденсаті видихуваного повітря на початку захворювання асоційована з більш тяжким перебігом захворювання та гіршими проміжними і віддаленими результатами лікування, що може стати фактором прогнозування меншої ймовірності зникнення клінічних проявів хвороби з припиненням бактеріовиділення на етапі стаціонарного лікування та меншої ймовірністю одужання протягом двох років для хворих з ВДТБ легенів. В групі хворих з катаболічно-спрямованими змінами, виявленими в КВВП, частіше зустрічається *GSTM1-null* генотип.

8. Тяжкість перебігу, низька ефективність лікування, підвищена ймовірність вторинної мультирезистентності та висока летальність при інфікуванні штамами родини Beijing дозволяють віднести інфікування штамами цієї генетичної родини до факторів несприятливого перебігу захворювання.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Global tuberculosis control – epidemiology, strategy, financing. WHO Report 2009 [Електронний ресурс] - Режим доступу до документу: http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/en/index.html
2. Maartens G. Tuberculosis / G. Maartens, R. J. Wilkinson // *Lancet*. – 2007. – Vol. 370. – P. 2030-2041.
3. Ю.І. Фещенко Пропозиції щодо поліпшення контролю за туберкульозом в Україні//Доповідь на нараді в МОЗ України 7 лютого 2008 року. [Електронний ресурс] - Режим доступу до документу: http://www.ifp.kiev.ua/index_ukr.htm
4. Резолюція IV з'їзду фтизіатрів і пульмонологів України, м. Київ, 20 – 22 жовтня 2008 р. [Електронний ресурс] - Режим доступу до документу: http://www.ifp.kiev.ua/index_ukr.ht
5. Vynnycky E. The natural history of tuberculosis: the implication of age-dependent risks of disease and the role of reinfection / E.Vynnycky, P.E Fine. // *Epidemiol. Infection*.- 1997. - V.119. - P. 183-201.
6. Assesment of the interleikin 1 gene cluster and other candidate gene polymorphpism in host susceptibility to tuberculosis / R. Bellamy, C. Ruwende, T. Corrah [et al.] // *Tubercule and Lung disease*. – 1998.- Vol.79. – P. 83–89.
7. Фещенко Ю.І. Сучасні методи діагностики, лікування і профілактики туберкульозу/ Ю.І. Фещенко, В.М. Мельник - К.: Здоров'я, 2002. – 904 С.
8. Молекулярно-генетические механизмы туберкулезной инфекции/Ю.И. Бажора, В.И Кресюн., Ю.И. Фещенко [и др.]- Одеса: Одес.держ.мед.ун-т, 2005. - 296 С.
9. Инсанов Али. Туберкулез/Али Инсанов. – М.: ГЭОТАР, 2005. – 704 С.
10. A mutation in the interferon- γ and interleukin-10 gene polymorphism in pulmonary tuberculosis / D.Lopez-Maderuelo, F. Arnalich, R. Serantes [et al.] // *American Journal of respiratory and critical care medicine*. – 2003 - Vol. 167.- P. 970–975.
11. Апт А.С. Туберкулез: патогенез, иммунный ответ и генетика хозяина/ А.С. Апт, Т.К. Кондратьева // *Молекулярная биология*. – 2008.- Т.42, №5. - С.880–890.

12. Тюлькова Т.Е. Особенности функционирования иммунной системы при туберкулезной инфекции / Т.Е. Тюлькова, Ю.П. Чугаев, Э.А. Кашуба // Проблемы туберкулеза и болезней легких. - 2008.- № 11.- С 48–55.
13. Algood H. Chemokines and tuberculosis / H. Algood, J. Chan, J. Flynn // Cytokine & Growth Factor Reviews.- 2003. - V.14 – P.467–477.
14. Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence / I. Smith // Clin.Microbiology Reviews.- 2003.- Vol.16, №3.- P. 463–496.
15. Brightbill H.D. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors / H.D.Brightbill, D.H. Libraty, S.R Krutzik // Science.- 1999.- V.285.- P. 732–736.
16. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function / T.B. Geijtenbeek, S.J. van Vliet, E.A. Koppel [et al.] // J.Exp.Med. – V.197. – P.7–17.
17. Palomino J.C. Tuberculosis. From basic science to patient care / J.C. Palomino, S.C. Leao, V. Ritacco – 2007. - 675 P. [Электронный ресурс] - Режим доступа до документу - <http://www.TuberculosisTextbook.com>
18. Cole S.T. Tuberculosis and the tubercle bacillus / S.T. Cole, K.D Eisenach., D.N. McMurray: ASM Press, 600 P.
19. Flynn J.L. Why is INF- γ insufficient to control tuberculosis? / J.L/ Flynn // Trends Microbiol. – 1999. – Vol.7 (N 12). – P. 477–478.
20. MacMicking J. Nitric oxide and macrophage function / J. MacMicking, Q.W. Xie, C. Nathan // Annu Rev Immunol. - 1997. - № 15. - P. 323-350.
21. The inducible nitric oxide synthase locus confers protection against aerogenic challenge of both clinical and laboratory strains of *Mycobacterium tuberculosis* in mice / C.A. Scanga, V.P. Mohan, K. Tanaka [et al.] // Infect. Immun. – 2001.- V.69.- P. 7711-7717.
22. Роговий Ю.Є. Цитокинова регуляція запалення при туберкульозі легень / Ю.Є. Роговий, М.М.Кузьмін, В.І. Сливка // Одеський медичний журнал.- 2004.- № 3.- С. 111—114.

23. Имангулова М.М. Молекулярно-генетические аспекты туберкулеза легких / М.М. Имангулова, А.С. Карунас, Э.К. Хуснутдинова // Медицинская генетика. - 2005.- Т.4(№11). - С 505 – 511.
24. Kallmann F.J. Twin studies on the significance of genetic factors in tuberculosis / F.J. Kallmann, D. Reisner // *Am.rev.Tuberculosis.* – 1943. – Vol. 43. – P 549–574.
25. Simonds B. Tuberculosis in Twins / B. Simonds - London: Pitman Medical Publishing Co. Ltd., 1963 – 200 P.
26. Bellamy R. Genetic susceptibility to tuberculosis / R. Bellamy // *Clin Chest Med.*- 2005.- V. 26.- P. 233-246.
27. Bates J.H. The history of tuberculosis as a global epidemic / J.H. Bates, W.W. Stead // *Med Clin North Am.* – 1993.- V.77. – P. 1205-1217.
28. Human leukocyte antigen HLA-linked control of susceptibility to pulmonary tuberculosis and association with HLADR types / S.P. Singh, N.K. Mehra, H.B. Dingley [et al.] // *Journal of Infectious Diseases.*- 1983.- V.148.- P. 676-681.
29. HLA haplotype segregation study in multiple case families of pulmonary tuberculosis / S.P. Singh, N.K. Mehra, H.B. Dingley [et al.] // *Tissue Antigens.*- 1984.- V.23.- P. 84-111
30. Balamurugan A. Human Leukocyte Antigen Class I Supertypes Influence susceptibility and severity of tuberculosis/A. Balamurugan, S.K. Sharma, N.K. Mehra // *Journal of Infectious Diseases.* – 2004.- V189.- P 805–811.
31. Иммуногенетические аспекты течения и лечения туберкулеза легких / Л.И. Арчакова, Л.А. Скворцова, Б.Е. Кноринг [и др.] // *Проблемы туберкулеза и болезней легких* .- 2008.- № 12.- С. 34–37.
32. Роль генотипа HLA-DR-B1 в комплексной терапии туберкулеза органов дыхания / Л.А. Скворцова, М.В. Павлова, М.Н. Кондакова [и др.] // *Проблемы туберкулеза и болезней легких.*- 2008.- № 12.- С. 37–39.
33. X-linked chronic granulomatous disease: first report of mutations in patients of Argentina / C. Barese, S. Copelli, R. Zandomeni [et al.] // *J Pediatr Hematol Oncol.*- 2004.- V.26. – P. 656-660.

34. Skamene E. The Bcg gene story / E. Skamene // Immunobiology.- 1994.- V. 191.- P. 451-460.
35. Genetic control of resistance to experimental infection with virulent *Mycobacterium tuberculosis* / I. Kramnik, W.F. Dietrich, P. Demant [et al.] // Proc Nat Acad Sci U A – 2000. – V. 97. – P.8560-8565.
36. Genetic control of susceptibility to infection with *Mycobacterium tuberculosis* in mice / L.V. Mitsos, L.R. Cardon, A. Fortin [et al.] // Genes Immun – 2000.- V.1 – P. 467–477.
37. Toll-like receptor 4 expression is required to control chronic *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice / B. Abel, N. Thieblemont, V.J. Quesniaux [et al] // J Immunol – 2002. V.169 – P. 3155-3162.
38. Ipr1 gene mediates innate immunity to tuberculosis / H. Pan, B.S. Yan, M. Rojas [et al.] // Nature. – 2005. – V.434.- P.767-772.
39. Bellamy R. Genome-wide approaches to identifying genetic factors in host susceptibility to tuberculosis./ R. Bellamy // Microbes Infect – 2006. – V.8.- P.1119-1123.
40. Casanova J.L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model / J.L. Casanova, L. Abel // Annu Rev Immunol. – 2002.- V.20.- P. 581-620.
41. Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the Nramp 1 protein is recruited to the membrane of the phagosome / S. Gruenheid, E. Pinner, M. Desjardins [et al.] // J.Exp.Med.- 1997.- V.185.- P. 717-730.
42. Forbes J.R. Iron, manganese and cobalt transport by Nramh 1(Slc11a1) and Nramp 2(Slc11a2) expressed at the plasma membrane / J.R. Forbes, P. Gross // Blood.- 2003.- V.102 – P. 1884-1892.
43. Forbes J.R. Divalent –metall transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions / J.R. Forbes, P. Gross // Trends Microbiol.- 2001.- №9.- P. 397–407.
44. Host genetics of mycobacterial diseases in mice and men: forward genetic studies of BCG-osis and tuberculosis / F.Fortinj, L. Abel, J. Casanova [et al.] // Ann. Rew.Ggenomics Hum.Genet. – 2007.-V.8 – P.163-192.

