

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. В умовах розвиненої епідемії туберкульозу (ТБ) в Україні, зареєстрованої ВООЗ у 1995 р., усе ще спостерігається подальше погіршення епідеміологічної ситуації. Захворюваність населення України на всі форми туберкульозу зросла за останні 10 років більш ніж удвічі, становивши в 2005 р. 84,1 на 100 тис. населення. У Миколаївській області захворюваність на туберкульоз на 100 тис. населення збільшилася з 26,7 у 1990 р. до 110,0 — в 2005 р. (Ю.І. Фещенко, 2006).

Особливістю сучасного туберкульозу є значна питома вага штамів, резистентних до одного або кількох протитуберкульозних препаратів (ПТП), що значною мірою обмежує можливості хіміотерапії і потребує якнайшвидшого впровадження сучасних методів лабораторної діагностики лікарської чутливості збудника туберкульозу (О.А. Журило і співав., 2002). Цілісна картина частоти і географії хіміорезистентного туберкульозу в Україні відсутня (Ю.І. Фещенко, 2002). У зв'язку з розвитком високого рівня резистентності до всіх антимікобактеріальних препаратів для лікування ТБ почали застосовувати інші препарати з антимікобактеріальними властивостями, наприклад фторхінолони (А.С. Ginsburg et al., 2003). В умовах неможливості проведення монотерапії фармакологи розробляють комбінації ПТП для підвищення ефективності лікування ТБ (С.А. Черенько, 2002). Вивчення розвитку резистентності до фторхінолонів і використовуваних комбінацій антимікобактеріальних препаратів є важливим для стратегії лікування хворих на ТБ.

Для виконання діагностики лікарської чутливості мікобактерій туберкульозу (МБТ) бактеріологічними методами потрібно не менше 8–10 тиж., що може призводити до невиправданого призначення препаратів, до яких штам мікобактерій, виділений від пацієнта, є резистентним. Наслідком цього є неефективність терапії, а також прогресивна селекція і поширення лікарсько-стійких штамів МБТ (В.М. Мельник, 2002).

Сучасні молекулярно-генетичні методи, основані на ідентифікації мутацій у ряді генів, відповідальних за розвиток лікарської стійкості, значно скорочують терміни визначення резистентності *M. tuberculosis* до ПТП і характеризуються високою чутливістю й специфічністю (М.А. Espinal, 2002). Впровадження їх в Україні нині стримується економічними причинами і відсутністю в деяких випадках нормативних документів. В умовах розвиненої епідемії ТБ в Україні необхідно впровадження в лікувальних закладах експрес-методів діагностики лікарської чутливості МБТ до ПТП, виявлення механізму розвитку резистентності, поширеності лікарські стійких штамів МБТ в окремих регіонах і проводити корекцію схем лікування ТБ з урахуванням

розповсюдженості резистентних штамів збудника туберкульозу до антимікобактеріальних препаратів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана згідно з планом науково-дослідницької роботи МОЗ України кафедри клінічної імунології, генетики та медичної біології Одеського державного медичного університету (ОДМУ) «Імуногенетичні, епідеміологічні, фармакогенетичні та клініко-мікробіологічні аспекти взаємовідносин у системі "паразит-хазяїн" при туберкульозній інфекції в умовах захворюваності на туберкульоз» (№ державної реєстрації 0104U010501). Дисертант є співвиконавцем зазначеної теми.

Мета та задачі дослідження. Метою дисертаційної роботи є підвищення ефективності фармакотерапії туберкульозу (на прикладі Миколаївської області) на основі вивчення молекулярно-генетичних особливостей розвитку резистентності мікобактерій до лікарських препаратів.

Для досягнення поставленої мети необхідно було виконати наступні задачі:

1. Провести ретроспективні дослідження і встановити поширеність первинної і набутої резистентності мікобактерій туберкульозу до протитуберкульозних препаратів першого і окремих препаратів другого ряду в Миколаївській області.

2. Провести порівняльний аналіз і дати об'єктивну оцінку молекулярно-генетичним і бактеріологічним методам дослідження діагностики первинної і набутої стійкості *M. tuberculosis* до широко застосовуваних у Миколаївській області протитуберкульозних препаратів.

3. Вивчити молекулярно-генетичні основи розвитку резистентності мікобактерій туберкульозу в процесі лікування різними комбінаціями антимікобактеріальних препаратів.

