

Певний інтерес становлять зміни, які були нами виявлені, у клітинах печінки. У місцях прилягання проленового імплантата до діафрагмальної поверхні печінки, у віддалені терміни спостереження, визначається крайова гідропічна дистрофія гепатоцитів, яка може бути розцінена як результат короткодистантного впливу використаного полімерного матеріалу.

### Висновки

Експериментальне використання розробленого способу пластики грижі стравохідного отвору діафрагми проленовим імплантатом дозволило надій-

но ушити стравохідний отвір без порушення її функціонального стану. Тканинна реакція мала проліферативний характер без ексудативних проявів. У місцях контакту полімерного матеріалу з внутрішніми органами, зокрема з печінкою, утворюється сполучнотканинна капсула, що її розмежує. Реакцію гепатоцитів можна охарактеризувати як помірну гідропічну дистрофію без ознак порушення функціонального стану.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Аллахвердян А. С. Анализ неудач и ошибок антирефлюксных операций / А. С. Аллахвердян // *Анналы хирургии*. — 2005. — № 2. — С. 8-15.

2. Андреещев С. А. Пути улучшения результатов лечения грыжи пищеводного отверстия диафрагмы / С. А. Андреещев, С. Д. Мясоедов, П. Н. Кондратенко // *Клін. хірургія*. — 2003. — № 11. — С. 5-6.

3. Балацкий Е. Р. Пластика грыжи брюшной стенки с использованием проленовой сети при лапароскопической холецистэктомии и в общехирургической практике / Е. Р. Балацкий, К. К. Скворцов, А. А. Щербинин // *Клін. хірургія*. — 2003. — № 4-5. — С. 65.

4. Борисов А. Е. Пластика больших фиксированных параэзофагальных грыж с использованием полипропиленовой сетки / А. Е. Борисов, С. К. Малкова, В. В. Тоидзе // *Вестник хирургии*. — 2001. — Т. 160, № 3. — С. 43-45.

УДК 616-002.5-079.4:577.21:615.015.8

В. Й. Кресюн, К. О. Антоненко

## ІНФОРМАТИВНІСТЬ ГЕНОТИПУВАННЯ ЗБУДНИКА ТУБЕРКУЛЬОЗУ

Одеський державний медичний університет

### Вступ

Відкриття поліморфних ділянок, що повторюються, у ланцюжку нуклеотидів ДНК збудника туберкульозу надало можливість вивчати «молекулярні відбитки пальців» — генотип збудника туберкульозу. При цьому отримана інформація має допомогти зрозуміти проблему патогенезу туберкульозної інфекції та шляхи її поширення [1].

Генотипування ізолятів ДНК збудника туберкульозу, виділених від хворих, може бути інформативним у разі виявлення медикаментозної нечутливості, коли необхідно вирішити питання про те, чи є стійкість набутою внаслідок неефективної терапії або відбулася реінфекція новим стійким штамом.

Якщо генотипові зразки мікобактерій туберкульозу до й під час лікування збігаються, то це свідчить про набуття стійкості під час лікування. Причини можуть бути різні — невдала комбінація або недостатні дози препаратів, недотримання пацієнтом рекомендацій щодо лікування. Якщо «молекулярні відбитки пальців» різні, то це свідчить про повторне інфікування (реінфекція) іншим штамом, що потребує корекції протитуберкульозного лікування [2].

До методів генотипування, які базуються на ПЛР, належить метод VNTR (Variable Number Tandem Repeats), в основі якого є виявлення поліморфізму низки мінісателітних ділянок за допомогою індивідуальної пари праймерів. При цьому моле-

кулярна маса продуктів ампліфікації свідчить про кількість повторів мінісателітної послідовності. Сьогодні найбільш поширений різновид даного методу — це MIRU-VNTR (Mycobacterium Interspersed Repetitive Units), який досліджує низку локусів збудника туберкульозу [3].

За даними попередніх досліджень, проведених на Півдні України, роздільна здатність локусів VNTR була неоднаковою [4]. Найбільша чутливість спостерігалася при дослідженні локусів MIRU26, MIRU31, MIRU40, ETR A (Exact Tandem Repeat).

**Метою** даного дослідження було отримати генетичні профілі мікобактерій за допомогою визначення шести локусів VNTR (MIRU10, MIRU26, MIRU31, MIRU39, MIRU40, ETR A) та вивчити особливості генотипу ме-



дикаментозно-резистентних штамів мікобактерій у хворих на туберкульоз.