45. Мишин В.Ю. Состояние процессов активизации Т-лимфоцитов и их регуляторных субпопуляций у больных туберкулезом легких / В.Ю. Мишин А.С. Павлюк, Л.В. Ковальчук // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 1995. - № 4. - С. 38–40.
46. Apoptosis and T cell hyporesponsiveness in pulmonary tuberculosis / C.S.Hirsh, Z. Nooosi, G. Vanham [et al.] // J.Infect. Dis. – 1999.- Vol 179(N 4).- P 945–953.
47. Henson P.V. Possible roles for apoptosis and apoptotic cell recognition in inflammation and fibrosis / P.V. Henson // Am.J.Resp.Cell.Mol.Biol. – 2003.- V.29.- P. 870-876.
48. *Ipr1* gene mediates innate immunity to tuberculosis / H. Pan, B. Yan, Y.V. Shebzukhov [et al.] // Nature.- 2005.- V.434. – P.767-772.
49. 1,25 dihydroxyvitamin D₃ induces nitric oxide synthase and suppresses growth of Mycobacterium tuberculosis in a human macrophages-like cell line / K.A. Rockett, R. Brookes, I. Udalova [et al.] // Infect.Immunol. – 1998. – V.66.- P.5314-5321.
50. Influence of vitamin D deficiency and vitamin D receptor polymorphism on tuberculosis among Gujarati Asians in west London: a case-control study/Wilkinson R., Llewelyn M., Toossi Z. [et al.]//Lancet.- 2000.- V.355.- P.618-621.
51. Association of vitamin D receptor gene variants of BsmI, ApaI, TaqI and FokI polymorphisms with susceptibility or resistance to pulmonary tuberculosis/ P. Selvaraj, G. Chandra, S.M. Kurian [et al.] // Curr.sci. – 2003. – V.84. – P.1564-1568.
52. Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type / S. Roy, A. Frodsham, B. Saha [et al.] // J.infect.Dis. – 1999.- V.179. – P.187-191.
53. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response / P. Lui, S. Stenger, H. Li [et al.] // Science.- 2006.-V.311. – P.1770-1773
54. Collins H.L. The many faces of the host response to tuberculosis / H.L. Collins, S.H. Kaufmann //Immunology.- 2001.-V.103.- P.1-9.
55. An antimicrobial activity of cytotoxic T-cells mediated by granulysin / S. Stenger, D. Hanson, R. Teitelbaum // Science.- 2002.- V.282.- P.121-125.
56. Tuberculosis with patients with various HLA phenotypes / A.G. Khomenko, V.I. Litvinov, V.P. Chukanova [et al.] // Tuberculosis – 1990. – Vol.71. – P. 187 – 192.

57. Hill A. The immunogenetics of human infection diseases / A. Hill // *Ann. Rev. Immunol.* – 1998. - № 16. – P. 593-617.
58. Prandota J. Important role of prodromal viral infection responsible for inhibition of xenobiotic metabolizing enzymes in the pathomechanism of idiopathic Reye's syndrome, Stevens-Johanson syndrome, autoimmune hepatitis and hepatotoxicity of therapeutic doses of acetaminophen used in genetically predisposed / J. Prandota // *Am. J. Ther.* – 2002. – V. 9. – P. 149-156.
59. Polymorphism of the N-acetyltransferase 2 gene as a susceptibility risk factor for antituberculosis drug-induced hepatitis / Y. S. Huang, H. D. Chern, W. J. Su [et al.] // *Hepatology.* – 2002. – V. 35. - № 4. – P. 883-889.
60. Eaton D. Concise Review of the Glutathione S-transferases and their significance to toxicology / D. Eaton, T. Bammler // *Toxicological science* – 1999. – V.49 – P.156–164.
61. Ketterer B. Glutathione S-transferases and prevention of cellular free radical damage / B. Ketterer // *Free Radic Res* – 1998. – V.28(№6). - P.647-658.
62. Куценко С.А. Основы токсикологии / С.А. Куценко – Санкт-Петербург, 2002 - [Электронный ресурс] - Режим доступа до документу: <http://www.medline.ru/monograf/toxicology>
63. Кулинский В.И. Обезвреживание ксенобиотиков / В.И. Кулинский // *Соровский образовательный журнал* – 1999. - №1. – С.8-12.
64. Жолдакова З.И. Механизмы процессов биоактивации чужеродных химических веществ под действием ферментных систем организма / З.И. Жолдакова, Н.В. Харчевникова // *Журнал Российской академии наук* – 2002. - №3. – С.44–49.
65. Кулинский В.И. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред и защита / В.И. Кулинский, 2007 - [Электронный ресурс] - Режим доступа до документу: <http://www.redox.ru/science/>
66. Detoxication of base propenals and other alpha, beta-unsaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxydation by human glutathione transferases / K. Berhane, M. Widersten, A. Engstrum [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA* – 1994.- V.91, №40. – P. 1480-1484.

67. Population-specific GSTM1 copy number variation / R.S. Huang, P. Chen, S. Wisel [et al.] / *Human Molecular Genetics* – 2009. – V.18, №2. - P. 366–372.
68. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity of human glutathione transferases / R. Hurst, Y. Bao, P. Jemth [et al.] // *Biochem J.* - 1998. – V.332.- P.97 – 100.
69. Heterogenous expression and polymorphic genotype of glutathione S-transferases in human lung / A. M. Cantlay, C. A. Smith, W. A. Wallace [et al.] // *Thorax* – 1994. – V. 49, №10. – P.1010–1014.
70. Glutathione S-transferases of human lung: characterization and evaluation of the protective role of the alfa-class isozymes against lipid peroxidation / S.S. Singhal, M. Saxena, Y. Ahmad [et al.] // *Arch Biochem Biophys* – 1992.- V. 299, №2. – P.232-241.
71. Reddy P.M. Gluthathione S-transferase in tracheobronchial epithelium / P.M. Reddy, C.P. Tu, R. Wu // *Am J Phisiology* – 1995.- V.269, №4. – P.473-481.
72. Gluthathione S-transferases of rabbit lung macrophages / R.J. Morrison, S.S. Singhal, A. Bidani [et al.] // *Toxicol Appl Pharmacol.* - 1998. – V.148, №2. – P.229–236.
73. Тарасова Л.А. Современные формы профессиональных заболеваний / Л.А. Тарасова, Н.С. Сорокина // *Медицина труда и пром. экол.* – 2003. - № 5.- С. 29– 33.
74. Стрельцова Е.Н. Влияние неблагоприятных экологических факторов на органы дыхания / Е.Н. Стрельцова // *Проблемы туберкулеза и болезней легких* - 2007. - № 3. – С.3-7.
75. Сон И.М. Демография, экология и заболеваемость населения туберкулезом / И.М. Сон., Г.Я. Андрюхина, С.И. Модорская // четвертый съезд науч.-мед. ассоц. Фтизиатров: тезисы докладов. - Йошкар-Ола, 1999. – С.14.
76. Влияние антропогенного загрязнения атмосферного воздуха на туберкулез / В.А. Соколов, Д.Н. Голубеев, Б.И. Никонов [и др.] // четвертый съезд науч.-мед. ассоц. Фтизиатров: тезисы докладов. - Йошкар-Ола, 1999. – С.41.
77. Полиморфизм глутатион-s-трансфераз М1 и Т1 в ряде популяций России / С.Н. Попова, П.А. Сломинский, С.Н. Галушкин [и др.] // *Генетика* – 2002. – Т.38, №2. - С.281-284.

78. Characterization of the human class Mu glutathione S-transferase gene cluster and GSTM1 deletion / S. Xu, Y. Wang, B. Roe [et al.] // *J.Biol.Chemistry* – 1998. – V.273. – P.3517– 3527.
79. Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilben oxide are due to a gene deletion / J. Seidegard, W.R. Vorachek, R.V. Pero [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA* – 1988.- V.85 – P. 7293-7297.
80. Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism / S. Pemble, K.R. Schroeder, S.R. Spencer [et al.] // *Biochem J.* – 1994. – V. 300. – P. 271-276.
81. OMIM (On-line Mendelian inheritance in man).- [Электроний ресурс] - Режим доступа до документу: - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
82. Frequencies of *GSTM1*, *GSTT1*, and *GSTP1* polymorphisms in a Brazilian population / A. Rossini, D. Rapozo, L. Amorim [et al.] // *Online journal of genetics and molecular research.* - [Электроний ресурс] - Режим доступа до документу: http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2002/vol3-1/gmr0028_full_text.htm
83. The glutathione S-transferases: influence of polymorphism on cancer susceptibility. In: *Metabolic Polymorphisms and Susceptibility to Cancer* / P. Vineis, N. Malats, M.Lang [et al.] // *IARC Scientific Publications.* - №148.- Lyon, France,- P. 231-249.
84. Bolt H.M. Genetic and individual differences in the process of biotransformation and their relevance for occupational medicine / H.M. Bolt // *Med.Lav.* – 1994.- V.85. – P.37-48.
85. Markers of genetic susceptibility in human environmental hygiene and toxicology: the role of selected CYP, NAT and GST genes / R. Thier, T. Brning, P.H. Roos [et al.] // *Int J Hyg Environ Health* – 2003. – V. 206, №3. - P.149-171.
86. Glutathione-S-Transferase Polymorphisms and Colorectal Cancer: A Huge Review / S. C. Cotton, L. Sharp, J. Little [et al.] // *American Journal of Epidemiology* - 2000. -V. 151, №1. – P. 7-32.
87. Pooled analysis and meta-analysis of glutathione S-transferase M1 and bladder cancer: A Huge review / L. S. Engel, E. Taioli, R. Pfeiffer [et al.] // *Am. J. Epidemiol.* - 2002. – V.156. – P. 95–109.

88. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations / S. Garte, L. Gaspari, A.K. Alexandrie [et al.] // *Cancer Epidemiol Biomarkers Rev.* - 2001. – №.10. - P.1239–1248.
89. The Glutathione S-Transferase M1 Genotype in Ovarian Cancer / T. Lallas, S. McClain, M. Shahin [et al.] // *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* - 2000. - V. 9. – P.587–590.
90. Glutathione S-transferase mu locus: use of genotyping and phenotyping assays to assess association with lung cancer susceptibility / S. Zhong, A.F. Howie, B. Ketterer [et al.] // *Carcinogenesis* – 1991. – V.12. – P.1533–1537.
91. Rezska E. Significance of genetic polymorphisms in glutathione S-transferase multigene family and lung cancer risk / E. Rezska, W. Wasowicz // *Int J of Occup Med and Env Health* – 2001.- V. 14, №2. – P. 99-113.
92. Ye Z. Glutathione s-transferase polymorphisms (GSTM1, GSTP1 and GSTT1) and the risk of acute leukaemia: a systematic review and meta-analysis / Z. Ye, H. Song // *Eur.J.Cancer.*- 2005.- V.41, №7. - P. 980-989.
93. Фетисова И.Н. Полиморфизм генов глутатион-S-трансфераз в семьях с первичным бесплодием / И.Н. Фетисова // *Медицинская генетика.* – 2006. – Т5, №11 – С.31-34.
94. Glutathione S-transferase genotypes modify lung function decline in the general population:SAPALDIA cohort study / M. Imboden, S. Downs, S. Senn [et al.] // *Respir.Res.* – 2007.- V.8, №2. - P.2-8.
95. Vitamin A, cigarette smoking, and airway obstruction / A. Morabia, A. Sorenson, S.K. Kumanyika [et al.] // *Am.Rev Respir Dis* 1989. - V. 140. – P. 1312-1316.
96. Dietary antioxidant vitamin intake and lung function in the general population / J.R. Britton, I.D. Pavord, K.A. Richards [et al.] // *Am J Respir Crit Care Med.* - 1995. - V. 151.- P.1383-1387.
97. Antioxidant intake, GSTM1 polymorphism and pulmonary function in healthy young adults / Tujague J., Bastaki M., Holland N. [et al.] // *Eur Respir J.* - 2006.- V.27. – P.282-288.

98. Kelly F.J. Air pollution and the elderly: oxidant/antioxidant issues worth consideration / F.J. Kelly, C. Dunster, I. Mudway // *Eur Respir J Suppl* 2003. – V. 40. – P.70s-75s.
99. Antioxidant gene polymorphism and susceptibility to a rapid decline in lung function in smokers / J. He, J. Ruan, J. Conett [et al.] // *Am J Respir Crit Care Med.* - 2002. - V. 166.- P.323-328.
100. Combined effect of polymorphic GST genes on individual susceptibility to lung cancer / S.T. Saarikoski, A. Voho, V. Reinikainen [et al.] // *Int J Cancer* - 1998. – V. 77. – P.516-521.
101. Combined analysis of germline polymorphism of p53, GSTM1, GSTT1, CYP1A1 and CYP2E1: relation to the incidence rate of cervical carcinoma / J. Kim, C. Lee, Y. Park [et al.] // *Cancer.* – 2000.- V.88.- P.2080-2091.
102. Peculiarities of the GSTM1 0/0 genotype in French heavy smokers with various types of chronic bronchitis / H. Baranova, G. Perriot, E. Albuisson [et al.] // *Human genetics.*- 1997.- V.99.- P.822-826.
103. Silverman E. Progress in chronic obstructive pulmonary disease genetics / E. Silverman // *The proceedings of the American thoracic society.*- 2006.- №3.- P.405-408.
104. Genetic polymorphism of epoxide hydrolase and glutathione S-transferase in COPD / S. Cheng, C. Yu, C. Chen [et al] // *Eur Respir J.*- 2004.-V.23, №6. – P.818-824.
105. Glutathione S-transferase M1 gene polymorphism is related to COPD in patients with non-small-cell lung cancer / R. Tkacova, J. Salagovic, M. Cepricova [et al.] // *Wien Klin Wochenschr.*- 2004.-V.11, №4. - P.131-134.
106. Glutathione-S-transferases in lung and sputum specimens, effects of smoking and COPD severity / T. Harju, W. Mazur, H. Merikallio [et al] [Электронный ресурс] - Режим доступа до документу: <http://respiratory-research.com/content/9/1/80>
107. Glutathione-S-transferase gene polymorphisms (GSTT1, GSTM1, GSTP1) as increased risk factors for asthma / L. Tamer, M. Calikoğlu, N. Ates [et al.] // *Respirology.* – 2004.-V.9.- P.493.

108. Kleeberger S. Gene-environment interactions in asthma and other respiratory diseases / Kleeberger S., D. Peden // *Annual review of medicine.*- 2005.- V.56.- P.383-400.
109. Ober C. Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery / C. Orber, S. Hoffjan // *Genes and immunity.*- 2006.- V.7, № 2. - P. 95.
110. Ляхович В.В. Роль ферментов биотрансформации ксенобиотиков в предрасположенности к бронхиальной астме и формировании особенностей ее клинического фенотипа / В.В. Ляхович, В.А. Вавилин, С.И. Макарова // *Вестник РАМН.* – 2000. – №12.- С.36-41.
111. Генетический полиморфизм глутатион-S-трансферазы M1 и T1 у детей, больных бронхиальной астмой / В.А. Вавилин, О.Б. Часовникова, В.В. Ляхович [и др.] // *Вопросы медицинской химии.*- 1997. - Т.43, №5. - С. 23-30.
112. Yim J. Genetic susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease in Koreans: combined analysis of polymorphic genotypes for microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase M1 and T1 / J. Yim, G. Park, C. Lee // *Thorax.* - 2000. - V.55. - P.121–125.
113. Rihong Z. Genetic polymorphisms of MnSOD, GSTM1, GSTT1, and OGG1 in coal workers' pneumoconiosis / Z. Rihong, L. Geoffrey, G. Xianmin [et al.] // *Journal of Occupational & environmental medicine.*- 2002.- V.44, №4. - P.372-377.
114. Glutathione S-transferase and N-acetyltransferase genotypes and asbestos-associated pulmonary disorders / A. Hirvonen, Saarikoski, T. Sirukki, K. Linnainmaa // *JNCI journal of the national cancer institute.*- 1996.- V.88, №24.- P.1853-185.
115. Брагина Е.Ю. Сравнительный анализ структуры наследственной компоненты подверженности к бронхиальной астме и туберкулезу по генам ферментов метаболизма ксенобиотиков 03.00.15. – генетика Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук
116. Allele frequencies for glutathione S-transferase and N-acetyltransferase 2 differ in African population groups and may be associated with oesophageal cancer or tuberculosis incidence / C. Adams, C. Werely, T. Victor [et al.] // *Clin Chem Lab Med.* - 2003.- V.41, №4. - P.600-605.

117. Increased risk of antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in individuals with glutathione S-transferase M1 'null' mutation / B. Roy, A. Chowdhury, S. Kundu [et al.] // *J Gastroenterol Hepatol.* – 2001. - V.16, №9. – P.1033-1037.
118. Huang Y.S. Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and the susceptibility to antituberculosis drug-induced liver injury / Y S Huang // *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* – 2007. – V.3, №1. – P.1-8.
119. Drug-metabolising enzyme polymorphisms and predisposition to anti-tuberculosis drug-induced liver injury: a meta-analysis / F. Sun, Y. Chen, Y. Xiang [et al.] // *Int J Tuberc Lung Dis.* – 2008. – V.12, №9. – P. 994-1002.
120. Effects of N-acetyltransferase 2 (NAT2), CYP2E1 and Glutathione-S-transferase (GST) genotypes on the serum concentrations of isoniazid and metabolites in tuberculosis patients / K. Fukino, Y. Sasaki, S. Hirai [et al.] // *J Toxicol Sci.* – 2008. – V.33, №2. – P. 187-195.
121. Influence of glutathione S-transferase M1 and T1 homozygous null mutations on the risk of antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in a Caucasian population / V. Leiro, A. Fernandez-Villar, D. Valverde [et al.] // *A. Liver Int.* – 2008. – V.28, № 6. – P.835-839.
122. Contribution of horizontally acquired genomic islands to the evolution of the tubercle bacilli / J. Becq, M. Gutierrez, V. Rosas-Magallanes [et al.] // *J Mol.biol.evol.* – 2007 – V. 24. - P.1861-1871.
123. Modeling bacterial evolution with comparative-genome-based marker systems: application to *Mycobacterium tuberculosis* evolution and pathogenesis / D. Alland, T.S. Whittam, V.B. Murray [et al.] // *J.Bacteriol* – 2003.- V.185. – P.3392–3399.
124. Evidence for recombination in *Mycobacterium tuberculosis* / X. Liu, M.M. Gutacker, J.M. Musser [et al.] // *J.Bacteriol* – 2006. – V.188. - P.8169-8177.
125. Gagneux S. Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development/ Gagneux S, Small P.M.//*Lancet infect.dis.* – 2007. - №7. – P.328–337.

126. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis / D. Thierry, A. Brisson-Noyl, V. L'vy-Fr'ebault [et al.] // *J. Clinical microbiology*. - 1990. - V.28, №12. - P.2668-2673.
127. McHugh T. Nonrandom Association of IS6110 and *Mycobacterium tuberculosis*: Implications for Molecular Epidemiological Studies / T. McHugh, S. Gillespie // *Journal of Clinical Microbiology* – 1998 -V. 36, №5. - P. 1410-1413.
128. Gene expression diversity among *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates / Q. Gao, K.E. Kripke, A.J. Saldanha [et al.] // *Microbiology*. - 2005. – V. 151 (pt 1). - P. 5-14.
129. Mailik A.N. Effects of genetic variability of *Mycobacterium tuberculosis* strains on the presentation of disease / A.N. Mailik, P. Godfrey-Faussett // *Lancet Infect Dis*. - 2005. - V5, №3. - P 174 – 183.
130. Genomic deletions classify the Beijing/W strains as a distinct genetic lineage of *Mycobacterium tuberculosis* / A. Tsolaki, S. Gagneux, A. Pym [et al.] // *J.Clin. Microbiol*. - 2005.-V.43. - P.3185-3191.
131. Characterization of the phylogenic distribution and chromosomal insertion sites of five IS6110 elements in *Mycobacterium tuberculosis*: non-random integration in the dnaA-dnaN region / N.E. Kurepina, S.Sreevatsan, B.B. Plikaytis [et al.] // *Tuber. Lung Dis*. – 1998. – V.79. – P.31–42.
132. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination / S. Sreevastan, X. Pan, K.E. Stockbauer [et al] // *Proc. Natl.Acad.Sci.U.S.A*. - 1997. – V. 94. - P. 9869-987.
133. Identification of a W variant outbreak of *Mycobacterium tuberculosis* via population-based molecular epidemiology / P.J. Bifani, B. Plikaytis, V. Kapur [et al.] // *J.Am.Med.Assoc*. – 1999. – V. 282. – P.2321-2327.
134. Multiplex PCR assay specific for the multidrug-resistant strain W of *Mycobacterium tuberculosis* / B. Plikaytis, J. Marden, J. Crawford [et al.] // *J.Clin.Microbiol*. – 1994. – V.32, №6. – P.1542-1546.
135. Global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy

of other DNA fingerprinting systems and recommendations for a minimal standard SNP set / I. Filliol, A. Motiwala, M. Cavatore [et al.] // *J.Bacteriol.*- 2006.- V.188. - P.759-772.

136. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes / B. López, D. Aguilar, H. Orozco [et al] // *Clin Exp Immunol.* - 2003. - V. 133, №1. - P 30–37.

137. Abebe F. The emergence of Beijing family genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* and low-level protection by bacilli Calmette-Guerin (RCG) vaccines: is there a link? / F. Abebe, G. Bjune // *Clin.exp.immunol.* – 2006. - V 145, №3. - P. 389–397.

138. Correlation of virulence, lung pathology, bacterial load and delayed type of hypersensitivity responses after infection with different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in a BALB/c mouse model / J. Dormans, M. Burger, D. Aguilar [et al.] // *Clin.exp.immunol.* – 2004. - V 137, №3. - P. 460–468.

139. Tuberculosis associated with *Mycobacterium tuberculosis* Beijing and non-Beijing genotypes: a clinical and immunological comparison / Y.J. Sun, T.K. Lim, A. K. Ong, [et al] // *BMC Infect Dis.* - 2006.- V.105, №6. - P 1471-2334.

140. Nicol M.P. The clinical consequences of strain diversity in *Mycobacterium tuberculosis* / M.P. Nicol, R.J. Wilkinson // *Trans R Soc Trop Med Hyg* – 2008.- V. 102, №10. - P. 955 – 965.

141. Beijing family *Mycobacterium tuberculosis* strains differ in their intracellular growth in Th-1 macrophages / S. Theus, K. Eisenach, N. Fomukong [et al.] // *Int J Tuberc Lung Dis.* – 2007. - V.11, №10. - P. 1087–1093.

142. Virulence of selected *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in the rabbit model of meningitis is dependent on phenolic glycolipid produced by the bacilli / L. Tsenova, E. Ellison, R. Harbacheusky [et al.] // *J. Infect. Dis.*- 2005.- V. 192. - P. 98 - 106.

143. Production of IL-12 by human monocytederived dendritic cells is optimal when the stimulus is given at the onset of maturation, and is further enhanced by IL-4 / S. Ebner, G. Ratzinger, B. Krosbacher [et al.] // *J Immunol* – 2001.- V.166.- P.633-641.

144. Биологические свойства штаммов *M tuberculosis* кластера W / Л.Н. Черноусова, С.Н. Андреевская, Т.Г.Смирнова [и др.] // Проблемы туберк. и болезней легких – 2008.- № 10. – С. 45–49.
145. Boshoff H.I. Tuberculosis – metabolism and respiration in the absence of growth / H.I. Boshoff, C.E. Barry // Nat. Rev.Microbiol. - 2005. -№3.- P. 70 – 80.
146. The W-Beijing lineage of *Mycobacterium tuberculosis* overproduces triglycerids and has the DosR dormancy regulon constitutively upregulated / M.B.Reed, S. Gagneux, K. Deriemer [et al.] // J.Bacteriol. – 2007. – V.189, №7. - P. 2583–2589.
147. A novel lipase belonging to the hormone-sensitive lipase family induced under starvation to utilize stored triacylglycerol in *Mycobacterium tuberculosis* / J. Daniel, C. Deb, V.S. Dubey [et al.] // J. Biol.Chem. – 2006. – V.281 - P. 3866–3875.
148. Association of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype with tuberculosis relapse in Singapore / Y.J. Sun, A.S. Lee, S.Y. Wong [et al.] // Epidemiol Infect.- 2006. - V. 134, №2. - P 329–332.
149. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype and risk for treatment failure and relapse, Vietnam / N.T. Lan, H.T. Lien, I.B. Tung [et al] // Emerg Infect Dis. - 2003. - № 12. - P 1633 – 1635.
150. Пальцев М.А. Значение биомедицинских фундаментальных исследований для фтизиатрии / М.А. Пальцев // Проблемы туберкулеза и болезней легких – 2004. - № 4. – С. 3 – 7.
151. Variation of the gene expression of *Mycobacterium tuberculosis* ppe44 gene among clinical isolates / L. Rindi, I. Peroni, N. Lari [et al.] // FEMS Immunol Med Microbiol. - 2007. - V 51, №2. - P 381 – 387.
152. Epidemiology of antituberculosis drug resistance (the Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance): an updated analysis // Lancet. – 2006. – V.368. – P. 2142-2154.
153. Global tuberculosis control: WHO Report 2002. – Geneva, 2002. – 295p.
154. Global incidence of multi-drug resistant tuberculosis / M. Zingol, M.S. Hosseini, A. Wright [et al] // J. Infect. Dis. - 2006. - № 194. – P. 479-485.

155. Blanchard J. Molecular mechanisms of drug resistance in *Mtb* / J. Blanchard // *Annu.Rev.Biochem.*- 1996.- V.65.- P.215-239.
156. Levin M.E. *Mycobacterium smegmatis* RNA polymerase: DNA supercoiling, action of rifampicin and mechanism of rifampicin resistance // M.E. Levin, G. F. Hatfull // *Molecular Microbiology.* - 1993. - V.8. - P.277-285.
157. Contribution of *rpoB* mutations to development of rifampicin cross-resistance in *Mycobacterium tuberculosis* / D.L. Williams, L. L. Spring, L.P. Collins [et al.] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* - 1998.- V.42.- P.1853-1857.
158. Douglass J. A ribosomal gene mutation in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates / J. Douglass, L. Steyn // *J.Infect.Dis.* - 1993.- V.167, № 6.- P.1505-1506.
159. Andersson D.I. The biological cost of antibiotic resistance / D.I. Andersson, B.R. Levin // *Current Opinion in Microbiology* – 1999.- V.2. – P.489-493.
160. Billington O.J. Physiological cost of rifampin induced in vitro in *Mycobacterium tuberculosis* / O.J. Billington, T.D. McHugh, S.H. Gillespie // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* – 1999.- V.43. – P.1866-1869.
161. Влияние лекарственной устойчивости на фитнес микобактерий туберкулеза генотипа W-Beijing / О.С. Тунгусова, А.О. Марьяндышев, Д.А. Каугант [и др.] // *Проблемы туберк. и болезней легких* – 2005. - № 10. – С. 46–50.
162. Роль комплексного генетического прогноза в лечении и профилактике туберкулеза органов дыхания у подростков / М.В. Павлова, Л.А. Скворцова, М.Н. Кондакова [и др.] // *Проблемы туберк. и болезней легких* – 2005. - № 9. – С. 30 – 33.
163. The influence of host and bacterial genotype on the development of disseminated disease with *Mycobacterium tuberculosis* / M. Caws, G. Thwaites, S. Dunstan [et al.] // *PLoS Pathog.*- 2008. – V.4.- 450-457.
164. Доклиническая диагностика гомеостатического дисбаланса у работников плутониевого производства / Р.М. Тахауов, Ю.В. Семенова, А.Б. Карпов [и др.] // *Сибирский медицинский журнал* – 2003.- № 5.- С.90-95.
165. Демтредер В.А. Лазерная корреляционная спектроскопия; Основные принципы и техника эксперимента / В.А. Демтредер - М.:Наука, 1985.- 609с.