4. Порівняти поширеність мікобактерій туберкульозу, резистентних до препаратів першого і окремих препаратів другого ряду (фторхінолонів), і виявити можливість розвитку перехресної стійкості.

5. Розробити практичні рекомендації щодо діагностики резистентності мікобактерій туберкульозу і використання різних комбінацій протитуберкульозних препаратів у лікуванні туберкульозу, викликаного лікарсько-стійкими штамми.

Об'єкт дослідження – молекулярно-генетичні механізми розповсюдження резистентних до протитуберкульозних препаратів штамів збудника туберкульозу.

Предмет дослідження – молекулярно-генетичні особливості розповсюджених в Миколаївській області штамів *M. tuberculosis* та їх роль в

розвитку первинної і вторинної стійкості до сучасних протитуберкульозних препаратів.

Методи дослідження – бактеріологічні, молекулярно-генетичні та статистичні.

Наукова новизна отриманих результатів. Уперше вивчено рівні поширеності резистентних штамів мікобактерій туберкульозу в Миколаївській області України, динаміку їхнього росту в період 2000–2005 рр. і роль резистентних штамів в епідеміологічній ситуації з туберкульозу. Вперше вивчено рівні первинної і набутої стійкості *M. tuberculosis* до препаратів першого, окремих препаратів другого ряду і фторхінолонів. Вивчено молекулярно-генетичні механізми розвитку первинної і вторинної резистентності МБТ у досліджуваному регіоні, виявлені мутації в генах *rpo B*, *kat G*, *inh A*, штами сімейства Beijing. Проведено порівняльну характеристику бактеріологічних і молекулярно-генетичних методів діагностики хіміорезистентного туберкульозу в конкретній епідеміологічній ситуації. Представлена картина частоти поширення резистентних штамів *M. tuberculosis* до окремих ПТП у Миколаївській області дозволяє орієнтуватися в чутливості МБТ до призначуваних препаратів до одержання даних бактеріологічних досліджень. Вперше розроблена й апробована анкета для одержання вихідних даних перед вибором хіміотерапії, визначення категорії хворих, аналізу епідеміологічної ситуації і створення банку даних груп ризику. Вперше проведено аналіз ефективності терапії туберкульозу, спричиненого лікарсько-стійкими штамми МБТ, і визначено препарати та їхні комбінації, придатні для терапії туберкульозу при виникненні вторинної стійкості в Миколаївській області.

Практичне значення отриманих результатів. На основі застосування сучасних високоспецифічних і чутливих методів діагностики резистентних форм туберкульозу рекомендовано призначення адекватної хіміотерапії в режимі реального часу. На основі аналізу результатів лікування обґрунтовано і розроблено рекомендації з використання найефективніших комбінацій ПТП. На основі виявленої частоти мутацій у генах популяції *M. tuberculosis* у Миколаївській області України розроблено рекомендації з використання окремих препаратів I–II ряду. Визначення рівнів поширеності резистентних штамів мікобактерій дозволяє з'ясувати їх внесок в епідеміологічну ситуацію з туберкульозу в Миколаївській області. Використання розробленої й апробованої в ході досліджень анкети в одержанні вихідних даних при призначенні ПТП дозволяє аналізувати епідеміологічну ситуацію і створювати бази даних груп ризику. На основі вивчених рівнів резистентності штамів МБТ і динаміки її росту в період 2000–2005 рр. можливо дати прогноз розвитку епідеміологічної ситуації з туберкульозу. Отримані результати досліджень

впроваджені в учбовий процес кафедр загальної та клінічної фармакології, клінічної імунології, генетики та медичної біології ОДМУ, Миколаївського базового медичного коледжу, в лікувальний процес Миколаївського обласного протитуберкульозного диспансеру (МОПТД).

Особистий внесок здобувача. Автором самостійно здійснено інформаційно-патентний пошук, експериментальні дослідження, аналіз та узагальнення отриманих результатів, автор сформулював основні положення та висновки дисертації.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації були представлені у вигляді доповідей та отримали позитивні оцінки фахівців на VII з'їзді Всеукраїнського лікарського товариства (м. Тернопіль, 2003), на 14-му Європейському Конгресі з клінічної мікробіології та інфекційних хвороб (Прага, Чеська Республіка, 2004), на Міжнародній науково-практичній конференції «Розвиток наукових досліджень 2005» (Полтава, 2005), на Міжнародній науково-практичній конференції «Наукові дослідження — теорія та експеримент 2006» (Полтава, 2006), на науковій конференції "Біофізичні стандарти та інформаційні технології в медицині" (Одеса, 2006).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 9 наукових робіт, з них 4 — наукові статті в провідних фахових виданнях ВАК України, 5 — тези доповідей на наукових конференціях, з'їздах, конгресі.