### Матеріали та методи дослідження

Для вивчення розповсюдженості резистентних штамів *M. tuberculosis* був проведений ретроспективний аналіз бактеріологічних досліджень на стійкість до протитуберкульозних препаратів, виконаних у бактеріологічній лабораторії Одеської обласної клінічної протитуберкульозної лікарні (ООКПЛ) протягом 2006 р. [5].

Для отримання статистичних даних вивчали медичні карти пацієнтів, що перебували чи перебувають на лікуванні в ООКПЛ. Виділення ДНК культур збудника туберкульозу проводили на базі бактеріологічної лабораторії ООКПЛ.

Генотипування здійснювали за допомогою ПЛР шляхом визначення кількості повторів певних локусів, а саме MIRU10, MIRU26, MIRU31, MIRU39, MIRU40, ETR A у генотипі мікобактерій туберкульозу. Для кожного локусу використовувалася власна пара праймерів, при цьому розмір фрагмента залежав від наявності та кількості повторів однакових ДНК-последовностей [6]. Аналіз дискретних здатностей VNTR-методу проводили на підставі обчислення індексу Хантера — Гастона [4]. Значення індексу від 0,6 і більше відповідають високій чутливості методу генотипування, від 0,3 до 0,6 — помірній чутливості, менше 0,3 — низькій чутливості.

Для визначення мутацій у кодоні 315 гені *katG* виконували мультиплексну алель-специфічну полімеразно-ланцюгову реакцію (МАС-ПЛР) [7]. Для визначення мутацій у гені *rpoB*, а саме в кодонах 516, 526 та 531, проводили МАС-ПЛР із використанням трьох праймерів [8]. Для встановлення належності штамів, що досліджувалися, до родини *Beijing* застосовували визначення інсерційної послідовності IS6110 у regio-

ні між генами *dnaA* і *dnaN* методом ПЛР [9].

Статистичну обробку отриманих матеріалів проводили за допомогою пакета програм Microsoft Excel.

### Результати дослідження та їх обговорення

Загалом було досліджено 106 ДНК-ізолятів, отриманих із культур посівів мокротиння. З цього числа 46 зразків належали до родини *Beijing* (43,4 %), 60 культур — до інших родин (*non-Beijing*) (56,6 %).

Серед ізолятів, що належали до родини *Beijing*, 87,0 % у локусі MIRU10 мали 3 повтори (табл. 1). В іншому локусі MIRU26 переважали культури

з 5 (47,8 %), 7 (21,7 %) і 8 (17,4 %) повторами. Серед зразків із родини *Beijing* 54,3 і 30,4 % мали в локусі MIRU31 5 і 6 повторів відповідно. Більш ніж 97,8 % ДНК-ізолятів мали в локусі MIRU39 3 повтори. У локусі MIRU40 56,5 % зразків мали 3 повтори, 32,6 % — 4 повтори, а у локусі ETR A культури родини *Beijing* головним чином розділилися на ті, що мали 4 (60,9 %) повтори, і ті, що мали 5 (34,8 %) повторів.

При аналізі ізолятів, що належали до групи *non-Beijing*, було виявлено більшу розпорошеність зразків серед груп із різною кількістю повторів локусів, які досліджувалися (табл. 2). Так, у локусі MIRU10 чимала

Таблиця 1

Поліморфізм локусів при VNTR-типванні штамів родини *Beijing*

Кількість повторів	Локуси						Усього
	10	26	31	39	40	A	
1	1	1	—	—	—	—	2
2	1	—	3	1	5	—	10
3	40	—	1	45	26	1	113
4	3	1	3	—	15	28	50
5	—	22	25	—	—	16	63
6	—	4	14	—	—	—	18
7	—	10	—	—	—	1	11
8	1	8	—	—	—	—	9
9	—	—	—	—	—	—	0
10	—	—	—	—	—	—	0
Разом	46	46	46	46	46	46	

Таблиця 2

Поліморфізм локусів при VNTR-типванні штамів, що належали до родини *non-Beijing*

Кількість повторів	Локуси						Усього
	10	26	31	39	40	A	
1	—	11	1	2	5	—	19
2	4	—	32	54	7	21	118
3	13	2	24	4	23	22	88
4	23	1	2	—	18	13	57
5	11	34	—	—	5	3	53
6	1	11	1	—	1	1	15
7	6	—	—	—	1	—	7
8	1	1	—	—	—	—	2
9	1	—	—	—	—	—	1
10	—	—	—	—	—	—	0
Разом	60	60	60	60	60	60	