166. Бажора Ю.И. Лазерная корреляционная спектроскопия в медицине / Ю.И. Бажора, Л.А. Носкин - Одесса: «Друк», 2002.- 400 С.
167. Бажора Ю.И. Механізми макромолекулярних взаємодій у системному гомеостазі при формуванні первинної імунної відповіді в експерименті / Ю.И. Бажора, Ю.В. Петрашевич // Буковинський медичний вісник.-2001.-Т.5, №3. - С. 162-165.
168. Лазерна кореляційна спектроскопія компонентів сироватки крові та продуктів реакції антиген-антитіло *in vitro* / Ю.И. Бажора, Ю.В. Петрашевич, І.А. Міхова [та ін] // Одеський медичний журнал.- 2002. - №3. - С.8-11.
169. Использование цитогенетического метода исследования буккального эпителия и метода лазерной корреляционной спектрометрии для мониторинга нарушений в организме детей / А.В.Алещенко, И.Б.Алчинова, О.С.Дмитриева [и др.] // Цитология. - 2006.- Т.48, №2.- С.169 – 172.
170. Стоєва Т.В. Критерії доклінічної діагностики дисметаболических нефропатій у дітей / Т.В. Стоєва, О.В. Зубаренко // Современная педиатрия. – 2008. - №4. – С.32-34.
171. Петров С.Р. Возможности лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС) плазмы крови в диагностике хирургических заболеваний щитовидной железы / С.Р. Петров, А.И. Кравченко // Вісник морської медицини. - 2001.- №1.- С.21-23.
172. Евчев Ф.Д. Сравнительная оценка активности интоксикационных процессов в сыворотке крови у больных раком гортани и с рецидивом рака гортани с помощью биохимических показателей и лазерной корреляционной спектроскопии / Ф.Д. Евчев, В.И. Кресюн // Журнал ушных, носовых и горловых болезней.- 2007. - №5.- С.60-68.
173. Юшковская О.Г. Лазерная корреляционная спектроскопия ротглоточных смывов как интегральный метод оценки эффективности реабилитации больных ишемической болезнью сердца / О.Г. Юшковская // Спорт.медицина.- 2006. - №1. - С.141–148.
174. Хижняк Е.В. Оценка риска развития осложнений у больных с острым инфарктом миокарда на основании исследования субфракционного состава

сыворотки крови посредством лазерной корреляционной спектроскопии в сравнении с определением уровня тропонина I / Е.В. Хижняк // Медицина неотложных состояний. – 2008.- №4. – С.124-127.

175. Использование лазерной корреляционной спектроскопии в качестве экспертной системы оценки эффективности проводимой терапии при заболеваниях почек у детей / Н.А. Лисовая, Л.А. Носкин, А.В. Папаян [и др.] // Нефрология и диализ.- 2001.- Т.3, №1. – С.12-15.

176. Стречень С.Б. Дифференциально-диагностические возможности лазерно-корреляционной спектрометрии сыворотки крови в оценке тяжести течения заболевания и его фармакотерапии / С.Б. Стречень, О.Л. Тымчишин // Вінницький національний медичний університет.- 2009. - [Електроний ресурс] - Режим доступу до документа: http://vnmu.vn.ua/index.php?option=com_content&task=view&id=761&Itemid=81

177. Іванько О.В. Диференційна діагностика набрякової та деструктивних форм гострого панкреатиту з використанням лазерно кореляційно спектроскопії- дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук зі спеціальності 14.01.03 – хірургія. ОДМУ, Одеса, 2004.

178. Филюк В.В. Дифференциальная диагностика туберкулезных и карциноматозных плевритов с помощью лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС) плазмы крови / В.В. Филюк, Нгуен Ван Хань // Укр. пульмонолог. журн. - 2000. - № 3. - С. 16—18.

179. Сазонец О.И. Исследование различных биологических жидкостей методом лазерной корреляционной спектроскопии у больных бронхиальной астмой / О.И. Сазонец, И.В. Бируля, Л.А. Хоровская // Клиническая и лабораторная диагностика. - 1997. - №5. - С.84.

180. Определение уровня функциональной достаточности бронхоальвеолярной системы на основе биофизического исследования конденсата влаги выдыхаемого воздуха / Ю.И. Бажора, Л.А. Носкин, М.Ю. Карганов и др. // Актуальні питання медичної реабілітації дітей та підлітків: дсеукраїнська наукова коференція, 2005р., Одеса : тези доп. – Одеса : ОДМУ, 2005.- С.66.

181. Зубаренко А.В. Лазерная корреляционная спектроскопия в диагностике плазменного гомеостаза при остром воспалении / А.В. Зубаренко, Ю.И. Бажора // Медицинская Реабилитация Курортология Физиотерапия - 1998. - №3. - С.49-50.
182. Чернявський В.Г. Лазерно-кореляційна спектроскопія як новий метод в оцінці ефективності лікувально-реабілітаційних заходів у хворих на хронічні обструктивні захворювання легенів / В.Г. Чернявський // Буковинський медичний вісник - 2007.- Т. 11, №3. – С.21-24.
183. Рузанова Е. В. Нарушение кальций-фосфорного метаболизма и его коррекция у детей с рецидивирующим бронхитом / Е. В. Рузанова // Одеський медичний журнал – 2009. - №1. – С.32-35.
184. Клиническая эпидемиология. Основы доказательной медицины (пер.с англ.) / Флетчер Р., Флетчер С., Вагнер Э. — Москва:Медиа Сфера, 1998. — 352 С.
185. Про затвердження інструкцій щодо надання допомоги хворим на туберкульоз і неспецифічні захворювання легенів : Наказ МОЗ України № 499 від 28.10.2003 // Збірник нормативно-директивних документів з охорони здоров'я. — 2003. — № 2. - С. 63–111.
186. Про затвердження Інструкції з бактеріологічної діагностики туберкульозної інфекції: Наказ МОЗ України № 45 від 06.02.2002) // Збірник нормативно_директивних документів з охорони здоров'я. — 2002. — № 2. — С. 63–111.
187. Genomic deletions classify the Beijing/W strains as a distinct genetic lineage of Mycobacterium tuberculosis / A. Tsolaki, S. Gagneux, A. Pym [et al.] // J.Clin. Microbiol. - 2005. - V.43. - P.3185-3191.
188. A Multiplex Polymerase Chain Reaction Protocol for the Simultaneous Analysis of the Glutathione S-Transferase GSTM1 and GSTT1 Polymorphisms / M. Arand, R. Muhlbauer, J. Hengstler [et al.] // Analytical biochemistry. – 1996. – V. 236. - P. 389–397.
189. Пат. 47117 Україна, МПК⁵¹ А 61 В 10/00. Пристрій для збирання конденсату вологи видихнутого повітря / Комлевой О. М., Бажора Ю. І.; заявник і

патентовласник Одеський державний медичний університет. — № u 2009 11258 ; заявл. 06.11.09 ; опубл. 11.01.10, Бюл. № 1 – 4 с.

190. Лапач С.Н. Статистические методы в медико_биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич — Киев: МОРИОН, 2000. — 319 С.

191. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of East / D. Van Soolingen, L. Qian, P. de Haas [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 1995. — V. 33. — P. 3234–3238.

192. Worldwide Occurrence of Beijing/W Strains of M/tuberculosis: A systematic review // Emerging Infectious diseases. – 2002. - V.8 – P. 843 – 849.

193. Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype emerging in Vietnam / G. A. Danq, M. W. Borqdorff, L.N. Van [et al.] // Emerging Infectious diseases. – 2000. - № 6. – P. 302-305.

194. Mycobacterium tuberculosis of Beijing genotype in Thailand / W.M. Prodinge, P. Bunyaratvej, R. Prachaktam [et al.] // Emerging Infectious diseases. – 2001. - № 7. – P. 483 – 484.

195. Molecular epidemiology of tuberculosis in Malaysia / J. Dale, R. Nor, S. Ramayah [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 1999. — V. 37. — P. 1265–1268.

196. Resistant pulmonary tuberculosis in Estonia / A. Kruuner, S.E. Hoffner, H. Sillastu [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2001. — V. 39. — P. 3339–3345.

197. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients in Houston, Texas, by spoligotyping // H. Soini, X. Pan, A. Amin [et al.] // Microbiol. – 2000. – V.38. – P.669 – 676.

198. Global dissemination of the Mycobacterium tuberculosis W-Beijing family strains / P.J Bifani, B. Mathema, N.E. Kurepuina, B.N. Kreiswirth // Trends in microbiology. – 2002. - V.10, №1. – P. 45- 52.