Структура й обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається з вступу, аналітичного огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, 4 розділів власних досліджень, обговорення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел із 208 найменувань (88 вітчизняних і країн СНД і 120 зарубіжних). Робота виконана на 127 сторінках машинописного тексту, ілюстрована 28 таблицями, 14 рисунками, містить 4 додатки.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ ДОСЛІДЖЕНЬ

Матеріали і методи дослідження. Проведено комплексні проспективні й ретроспективні дослідження. Ретроспективні дослідження динаміки розвитку резистентних форм *Mycobacterium tuberculosis* до ПТП у Миколаївській області України проведено протягом 2000–2005 рр. на основі даних лабораторних журналів реєстрації резистентних форм МБТ. Проспективні дослідження проведені в 2003 р. (I контрольна група — 146 осіб) за схемою: анкетування пацієнтів, що надійшли на лікування в МОПТД у період травень-липень, з використанням розробленої анкети для збору анамнестичних даних і даних для призначення хіміотерапії до одержання результатів про чутливість збудника туберкульозу; збір мокротиння; виготовлення мазків із забарвленням за методом Циля-Нільсона; бактеріоскопія мазків; бактеріологічні дослідження з

використанням щільного живильного середовища Левенштейна-Йенсена; визначення чутливості *M. tuberculosis* до протитуберкульозних препаратів I ряду (рифампіцин (R), стрептоміцин (S), ізоніазид (H), етамбутол (E), піразинамід (Z) і препаратів II ряду канаміцину (K), етіонаміду (Et) (за класифікацією згідно методичним рекомендаціям «Стандарти діагностики та лікування туберкульозу» Інституту фтизіатрії і пульмонології ім.Ф.Г.Яновського АМН України, 2004), використовуваних у схемах лікування резистентних форм туберкульозу в МОПТД з застосуванням методу абсолютних концентрацій; виділення ізолятів ДНК із вирощених культур МБТ і проведення молекулярно-генетичних досліджень (метод полімеразної ланцюгової реакції; гібридизації з олігонуклеотидними зондами для детекції мутацій у генах, відповідальних за розвиток резистентності; споліготипування для виявлення штамів генетичного сімейства Beijing). Контрольна група II (809 осіб) створена для вивчення рівнів поширеності резистентних штамів мікобактерій туберкульозу до препаратів групи фторхінолонів. Культури вирощені на щільному живильному середовищі Левенштейна-Йенсена, наявність чутливості до препаратів із групи фторхінолонів визначалася з використанням готових розведень препаратів (фірма "Himedia Laboratories", Індія) також методом абсолютних концентрацій.

Усі використані методи рекомендовані Наказом МОЗ України № 45 від 06.02.2002 р. «Про затвердження інструкції з бактеріологічної діагностики туберкульозної інфекції», методичними рекомендаціями МОЗ України з діагностики мультирезистентних форм туберкульозу. Дослідження проводилися відповідно до вимог комісії з біоетики ОДМУ (протокол № 115 від 3.07. 2006 р.) . Бактеріоскопічні і бактеріологічні дослідження проведені в бактеріологічній лабораторії МОПТД, молекулярно-генетичні — в лабораторії НДІ клінічної біофізики ОДМУ.

Вивчення впливу лікарської стійкості виділених штамів МБТ до ПТП (контрольна група I), наявності мутацій у генах МБТ, проведеної хіміотерапії (використовувані схеми і комбінації ПТП рекомендовані у відповідних вказівках МОЗ України без урахування рівнів резистентності МБТ у даному регіоні) на результат захворювання й ефективність лікування хворих на ТБ проведено в січні-лютому 2005 р. на основі даних картотеки хворих МОПТД і журналів лабораторних досліджень бактеріологічної лабораторії МОПТД.

Обробку результатів дослідження виконували за допомогою методів варіаційної статистики (S.A. Glantz, 1998) за пакетом запропонованих автором програм. Для оцінки достовірності відмінностей в результатах, які виражені в процентах, використовували метод оцінки відмінності між долями (Д.Ф.Лакин, 1990).