кількість ізолятів мала 4 (38,3 %), 3 (21,7 %) і 5 (18,3 %) повторів. В іншому локусі MIRU26 переважали культури з 5 (56,7 %) повторами і по 18,3 % мали 1 або 6 повторів. Абсолютна кількість ізолятів із групи *non-Beijing* у локусі MIRU31 мали 2 або 3 повтори (53,3 і 40,0 % відповідно). Також більшість культур у локусі MIRU39 мали 2 (90,0 %) повтори. Щодо локусу MIRU40, то 38,3 % ізолятів мали 3 повтори і 30,0 % — 4 повтори. Нарешті, у локусі ETR A траплялися майже однаково часто 2 і 3 повтори (35,0 і 36,7 % відповідно), рідше — зразки з 4 (21,7 %) повторами.

У ізолятів із групи *Beijing*, за даними MIRU10-MIRU26-MIRU31-MIRU39-MIRU40-ETR A, найбільш поширеною комбінацією була 355335 (5 культур), рідше виявлялися комбінації 355344, 355345, 356335, 356344, 365334, 375334, 375344, 385334 (кожна траплялася у 2 культур) і 385345 (3 культури). Загалом серед культур родини *Beijing* було виявлено 10 кластерів, до яких належали 24 зразки. Решта — 22 зразки — це унікальні ізоляти.

У культур із групи *non-Beijing* найчастіше відзначалися комбінації 452242 (6 культур); 562242 і 712234 (по 3 культури кожна); 353233, 363233, 452252, 553213 (по 2 культури кожна). Загалом серед ізолятів, що належали до групи *non-Beijing*, було виявлено 7 кластерів, до яких належало 20 ДНК-ізолятів. Решта, а це 40 культур, — це унікальні ізоляти.

Для визначення ефективності методу типування за допомогою VNTR було проведено аналіз поліморфізму та роздільної здатності локусів, що досліджувалися, в обох групах (рисунок). Так, серед ізолятів, які належали до родини *Beijing*, низький поліморфізм спостерігався у MIRU10 і MIRU39; помірний поліморфізм — у MIRU40 і ETR A; високий поліморфізм — у MIRU26 і MIRU31. Водночас зазначений метод ви-

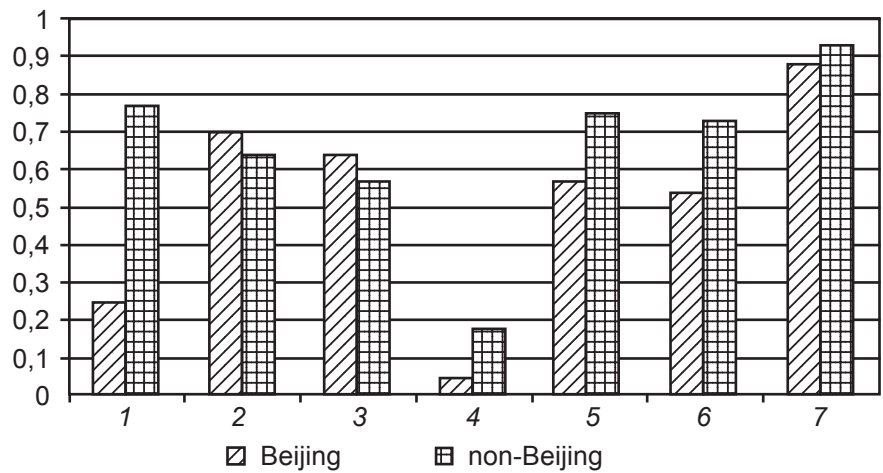


Рисунок. Роздільна здатність методу VNTR-типування для ізолятів збудника туберкульозу, що належать/не належать до родини *Beijing*: за віссю абсцис — показник індексу Пантера — Гастона; за віссю ординат — локуси, що досліджувались: 1 — MIRU10, 2 — MIRU26; 3 — MIRU31; 4 — MIRU39; 5 — MIRU40; 6 — ETR A; 7 — разом усі шість локусів

явив більшу чутливість серед ізолятів із групи *non-Beijing*. Так, низький поліморфізм спостерігався у MIRU39; помірний поліморфізм — у MIRU31 і високий поліморфізм — у MIRU10, MIRU26, MIRU40 і ETR A. Комбіноване визначення всіх шести локусів для генотипування як серед ізолятів групи *Beijing*, так і серед зразків групи *non-Beijing* було високоефективним (0,88 і 0,93 відповідно).