199. Spread of drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype in the Archangel Oblast, Russia / O. S. Toungousova, P. Sandven, A. O. Mariandyshv [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2002. — V. 40. — P. 1930–1937.

200. Молекулярное типирование штаммов микобактерий туберкулеза в

- Иркутской области (Восточная Сибирь) в 2000-2005 г.г. / О.Б.Огарков, Т.В. Медведева, Т. Zoio [и др.] // Молекулярная медицина. – 2007. - №2. - С.33-34.
201. Медикаментозна резистентність мікобактерій туберкульозу в Одеській області та фактори ризику розповсюдження резистентного туберкульозу: дані проспективного дворічного дослідження / О.К.Асмолов, В.В.Ніколаєвський, В.Й.Кресюн [та ін.] // Український пульмонологічний журнал. - 2005. - №2.- С.9-15.
202. Львова Л.В. Харьковская школа фтизиатрии: штрихи к портрету / Л.В. Львова, П.И. Потейко // Провизор.- 2004. - № 22. – С.6-10.
203. Бажора Ю.И. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных в южном регионе Украины / Ю.И. Бажора, В. В. Николаевский, Ф. Дробневски // Цитология и генетика. – 2004. – № 4. – С. 23-28.
204. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype – research / Troeles Lillebaek, Ase B. Andersen, Asger Dirksen [et al.] // Emerging Infectious diseases. – 2003. - № 12. – P.1422 – 1426.
205. *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype are rarely observed in tuberculosis patient in South America / V. Ritacco, B. Lypez, P. Cafurine [et al.] // Mem Inst Oswaldo Cruz. – 2008. – V. 103, №5 – P. 489 – 492.
206. Immunity circumvented by typical *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains / K.Kremer., M.J. van der Werf, Betty K.Y. Au [et al.] // Emerg Inf Dis.- 2009. - V.15, №2. – P.103-111.
207. Incidence of Beijing genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in Elche, Spain: a 13-year surveillance study / E. Garcia-Pachon, I. Escribano, J. Rodrigues [et al.] // Euro Surveill. – V.2007 – V.12, №5. – P.17 – 18.
208. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype, northern Malawi / J. R. Clynn, A. C. Crampin, H. Thaore [et al.] // Emerging Infectious diseases. - 2005. - № 1. – P.112-118.
209. Several strains of the *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Hong Kong represent the Beijing genotype / M.Y. Chan, M. Borgdorff, C.W. Yip [et al.] // J Infect dis. – 2001. – V.127. – P.169-171.
210. Retrospective analysis of the Beijing family of *Mycobacterium tuberculosis* in

preserved tissues / L. Qian, J. Van Embden, A. Van Der Zanden [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 1999. — V. 37. — P. 471–474.

211. Recent and rapid emergence of W-Beijing strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Cape Town, South Africa / D. Cowley, D. Govender, B. February [et al.] // Clin Infect Dis. – 2008. – V. 47, № 10. – P. 1252 – 1259.

212. Epidemiological evidence of the spread of a *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype on Gran Canaria Island / J.A. Caminero, M.J. Pena, M.I. Campoos-Herrero [et al.] // Am J Respir Crit Care Med. – 2001. – V. 164. – P. 1165 – 1170.

213. Beijing genotype of *Mycobacterium tuberculosis* is significantly associated with human immunodeficiency virus infection and multidrug resistance in cases of tuberculous meningitis / M. Caws, G. Thwaites, K. Stepniewska [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2006. — V. 44, №11. — P. 471– 474.

214. Rifampin- and multidrug-resistant tuberculosis in Russian civilians and prison inmates: dominance of the Beijing strain family / F. Drobniowski, Y. Balabanova, M. Ruddy [et al.] // Emerging Infectious diseases. – 2002. - № 8. – P.1320–1326.

215. Portales F. Addressing multidrug resistant tuberculosis in penitentiary hospitals in the general population of the former Soviet Union / F.,Portales / Int. J. Tuberc.Lung Dis. – 1999. – №3. – P. 582 – 588.

216. Преобладание штаммов *Mycobacterium tuberculosis* семейства Beijing и факторы риска их трансмиссии в Самарской области / Я.М. Балабанова, В.В. Николаевский, М. Радди [и др.] / Проблемы туберкулеза и болезней легких – 2006. - № 2. – С. 31-35/

217. Туберкулез / О.К. Асмолов, О.А. Бабуріна, І.М.Смольска та ін. – Одеса: Одес.мед ун-т, 2002. – 276 С.

218. R. van Crevel Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis* / R. van Crevel, T. H. Ottenhoff, J. van der Meer // Clin Microbiol Rev. – 2002. – V. 15, №2. – P. 294–309: [Электронный ресурс] - Режим доступа до документу: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC118070/>

219. Innate immune Innate Immune Response to *Mycobacterium tuberculosis* Beijing

and Other Genotypes / C. Wang, P. Peyron, O. Mestre [et al.] // PLoS One – 2010. – V.5, №10 : [Електронний ресурс] - Режим доступу до документу:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2963601/>

220. Reduced TNF-alpha and IFN-gamma responses to Central Asian strain 1 and Beijing isolates of Mycobacterium tuberculosis in comparison with H37Rv strain / M. Tanveer, Z. Hasan, A. Kanji [et al.] // Trans R Soc Trop Med Hyg. – 2009. – V. 103, № 6. - P.581-587.

221. Mycobacterium tuberculosis, Beijing genotype strains not associated with radiological presentation of pulmonary tuberculosis / M.W. Borgdorff, H. Van Deutekom, P.E. De Haas [et al.] // Tuberculosis (Edinb). - 2004. - V. 84, №5. - P. 337 – 334.

222. Tuberculosis associated with Mycobacterium tuberculosis Beijing and non-Beijing genotypes: a clinical and immunological comparison / Yong-Jiang Sun, T.K. Lim, Adrian Kheng Yeow Ong [et al.] // BMC Infect Dis. - 2006.- V. 105, №6. – P. 1471-2334.

223. Association between Mycobacterium tuberculosis Beijing/W Lineage Strain Infection and Extrathoracic Tuberculosis: Insights from Epidemiologic and Clinical Characterization of the Three Principal Genetic Groups of M. tuberculosis Clinical Isolates/Y. Kong, M. D. Cave, L. Zhang [et al.] // J Clin Microbiol. - 2007. - V.45, № 2. - P. 409–414.

224. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent / J.Keane, H.G. Remold, R.P. Wise [et al.] // N.Engl.J.Med. - 2001. - V.345. – P.1098-1104.

225. Beijing/W genotype Mycobacterium tuberculosis and drug resistance/European concerted action on new generation genetic markers and techniques for the epidemiology and control of tuberculosis RIVM, Bilthoven, the Netherlands // Emerg Infect Dis. – 2006. – V.12, №5. - P. 736-743.

226. Антоненко К. О. Визначення та поширеність мутацій, що пов'язані з медикаментозною резистентністю, в генотипі збудника туберкульозу / К. О. Антоненко, В. Й. Кресюн // Вісник проблем біології і медицини. – 2007. – Вип. 4. –

C. 124-132.

227. Лекарственная чувствительность *M. tuberculosis* в сопоставлении с их жизнеспособностью, цитотоксичностью, генотипом и течением процесса у больных туберкулезом органов дыхания / О.А.Макничева, Е.Б.Ласунская, В.Ю. Журавлев [и др.] // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2008. - №12.- С. 18 – 22.

228. Molecular epidemiology and prevalence of mutations conferring rifampicin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains from the southern Ukraine / V.V. Nickolaevskyy, T.J. Brown, Y.I. Bazhora [et al.] // Emerg Infect Dis. – 2002. - № 8. - P. 1320–1326.

229. Антоненко К. О. Рівень резистентності збудника туберкульозу до рифампіцину і можливість її генотипічного визначення / К. О. Антоненко // Одеський медичний журнал. – 2008. - № 1. – С. 24-28.

230. Rad M.E. Mutations in putative mutator genes of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing family / M.E.Rad // Emerg Infect Dis. – 2003. – V.6 - P. 236-240.

231. Werngern J. Drug-susceptible *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype does not develop mutation-conferred resistance to rifampin at an elevated rate / J. Werngern, S.E. Hoffner // J Clin Microbol. – 2003. – V.41. – P.1520-1524.

232. Population structure analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family indicates an association between certain sublineages and multidrug resistance/Iwamoto T., Yoshida S., Suzuki K. [et al.] // Antimicrob Agents Chemother. – 2008.- V.52, №10. – P.3805-3809.

233. Evolution of drug resistance in different sublineages of *mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype / I.Mokrousov, WeiWeiJiao, Gui Zhi Sun [et al.] // Antimicrob Agents Chemother. – 2006. - V.50, №8. – P.2820-2823.

234. Первичная лекарственная устойчивость микобактерий туберкулеза у больных с впервые выявленным деструктивным туберкулезом легких / И.П.Зиновьев, Н.А.Эсаулова, В.Г.Новиков [и др.] // Проблемы туберк и болезней легких – 2009. - №4. – С. 37 – 38.

235. McLennan A. G. The Nudix hydrolase superfamily / A. G. McLennan // Cell. Mol. Life Sci. – 2006. - V.63 – P. 123–143.