Результати досліджень та їх обговорення. Встановлено, що резистентність МБТ до ПТП препаратів індукується проведеною хіміотерапією. Про це свідчить ріст вторинної резистентності *M. tuberculosis* до антимікобактеріальних препаратів на фоні змін кількості використовуваних у схемі лікування хворих на ТБ препаратів і введення лікарських засобів, які раніше не використовувалися (табл. 1).

Діагностика первинної резистентності МБТ, обумовленої зараженням збудником із уже наявною стійкістю до ПТП, з використанням бактеріологічних методів, рекомендованих МОЗ України, не дозволяє вчасно призначити адекватну хіміотерапію і призводить до низьких результатів лікування резистентних форм ТБ (абацилювання в 4,59 % порівняно з очікуваними в Україні 70–75 %).

Таблиця 1

Динаміка виявлення резистентних форм *M. tuberculosis*
в Миколаївській області за період 2000–2005 рр.

Роки		2000	2001	2002	2003	2004	2005	
Всього досліджено культур		2221	1275	2989	3136	2932	3054	
Всього виділено резистентних форм		абс.	444	178	653	884	789	836
		%	19,9	13,9	21,8	28,2	26,9	27,4
У хронічних хворих	всього досліджено культур	абс	762	405	896	1106	1216	1422
	виділено резистентних форм	абс	374	109	510	804	669	711
		%	16,8	8,5	17,1	25,6	22,8	23,3
У первинних хворих	всього досліджено культур	абс	1459	870	2093	2030	1716	2231
	виділено резистентних форм	абс	70	69	143	80	120	125
		%	3,1	5,4	4,7	2,6	4,1	4,1

У результаті проведених проспективних і ретроспективних досліджень створена картина хіміорезистентного туберкульозу в Миколаївській області

України. Встановлено, що популяція МБТ в дослідженому регіоні характеризується унікальними відмінностями, що впливає на ефективність застосовуваної хіміотерапії, проведеної на основі рекомендованих МОЗ України схем лікування без обліку поширеності мутацій, відповідальних за розвиток резистентності до ПТП у генах *M.tuberculosis*.

Отримані результати свідчать про невисокі рівні поширення мультирезистентних форм збудника туберкульозу (табл. 2) і порівняні з цими рівнями дані про розвиток мутацій в області гена *pro B*, відповідальних за розвиток стійкості до рифампіцину.

Таблиця 2

Розвиток мультирезистентності збудника туберкульозу
протягом 2000–2004 рр.

Рік	Кількість виділених мультирезистентних штамів, %			RR
	загальна	у первин- них хво- рих	у хроніч- них хво- рих	
2000	9,8	1,4	8,4	6,03 (95% CI 4,14-8,78)
2001	9,3	3,1	6,3	2,56 (95% CI 1,79-36,8)
2002	14,6	2,3	12,3	5,24 (95% CI 4,08-6,74)
2003	19,6	1,3	18,3	14,0 (95% CI 10,26-19,11)
2004	19,5	2,6	16,9	6,63 (95% CI 5,23-8,40)

Примітка: різниця в розвитку мультирезистентних форм МБТ в групах первинних і хронічних хворих є статистично достовірною.

Низькі показники діагностики штамів генетичного сімейства Beijing (18,4%), яке асоціюється з мультирезистентністю, порівняно з даними літератури (до 44%), помітно відрізняє популяцію МБТ в Миколаївській області навіть від популяції в близько розташованій Одеській області — 51,9%.

Ці вигідні показники нівелюються в епідеміологічному відношенні ростом кількості полірезистентних штамів МБТ. Протягом досліджених п'яти років кількість ПТП, до яких одночасно стійкий виділений штам МБТ, збільшилася з 2 до 14. Звертає на себе увагу кількість комбінацій антимікобактеріальних препаратів, до яких штам МБТ є стійким (до 29).

Це характеризує як високий потенціал розвитку стійкості збудника туберкульозу в Миколаївській області, що позначається на епідеміологічній

ситуації з туберкульозу (і СНІДу, який асоціюється з туберкульозом) у даному регіоні.