Загалом наведені дані про високий або помірний поліморфізм серед ізолятів із групи *non-Beijing* таких локусів, як MIRU10, MIRU26, MIRU31, MIRU40 і ETR A, збігаються з попередньо отриманими даними [4]. Найбільш поліморфним виявився локус MIRU10, який характеризувався найвищим значенням індексу Хантера — Гастона (0,78) і найбільшою кількістю алельних варіантів (у локусі від 2 до 9 копій, загальна кількість варіантів дорівнювала 8). Решта локусів із високим і помірним ступенем поліморфізму мали від 5 до 7 алельних варіантів. Локус із низьким ступенем різноманітності — MIRU31 — мав і найнижчу кількість варіантів — 3.

Деяко відмінна картина спостерігалася при VNTR-генотипуванні ізолятів із родини *Beijing*. Ці дані відрізняються від

попередньо отриманих результатів, згідно з якими лише локус MIRU26 виявив задовільний поліморфізм [4].

Із 46 ДНК-ізолятів, що належали до родини *Beijing*, 27 (58,7 %) були мультирезистентними. З'ясувалося, що всі культури з найбільш численного кластера 355335 (5 культур) були мультирезистентними. Також до мультирезистентних належали ізоляти з комбінаціями 375344 і 385334 (кожна комбінація виявлялася у 2 культур).

Серед 60 ДНК-ізолятів, що належали до групи *non-Beijing*, 24 (40,0 %) були мультирезистентними. Більшість ізолятів із комбінацією 452242 (5 культур) належали до мультирезистентних. Також мультирезистентними були ізоляти з комбінацією 562242 і 712234 (кожна комбінація виявлялася у 3 культур).

Кожний другий ізолят із 46 зразків родини *Beijing* мав одночасно мутації в кодоні 315 гена *katG* і кодоні 516/526/531 гена *rpoB*. Було з'ясовано, що одночасно мали обидві зазначені мутації ДНК-ізоляти з такими комбінаціями: 355335 (3 культури); 375344, 385345 і 385334 (кожна комбінація виявлялася у 2 культур).



Із 60 ДНК-ізолятів, які належали до групи *non-Beijing*, лише 15 (25,0 %) одночасно мали мутації, що досліджувалися, у генах *katG* і *rpoB*. Більшість ізолятів із комбінацією 452242 (5 культур) одночасно мали обидві мутації, що досліджувалися. Всі інші мутовані штами належали до унікальних ізолятів.

За даними локусів MIRU10, MIRU26, MIRU31, MIRU39, MIRU40 і ETR A, попередні дослідження виявили, що серед родини *Beijing* переважали ізоляти з профілями 355334 і 375334 [4]. Згідно з нашими даними, були виявлені такі кластери, як 355335, 355344, 355345, 356335, 356344, 375334, 375344, 385345, 385334. Водночас ці кластери були не надто чисельними — від 2 до 5 ізолятів у кожному. Також за попередніми даними, саме ізоляти з профілем 375334 були звичайними серед пацієнтів, які попередньо перебували в місцях позбавлення волі, і характеризувалися високим рівнем мультирезистентності [9]. За нашими даними, 100 % мультирезистентними були ізоляти з профілями 355335, 375334 і 385334. Ці ДНК-ізоляти також характеризувалися високою частотою одночасних мутацій у кодоні 315 гена *katG* і кодоні 516/526/531 гена *rpoB*. Кластери 375334 і 375344 у 75 % випадків були отримані від хворих, які були ВІЛ-позитивними; у 50 % випадків хвороба закінчувалася смертю хворого; у 100 % хворобі передував контакт із хворим на туберкульоз (в половині випадків — у місцях позбавлення волі). У середньому ж, ВІЛ-позитивними були близько 21,7 % хворих; летальний наслідок протягом першого року зареєстровано у 8,7 % хворих; контакт із туберкульозними хворими спостерігався у 63,4 % пацієнтів, які виділяли збудника туберкульозу з родини *Beijing*. Генотипування ізолятів, отриманих від пацієнтів, які одночасно хворіли на туберкульоз і були ВІЛ-по-

зитивними, має особливе значення, оскільки у цієї категорії хворих екзогенна реінфекція є головною причиною швидко прогресуючого туберкульозного процесу [10].