236. Making sense of a missense mutation: characterization of MutT2, a Nudix hydrolase from *Mycobacterium tuberculosis*, and the G58R mutant encoded in W-Beijing strains of *M. tuberculosis* / N.J. Moreland, C. Charlier, A.J. Dingley [et al.] // *Biochemistry*. – 2009. - V.48. - P.699–708.
237. Phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Strains Constructed from Polymorphisms in Genes Involved in DNA Replication, Recombination and Repair/Moreland NJ, Charlier C, Dingley AJ [et al.] // *PLoS One*.- 2011.- V.6, №1 : [Электронный ресурс] - Режим доступа до документу: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0016020>
238. Стандарти діагностики і лікування туберкульозу: методичні рекомендації / укладачі : Ю.І. Фещенко, Л.В. Кучугура-Кучеренко, В.М.Петренко [та ін.] – К., 2004. – 64 с.
239. Фтизиопульмонология / В.Ю.Мишин, В.Г. Григорьев, А.В. Митронин [и др.] // М.: ГЭОТАР, 2007. – 504 с.
240. Кузмина Н.В. Клинические проявления диссеминированного туберкулеза легких в период напряженной эпидемической ситуации / Н.В.Кузмина, В.Г. Макеева, В.Ю. Мишин // Проблемы туберк и болезней легких – 2004. - №3. – С. 85 – 88.
241. Туберкулез: лабораторная диагностика / *Клин. лаб. диагностика*". – 2008. - № 9. - С. 81 [Электронный ресурс] - Режим доступа до документу: <http://www.dntpasteur.ru/news.php?number=311>
242. Показатели крови и лейкоцитарного индекса интоксикации в оценке тяжести и определении прогноза при воспалительных, гнойных и гнойно-деструктивных заболеваниях / В.К. Островский, А.В. Мащенко, Д.В. Янголенко [и др.] // *Клин. лаб. диагностика*. — 2006. — № 6. — С. 50–53.
243. Общий анализ крови — все ли его возможности исчерпаны? Интегральные индексы интоксикации как критерии оценки тяжести течения эндогенной интоксикации, ее осложнений и эффективности проводимого лечения / И.И. Сперанский, Г.Е. Самойленко, М.В. Лобачева [Электронный ресурс] - Режим доступа до документу: <http://urgent.health-ua.com/article/293.html>

244. Лейкоцитарные индексы клеточной реактивности как показатель наличия гипо- и гиперэргического вариантов неонатального сепсиса / Д.О. Иванов, Н.П. Шабалов, Н.Н. Шабалова [и др.] [Электронный ресурс] - Режим доступа до документа: <http://www.medlinks.ru/article.php?sid=22330>
245. Parwati I. Possible underlying mechanisms for successful emergence of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains / I. Parwati, R. van Crevel, D. van Soolingen // *Lancet Infect Dis.* - 2010- V.10, №2. – P.103-111.
246. Cooper A.M. The role of cytokines in the initiation, expansion, and control of cellular immunity to tuberculosis / A.M. Cooper, S.A. Khader // *Immun Rev.* – 2008. – V.226. – P. 191 – 204.
247. Virulence of a *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN-alpha /beta / C. Manca, L. Tsenova, A. Beratold [et al.] // *Acad Sci USA.* – 2001. - V.98, №10. – P. 5752–5757.
248. Differential pattern of cytokine expression by macrophages infected in vitro with different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes / R. Chacyn-Salinas, J. Serafin-Lypez, R. Ramos-Payn [et al.] // *Clin Exp Immunol.* – 2005. – V.140, №3. – P. 443–449.
249. Induction of cell death in human macrophages by a highly virulent Korean isolate of *Mycobacterium tuberculosis* and the virulent strain H37Rv / H. Sohn, K.S. Lee, S.Y. Kim [et al.] // *Scand J Immunol.* - 2009. – V.69. - P.43–50.
250. Петренко В.І. Роль цитокінів та застосування їх з метою імунокорекції у хворих на туберкульоз легень / В.І. Петренко, Ю.А. Варченко // *Туберкульоз, легеневі хвороби, ВІЛ-інфекція.* – 2010. - №2. – С.78-85.
251. Hypervirulent *M. tuberculosis* W/Beijing strains upregulate type I IFNs and increase expression of negative regulators of the Jak-Stat pathway / C. Manca, L. Tsenova, S. Freeman [et al.] // *J Interferon Cytokine Res.* – 2005. – V. 25. – P. 694–701.
252. Selective induction of transforming growth factor beta in human monocytes by lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis* / K.E. Dahi, H. Shirastuchi, B.D. Hamilton [et al.] // *Infect Immun.* – 1996. – V.64, №2. - P. 399-405.
253. CD4(+) T cell clones producing both interferon-gamma and interleukin-10

- predominate in bronchoalveolar lavages of active pulmonary tuberculosis patients / F. Gerosa, C. Nisii, S. Righetti [et al.] // Clin Immunol. – 1999. – V. 92, №3. – P. 224-234.
254. IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients / Boussiotis VA, Tsai EY, Yunis E.J [et al.] // J Clin Invest.. – 2000. – V.105, №9. – P.1317-1325.
255. Depressed T-cell interferon-gamma responses in pulmonary tuberculosis: analysis of underlying mechanisms and modulation with therapy / Hirsch CS, Toossi Z, Othieno C [et al.] // J Infect Dis. - 1999. – V.180, №6. – P.2069-2073.
256. Functional diversity of helper T lymphocytes / M. Tanveer, Z. Hasan, A. Kanji [et al] // Nature. – 1996. – V.383, №6603. – P.787-793.
257. Mycobacterium tuberculosis lipids regulate cytokines, TLR-2/4 and MHC class II expression in human macrophages / L.M. Rocha-Ramirez, I. Estrada-Garcia, L.M. Lopez-Marin [et al] // Tuberculosis. – 2008. – V.88. – P.212–220.
258. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors / S. Thoma-Uszynski, S. Stenger, O. Takeuchi [et al.] // Science. – 2001. – V.291, № 5508. – P.1544-1547.
259. Innate Immune Recognition of *Mycobacterium tuberculosis* / J. Kleinnijenhuis, M. Oosting, Leo A. B. Joosten [et al] // Clin Dev Immunol. 2011: [Електронний ресурс] - Режим доступу до документу : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3095423/>
260. Туберкулез сегодня: особенности возбудителя, клиника и лечение / Л.А. Скворцова, М.В. Павлова, Н.В. Сапожникова [и др.] // Проблемы туберкулеза. – 2005. - №11. – С.6-9.
261. Epidemiology of antituberculosis drug resistance (the Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance): an updated analysis // Lancet. – 2006. – Vol.368. – P. 2142-2154.
262. Global incidence of multi-drug resistant tuberculosis / M. Zingol, M.S. Hosseini, A. Wright [et al] //J. Infect. Dis. - 2006. - № 194. – P. 479 - 485.
263. Туберкульоз із розширеною резистентністю до протитуберкульозних препаратів: ситуація в Україні / В.М.Петренко, С.О. Черенько, Н.А. Литвиненко [та

ін.] // Укр. Пульмонол. журн. – 2007. - №3. – С.35-39.

264. Характеристика спектра лекарственной устойчивости рифампицин-резистентных штамов *M tuberculosis* к другим противотуберкулезным препаратам первого ряда / Ж.Т. Исакова, З.К. Гончарова, А.А. Алдашеев [и др.] // Пробл Туберк. - 2008. - № 11. – С. 39 – 41.

265. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis. WHO document WHO/CDS/TB/2003.320. – WHO, Geneva, 2003. – 72 p.

266. Множественно-лекарственно-устойчивый туберкулез легких: медико-социальные особенности и эффективность стационарного этапа лечения / О.В. Филинюк, Г.В. Янова, А.К. Стрелис [и др.] // Пробл Туберк. – 2008. - № 8. – С. 23 – 28.

267. Прогнозирование риска развития лекарственной устойчивости возбудителя у больных легочным туберкулезом / М.Д. Сафарян, Г.Р. Минасян, Д.Г. Хачатрян [и др.] // Пробл Туберк. 2008. - № 9. – С. 40 – 43.

268. Характеристика спектра лекарственной устойчивости рифампицин-резистентных штамов *M tuberculosis* к другим противотуберкулезным препаратам первого ряда / Ж.Т. Исакова, З.К. Гончарова, А.А. Алдашеев [и др.] // Пробл Туберк. - 2008. - № 11. - С. 39 – 41.

269. Первичная лекарственная устойчивость микобактерий туберкулеза у больных с впервые выявленным деструктивным и туберкулезом легких И.П. Зиновьев, Н.А. Есаулова, В.Г. Новиков [и др.]. – Пробл. Туберк. – 2009. -№4. - С. 37 – 38.

270. Медикаментозна резистентність мікобактерій туберкульозу в Одеській області України та фактори ризику розповсюдження резистентності туберкульозу: дані проспективного дворічного дослідження / О.К.Асмолов, В.В. Ніколаєвський, В.Й. Кресюн [та ін.] // Укр. Пульмонол. журн. – 2005. - №2. – С.39-43.

271. Anti-tuberculosis drug-resistance in the world. Report N 4. [Электронный ресурс] - Режим доступа до документу: <http://www.who.int/topics/en/>

272. Медников Б.Л. Лекарственная устойчивость *Mycobacterium tuberculosis* // Б.Л.Медников // Пульмонология. – 2005. - №2. – С.5-8.