Протягом 2000–2005 рр. превалює монорезистентність до стрептоміцину (до 87 штамів), але співвідношення цих штамів значно знизилося порівняно з іншими видами і з'явилися монорезистентні штами до антимікобактеріальних препаратів, що раніше не виявлялися, а ці препарати широко не використовуються в схемах лікування туберкульозу в Миколаївській області (S, H у 2000 р.; Z, Et, H, K, R, S у 2002 р.; Cl (кларітроміцин), Leo (левофлоксацин) у 2003 р. — штами виділені в первинних хворих). Аналіз літератури і власних досліджень показав перспективність використання препаратів із групи фторхінолонів, у яких виявлені антимікобактеріальні властивості, для лікування хворих на ТБ у Миколаївській області. Фторхінолони не належать до основних протитуберкульозних препаратів, але відсутність протягом 30 років розробок нових антимікобактеріальних препаратів, загрозлива епідеміологічна обстановка з туберкульозу, що склалася навіть у деяких розвинутих країнах, унікальна здатність мікобактерій туберкульозу виявляти стійкість до всіх ПТП потребують пошуку найбільш ефективних комбінацій відомих лікарських засобів з антимікобактеріальними властивостями з урахуванням діагностики мутацій у генах МБТ популяцій конкретних регіонів.

Низькі рівні резистентності штамів МБТ до препаратів із групи фторхінолонів (табл. 3) дозволяють рекомендувати ширше використовувати ці препарати в схемах лікування хворих із резистентними формами туберкульозу.

Таблиця 3

Результати бактеріологічної діагностики чутливості
виділених штамів до ципрофлоксацину і левофлоксацину

Характеристика штамів	Штами хворих, які ніколи не приймали ПТП	Штами хворих, які приймали раніше ПТП	Всього штамів
Виділено штамів	529	280	809
Резистентні до ципрофлоксацину	9 (1,7 %)	10 (3,6 %)	19 (2,3 %)
Резистентні до левофлоксацину	7 (1,3 %)	4 (1,4 %)	11 (1,4 %)
Резистентні одночасно до ципрофлоксацину і левофлоксацину	5 (0,9 %)	3 (1,0 %)	8 (1,0 %)

Примітка: суттєвих статистичних відмінностей між групами хворих, які ніколи не приймали ПТП і раніше приймали ПТП, не встановлено ($p > 0,05$).

Разом з тим, аналіз перехресної стійкості препаратів із групи фторхінолонів із препаратами I і окремими препаратами II ряду потребує проведення моніторингу за розвитком стійкості до цих препаратів.

Проаналізовані результати проведеної хіміотерапії в контрольній групі хворих (I) дозволили виявити найбільш і найменш ефективні поєднання протитуберкульозних препаратів, використовуваних у схемах лікування хворих на туберкульоз у Миколаївській області України (табл. 4). Окремий аналіз в групах первинних і хронічних хворих показав, що найбільш ефективно виявило себе поєднання препаратів S, H, R, Z, використане для лікування первинних хворих на туберкульоз, що виділяють чутливі штами МБТ, і з абацилярними формами (одужання — в 45 і 65,1 %).

Таблиця 4

Результати лікування і розвиток резистентності *M. tuberculosis* при використанні різних комбінацій протитуберкульозних препаратів у процесі лікування хворих, які виділяють чутливі та стійкі штами МБТ

Характеристика штамів	Комбінація препаратів	Результати лікування	Дані у відсотках
Чутливі штами мікобактерій туберкульозу N=71 49,3 %	S, H, R, Z	Перехід у хронічну форму	20 %
		Одужання	38,5 %
		Абацилювання	10 %
		Розвиток резистентності	2,85 %
		Летальний кінець	14,28 %
		Немає даних про результати лікування	14,28 %
Резистентні форми мікобактерій туберкульозу N=15, 10,4 %	2–3 препарати із К, H, R, E, Et + фторхінолони	Одужання	20 %
		Прогресування захворювання	46,6 %
		Летальний кінець	33,3 %
Абацилярні форми N=58 40,2 %	S, H, R	Одужання	50 %
		Прогресування захворювання	15,5 %
		Клініко-рентгенологічна стабілізація	3,4 %
		Летальний кінець	13,7 %
		Немає даних про результати лікування	17,2%

Найменш ефективною стала комбінація чотирьох препаратів з переліку H, R, E, K, Et, Q, використана для лікування хронічних хворих, що виділяють резистентні штами МБТ (одужання в 10 % випадків, прогресування захворювання в 60 %, у 30 % — летальний результат).