Серед ізолятів із групи *non-Beijing* найбільш поширеним був кластер 452242 (6 ізолятів). Культури, що мали цей профіль, характеризувалися високим рівнем як мультирезистентності, так і високою частотою одночасних мутацій, що вивчалися, у генах *katG* і *rpoB* (83,3 %). До речі, жоден із хворих, які виділяли збудника туберкульозу з профілем 452242, раніше не перебував у місцях позбавлення волі; попередній контакт із хворими на туберкульоз зареєстрований лише в половині випадків. Також мультирезистентними були кластери 562242 і 712234 (по 3 ізоляти кожний), що в 66,7 і 33,3 % випадків відповідно були виділені від ВІЛ-інфікованих осіб. Хворі, що виділяли збудника туберкульозу з профілем 553213 (2 ізоляти), були ВІЛ-інфікованими і раніше позбавленими волі.

### Висновки

1. Локуси MIRU10, MIRU26, MIRU40 і ETR A виявили високі поліморфізм у групі *non-Beijing*, локуси MIRU26 і MIRU31 — у родини *Beijing*.

2. За даними локусів MIRU10, MIRU26, MIRU31, MIRU39, MIRU40 і ETR A, серед ізолятів родини *Beijing* переважали такі кластери, як 355335, 355344, 355345, 356335, 356344, 375334, 375344, 385345, 385334.

3. Ізоляти родини *Beijing* із профілями 355335, 375334 і 385334 у 100 % випадків були мультирезистентними, а також характеризувалися високою частотою одночасних мутацій у генах *katG* і *rpoB*.

4. Серед ізолятів із групи *non-Beijing* найбільш розповсюдженим виявився кластер 452242. Культури, що мали цей профіль, характеризувалися як високим рівнем мультирезистент-

ності, так і високою частотою одночасних мутацій, що вивчалися, у генах *katG* і *rpoB*.

5. Отримані профілі збудника туберкульозу у подальшому можуть бути використані для підтвердження або спростування зовнішньої реінфекції при хронізації або рецидуванні туберкульозного процесу.

Окрему подяку висловлюємо В. В. Ніколаєвському (National Mycobacterium Reference Unit, London, UK) за консультативну допомогу під час виконання даної роботи.

### ЛІТЕРАТУРА

1. *Использование молекулярно-биологических методов для индивидуальной характеристики штаммов M. tuberculosis / Шемякин И. Г., Степанишина В. Н., Манзенюк О. К. и др. // Журн. микробиол., эпидемиологии и иммунологии. — 2000. — № 2. — С. 6-11.*

2. *Exogenous reinfection as a cause of recurrent tuberculosis in a low-incidence area / de Boer A. S., Borgdorff M. W., Vynnycky E. et al. // Tuberc. and Lung Diseases. — 2003. — Vol. 7. — P. 145-152.*

3. *Молекулярно-генетические механизмы туберкулезной инфекции / Бажора Ю. И., Кресюн В. И., Фещенко Ю. И. и др. — О.: Одес. гос. мед. ун-т, 2005. — 259 с.*

4. *Ніколаєвський В. В. Оптимізація стратегії генотипування Mycobacterium tuberculosis в Одеській області України: порівняння методів споліготипування та VNTR / В. В. Ніколаєвський // Одес. мед. журнал. — 2005. — № 3. — С. 32-39.*

5. *Протокол надання медичної допомоги хворим на туберкульоз: Наказ МОЗ України № 384 від 09.06.2006 р. / упоряд. Фещенко Ю. І., Кучугур-Кучеренко Л. В., Петренко В. М. та ін. — К., 2006. — 87 с.*

6. *Evaluation of the epidemiologic utility of secondary typing methods for differentiation of Mycobacterium tuberculosis isolates / Kwara A., Schiro R., Cowan L. S. et al. // J. Clin. Microbiol. — 2003. — Vol. 41, N 6. — P. 2683-2685.*

7. *Detection of Isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis strains by a multiplex allele-specific PCR assay targeting katG codon 315 variation / Mokrousov I., Otten T., Filipenko M. et al. // Ibit. — 2002. — Vol. 40, N 7. — P. 2509-2512.*



8. *Allele-specific rpoB assays for detection of Rifampin-resistant Mycobacterium tuberculosis in Sputum Smears* / I. Mokrousov, T. Otten, B. Vyshnevskiy, O. Narvskaya // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. — 2003. — Vol. 47, N 7. — P. 2231-2235.