273. Характер специфического иммунного ответа и продукция цитокинов

- мононуклеарами больных разными формами туберкулеза легких / Б.Е. Кноринг, И.С. Фрейдлин, А.С. Симбирцев [и др.] // Мед.иммуноло.- 2001. – №1. - С. 61-68.
274. Маянский А.Н. Туберкулез (микробиологические и иммунологические аспекты) / А.Н. Маянский // Иммунология. – 2001. - № 2. – С. 53 – 63.
275. Некоторые закономерности иммунного ответа у больных туберкулезом легких с лекарственно-устойчивыми штаммами микобактерий / И.Я. Сахарова, Б.М. Ариэль, Б.Е. Кноринг [и др.] // Пробл. Туб. – 2008. - № 12. - С. 22 – 27.
276. Особенности функционирования иммунной системы при туберкулезной инфекции / Т.Е. Тюлькова, Ю.П. Чугаев, Э.А. Кашуба [и др.] // Пробл. Туб. – 2008. - № 11. – С. 48 – 55.
277. Лекарственная чувствительность *M tuberculosis* в сопоставлении с их жизнеспособностью, цитотоксичностью, генотипом и течением процесса у больных туберкулезом органов дыхания / О.А. Макничева, Е.Б. Ласунская, В.Ю. Журавлев [и др.] // Пробл. Туб. – 2008. - № 12. – С. 18 – 22.
278. Pilloud M.C. Parameters of activation of the membrane-bound O₂- generating oxidase from bovine neutrophils in a cell-free system / M.C. Pilloud, J. Doussiere, P.V. Vignais // Biochemical and Biophysical Research Communications. - 1989. - FEBS Lett. V.257. – P. 167-170.
279. Perez H.D. Generation of a chemotactic lipid from arachidonic-acid by exposure to a superoxide-generating system / H.D. Perez, V.B. Weksler, I.M. Goldstein // Inflammation. – 1980. - №4. – P.313-328.
280. Роль процессов свободнорадикального окисления в патогенезе инфекционных болезней / А.П. Шепелев., И.В. Корниенко, А.Н. Шестопапов [и др.] // Вопросы медицинской химии. - 2000. - №2. – С. 24-27.
281. Вольский Н.Н. Влияние супероксидного радикала на пролиферацию лимфоцитов, стимулированную митогеном / Н.Н. Вольский, Н.В. Кашлакова, В.А. Козлов // Цитология. – 1988. – Т. 30. – С. 898-902.
282. Burdon R.H. Released active oxygen species as intercellular signals: their role in regulation of normal and tumor cell proliferation / R.H. Burdon // Biol. Chem. Hoppe-Seyler. - 1992. - V. 373. - № 9. - P. 739–740.

283. Маянский А.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге / А.Н. Маянский, Д.Н. Маянский - Новосибирск: Наука, Сиб. отд-ние. - 1989. - 344 с.
284. Владимиров Ю.А. Хемилюминесценция клеток животных / Ю.А. Владимиров, М.П. Шерстнев - Итоги науки и техники. Сер.Биофизика./ ВИНТИ,1989. – Т.24. – 176 с.
285. Маянский А.О. Клинические аспекты фагоцитоза / А.О. Маянский, О.И. Пикуза - Казань: Магариф. – 1993. - 200 с.
286. The antioxidant action of human extracellular fluids / M. Wasil, B. Halliwell, D. Hutchinson, H. Baum // *Biochem. J.* – 1987. - V.243. – P. 219-223.
287. Свободные радикалы в живых системах / Ю.А. Владимиров, О.А. Азизова, А.И. Деев [и др.] - Итоги науки и техники. Сер. Биофизика / ВИНТИ, 1991. - Т. 29. - 252 с.
288. Oxidant injury of cells / I.U. Schraufstatter, P.A. Hyslop, J. Jackson [et al] // *Int J Tissue React.* - 1987. – V. 9, №4. - P. 317-324.
289. Меньшикова Е. Б. Биохимия окислительного стресса. Оксиданты и антиоксиданты / Е. Б.Меньшикова, Н. К. Зенков, С. М. Шергин - Новосибирск, - 1994. - 203 с.
290. Коржов В.И. Роль системы глутатиона в процессах детоксикации и антиоксидантной защиты (обзор литературы) / В.И. Коржов, В.Н. Жадан, М.В. Коржов // *Журн. АМН України.* - 2007. –Т.13, №1. – С. 3-19.
291. Chen C.L. Simultaneous characterization of glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms by polymerase chain reaction in American whites and blacks / C.L. Chen, Q. Liu, M.V. Relling // *Pharmacogenetics.* – 1996. - №2. – P. 187-191.
292. Glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms in Brazilian African descendants / Hiragi Cde O, S.F. de Oliveira, A. Hatagima [et al.] // *Hum.biology.* – 2007. - №1. – P.131 – 140.
293. Glutathione S-transferase theta 1 gene deletion and risk of acute myeloid leukemia / C. Crump, C. Chen, F.R. Appelbaum [et al.] // *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.* – V. 9. – 2000. – P. 457-460.

294. Combinations of the variant genotypes of GSTP1, GSTM1 and p53 are associated with an increased lung cancer risk / D.P. Miller, G. Liu, I. De Vivo [et al.] // *Cancer Research*. – 2002. - V. 62. – P. 2819-2823.
295. Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism / S. Pemble, K. R. Schroeder, S. R. Spencer [et al.] // *Biochem. J.* - 1994.- V.300. – P. 271 - 276.
296. О.О. Сметюк Вікові особливості поліморфізму генів глутатіон-S-трансфераз M1 і T1 у мешканців Одеської області / О.О. Сметюк, М.М. Чеснокова, Ю.І. Бажора // *Досягнення біології і медицини*. – 2009. - №2.- С.55 – 57.
297. Expression profiling identifies genes involved in emphysema severity / M. Santiyagu, F. Savarimuthu, Jill E Larsen [et al.] // *Respiratory Research*. – 2009. - № 10. – P. 45 - 49.
298. Полиморфизм генов глутатіон-S-трансфераз M1 і T1 и риск заболевания детей эхинококкозом / Г.И.Лукманова, М.А. Комиссарова, А.А. Гумеров [и др.] // *Мед. паразитология и паразитарные болезни*. - 2006. - № 3. - С. 15-18.
299. Шмелев Е.И. Совершенствование лечения бронхиальной обструкции у больных туберкулезом легких / Е.И. Шмелев // *Пульмонология*. - 2001. – Вып. 1. – С. 23-27.
300. Шмелев Е.И. Хроническая обструктивная болезнь легких и сопутствующие заболевания / Е.И. Шмелев // *Пульмонология*. - 2007. – Вып. 2. – С. 5-9.
301. Kharitonov S.A. Exhaled markers of pulmonary disease / S.A. Kharitonov, P.J. Barnes // *Am.J. Respir.Crit.Care Med.* – 2001. – V.163. – P.1693 – 1722.
302. Анаев Э.Х. Конденсат выдыхаемого воздуха в диагностике и оценке эффективности лечения болезней органов дыхания / Э.Х. Анаев, А.Г. Чучалин // *Пульмонология*. – 2006. - №4. – С.12 – 20.
303. Комлевий О.М. Добові зміни конденсату вологи видихуваного повітря в юнаків та дівчат отримані за допомогою методу лазерної кореляційної спектроскопії // О.М. Комлевий, М.М. Чеснокова / *Буковинський медичний вісник*.- 2006. - №4.- С.74-76.

304. Титов В.Н. С-реактивный белок: гетерогенность и функциональная связь с окислительным стрессом как с маркером воспаления / В.Н. Титов // Клин, лаб. диаг. - 2004. - № 7. - С. 3-12.
305. Классификация результатов исследования плазмы крови с помощью лазерной корреляционной спектроскопии на основе семиотики предклинических и клинических состояний / К.С. Терновой, Г.Н. Крыжановский, Ю.И. Музычук [и др.] // Укр. биохим. жур. – 1998. - № 2.- С. 53-65.
306. Романчук А.П. Результаты применения метода лазерной корреляционной спектроскопии в спорте. Теория и практика физической культуры - [Электронный ресурс].- Режим доступа до документу : <http://lib.sportedu.ru/Press/TPFK/2002N1/p35-37.htm>
307. Jordao L. Tuberculosis: New Aspects of an Old Disease / L. Jordao, O.V. Vieira // Int J Cell Biol. - 2011 [Электронный ресурс].- Режим доступа до документу: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3132536/?report=abstract>
308. Dannenberg A. M. Pathogenesis of pulmonary tuberculosis: an interplay between tissue-damaging and macrophage-activating immune responses: dual mechanisms that control bacillary multiplication / A. M. Dannenberg, G. A. Rook. In B. R. Bloom (ed.), Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control. ASM Press, Washington, D.C., 1994 - P. 459-484.
309. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Genotype Is an Independent Risk Factor for Tuberculosis Treatment Failure in Indonesia / I. Parwati, B. Alisjahbana, L. Apriani [et al.] // J. Inf. Dis. – 2010. - V.201. - P. 553–557.
310. Intact pks15/1 in non-W-Beijing *Mycobacterium tuberculosis* isolates / A. Chaiprasert, J. Yorsangsukkamol, T. Prammananan [et al.] // Emerg Infect Dis. – 2006. – V.12. – P. 772–774.
311. Mutations in *mutT* genes of *Mycobacterium tuberculosis* isolates of Beijing genotype / N. Lari, L. Rindi, D. Bonanni [et al.] // J Med Microbiol. - 2006.- V. 55. – P. 599–603.