Ці результати підтверджують правомірність зв'язку результатів лікування, використаних препаратів і наявності в генах МБТ мутацій, відповідальних за розвиток стійкості до цих препаратів. Як показали молекулярно-генетичні дослідження, в штаммах популяції *M. tuberculosis*, що циркулюють на території Миколаївської області, сформувався високий рівень резистентності до ізоніазиду і діагностовано мутації в області гена *kat G*, відповідального за розвиток стійкості до ізоніазиду в 85 % резистентних штамів (за даними літератури) і мутації в області гена *inh A*, що контролює резистентність до ізоніазиду, в 10 % штамів. В 36,8 % досліджених резистентних штамів МБТ було виявлено мутації в 315 кодоні гену *kat G* за рахунок експресії мутантних молекул білка, при цьому не відбулося активації ізоніазиду, тому що цей препарат є проліками і активується в організмі людини за допомогою фермента каталази-пероксидази — продукту експресії гену *kat G*. Місенс-мутація в цьому гені, що призвела до стійкості МБТ до ізоніазиду, пов'язана з заміною амінокислоти серин на тірозин. Мутації в 94 кодоні гену *inh A* пов'язані з заміною амінокислоти серин на аланін, що призводить до неможливості пов'язання ізоніазиду із своєю мішенню компонентів клітинної стінки (у першу чергу миколових кислот), які він інгібує і як наслідок приводить до стійкості МБТ до препарату. Мутація в гені *inh A* одночасно асоціюється зі стійкістю до етіонаміду, який використовується в схемах лікування хронічних хворих, що виділяють резистентні до ізоніазиду форми збудника туберкульозу. Для того, щоб пов'язати рівні поширення резистентних штамів до етіонаміду і неможливість досягнення планованих результатів лікування хворих на туберкульоз, проведено дослідження комбінацій ПТП, до яких виділений штам МБТ стійкий, і групи хворих, що виділяють резистентні до Et штами *M. tuberculosis*. В результаті було встановлено велике різноманіття комбінацій (до 21) антимікобактеріальних препаратів за участю етіонаміду в усіх досліджених групах хворих. Найгірша ситуація спостерігалася в групі хронічних хворих — жителів Миколаївської області.

Проведені дослідження дозволили пов'язати низькі показники ефективності лікування хворих на ТБ із хронічною формою захворювання, що виділяють резистентні до стрептоміцину штами МБТ, з аналогічною ситуацією при додаванні в схему лікування канаміцину.

Резистентність штамів МБТ до рифампіцину пов'язана з мутацією високонсервативної ділянки гену *rpo B*, який кодує амінокислоти 511-533. Досліджені штами МБТ характеризують як найбільш поширені в світі мутації в

кодоні 531 (серин) гену *rpo B* — у 28,5 % резистентних штамів МБТ до рифампіцину (для порівняння в Одеській області цей показник досягає 76,5 %), а також, які рідко зустрічаються, заміни в кодоні 526 (гістидин) — 50 % (17,6 % в Одеській області) і в кодоні 511-514 — 21,4 % (5,9 % в Одеській області). Таким чином, механізм розвитку резистентності штамів МБТ до рифампіцину значно відрізняє популяція збудника туберкульозу в Миколаївській області.

Порівняння отриманих результатів проведення хіміотерапії первинних хворих з використанням у схемі лікування піразинаміду ще раз підтверджує правомірність відповідності ефективності лікування і рівнів поширення резистентних штамів до того чи іншого препарату, включеного у схему лікування хворого.

Для визначення наявності в досліджуваній популяції МБТ штамів родини *Beijing* був використаний метод споліготипування по наявності і кількості спейсерів в DR-регіоні (прямих повторів) мікобактеріальної хромосоми. Була визначена наявність 9 останніх спейсерів з 43 в DR-регіоні, що характеризує епідеміологічно-небезпечну родину *Beijing* і доля таких штамів також значно відрізняє популяцію МБТ в Миколаївській області, її внесок складає 18,4 % (в порівнянні з розповсюдженням цих штамів в Росії до 70 %, в Одеській області — 51,9 %).