9. *Genotypic Analysis of Mycobacterium tuberculosis in Bangladesh*

and Prevalence of the Beijing Strain / Banu S., Stephen V. Gordon, Si Palmer et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 2004. — Vol. 42, N 2. — P. 674-682.

10. *Molecular epidemiology and prevalence of mutations conferring rifampicin and isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis strains from the*

southern Ukraine / Nikolayevskyy V. V., Brown T. J., Bazhora Yu. I. et al. // *Clin. Microbiol. Infect.* — 2007. — Vol. 13, N 2. — P. 129-138.

11. *Карачунский М. А. Молекулярная эпидемиология туберкулеза / М. А. Карачунский, Л. Н. Черноусова // Проблемы туберкулеза и болезней легких*. — 2007. — № 4. — С. 3-7.

УДК 613:614.87(477.74)

Л. Г. Засипка

## ВПЛИВ НА РЕПРОДУКТИВНУ ФУНКЦІЮ КОМПЛЕКСУ ФАКТОРІВ ЗОВНІШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

Одеський державний медичний університет

Екологічна ситуація в Одеській області характеризується наявністю об'єктів промисловості з високим рівнем антропогенного впливу та її транспортно-географічним положенням [1–5]. Проведені екологічно-гігієнічні дослідження [5] дають підставу стверджувати, що найбільш значущими факторами довкілля, які можуть впливати на репродуктивне здоров'я населення Одеської області, є вміст нітратів у питних водах і ґрунті (перевищення до 3–5 ГДК), а також у ранній овочевій продукції (перевищення до 2 ГДК), забруднення повітря закритих приміщень радоном (перевищення до 10–12 ГДК) і високий вміст фтору в питних водах окремих районів (Тарутинський, Арцизький, Татарбунарський).

**Метою** дослідження була експериментальна перевірка гіпотези про можливість впливу на репродуктивне здоров'я комплексу факторів довкілля (нітрати, фториди, радон) у зонах формування антропогеохімічних аномалій.

### Матеріали та методи дослідження

Дослідження проводили на щурах лінії Вістар масою 180–

220 г. Був змодельований комплекс факторів хімічної (нітрати, фториди) та фізичної (радон-222) природи, який віддзеркалював реальну систему життєдіяльності населення досліджуваних районів. У експерименті було задіяно 12 груп тварин, із них дві — контрольні. Розподіл тварин за інтенсивністю факторів впливу наведений у табл. 1.

Нітрати та фториди тварини отримували щодня з питною водою, радон вводили їм інтраперитонеально з фізіологічним розчином натрію хлориду. Стандартні розчини радону отримували в радоновій лабораторії Лермонтовського санаторію, розведення розраховували до 192 Бк/мл на перші 2 год з моменту відбору радону з барботажного пристрою.

Дослід тривав 3 міс. Самець і самців спарювали на 30-й день експерименту. На 30, 45 і 90-й

день експерименту третину дослідних тварин забивали під тіопенталовим наркозом. Протягом терміну експерименту досліджували масу тварин, кількість самиць, що завагітніли, і величину та характеристики приплоду. На кінцевому етапі дослідження проводили забій тварин і взяття матеріалів для виконання патоморфологічних, біохімічних й імунологічних досліджень.

Взяття крові для біохімічних й імунологічних досліджень здійснювали з надрізаних кровоносних шийних судин. Шматочки внутрішніх органів (печінки, виличкової залози та гонад) після фіксації в нестерильному формаліні та відповідної проводки поміщали в парафінові блоки. Одержані зрізи забарвлювали гематоксилін-еозинном. Глікопротеїди визначали за допомогою PAS-реакції з відповідним ферментативним контро-

Таблиця 1

Характеристика дослідних груп

Фактори впливу	№ серії										
	1 К	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Нітрати, мг/добу	—	5	50	—	—	—	—	5	50	5	50
Фториди, мг/добу	—	—	—	1	10	—	—	1	10	1	10
Радон, Бк/добу	—	—	—	—	—	192	1920	—	—	192	1920