Використовувані в практичній медицині бактеріологічні методи визначення чутливості мікобактерій туберкульозу до антимікобактеріальних препаратів, рекомендовані Наказом МОЗ України № 45 від 06.02.2002 р., не дозволяють вчасно призначати адекватну схему лікування хворому на туберкульоз, що виділяє резистентні форми збудника. Це знайшло підтвердження в проведених дослідженнях специфічності, чутливості й ефективності бактеріологічних і молекулярно-генетичних методів визначення стійкості МБТ до антимікобактеріальних препаратів. Паралельне використання зазначених методів дозволило зробити висновок про однакову специфічність методів, але стосовно чутливості бактеріологічних методів відзначено значні розбіжності з даними, отриманими в ході молекулярно-генетичних досліджень як у кількості отриманих позитивних результатів, так і в діагностиці видів резистентності. Розбіжність результатів становила 42 %. Діагностика мультирезистентних форм ТБ непрямо характеризує ефективність порівнюваних методів. Бактеріологічні методи дослідження виявили з 15 діагностованих резистентних форм МБТ 10 мультирезистентних; молекулярно-генетичні методи дозволили в цій самій групі хворих виявити 29 резистентних форм і 16 із них — мультирезистентних.

Таким чином, отримані результати свідчать про необхідність вивчення картини хіміорезистентного туберкульозу з детекцією мутацій в областях генів МБТ, відповідальних за розвиток стійкості до протитуберкульозних препаратів,

що дозволить у режимі реального часу змінювати комбінації антимікобактеріальних засобів в умовах відсутності нових протитуберкульозних препаратів.

Отримані результати вказують на перспективність подальшого пошуку ефективних комбінацій протитуберкульозних препаратів на основі вивчення наявності мутацій у генах МБТ, що може знайти використання в практичній медицині для поліпшення ситуації з туберкульозу.

ВИСНОВКИ

В дисертації наведено теоретичне та експериментальне розв'язання важливого наукового завдання сучасної фармакології, що полягає в обґрунтуванні нових підходів до підвищення ефективності хіміотерапії туберкульозу. Отримані результати мають істотне значення для розробки шляхів корекції лікування резистентних форм туберкульозу.

1. Ріст захворюваності на туберкульоз у Миколаївській області України поєднується зі збільшенням первинної (з 3,15 до 4,09 %) і набутої (з 16,8 до 22,8 %) резистентності мікобактерій туберкульозу до протитуберкульозних препаратів першого ряду при зростанні кількості виділюваних полірезистентних (у первинних хворих — у 1,74; у хронічних у 1,8 разу) і мультирезистентних штамів *M. tuberculosis* (з 9,8 до 19,5 %). На цьому фоні зросла кількість (від 2 до 14) і різноманіття поєднань протитуберкульозних препаратів (від 2 до 29), до яких є одночасно стійким виділений від конкретного хворого штам МБТ.

2. Аналіз діагностики резистентності штамів *M. tuberculosis* показав, що молекулярно-генетичні методи значно вищі за чутливістю при визначенні резистентності МБТ (в 1,93 рази), при визначенні мультирезистентності *M. tuberculosis* (в 1,61 рази) і за ефективністю (на 34,6 %) в порівнянні з бактеріологічними методами.

3. В основі розвитку високого рівня резистентності досліджуваних штамів МБТ лежать зміни геному *M. tuberculosis*, а саме: частота мутацій у генах МБТ, відповідальних за розвиток лікарської стійкості до рифампіцину (область гена *rpo B*), становила 36,8 %, до ізоніазиду (область гена *kat G*) — 44,7 %, до етіонаміду (область гена *Inh A*, також пов'язана з резистентністю до ізоніазиду) — 15,7 %. У різноманітті виділених від хворих штамів мікобактерій туберкульозу, стійких до протитуберкульозних препаратів I, II ряду і резервних препаратів, превалював штам МБТ, стійкий до комбінації стрептоміцин + ізоніазид (препаратів першого ряду) — 43,9 %.

Звертає на себе увагу низька (18,4 %) частота зустрічальності поширених у сусідніх регіонах України та інших країнах Східної Європи штамів МБТ, що належать до сімейства Beijing.

4. Дослідження довели, що у Миколаївській області резистентність *M. tuberculosis* до окремих препаратів I–II ряду в 2003 р. становила: загальна — 28,18 % (у первинних хворих — 2,58 %; у хронічних хворих — 25,6 %). Стійкість до препаратів групи фторхінолонів становила: 1,5 % — до левофлоксацину; 2,3 % — до ципрофлоксацину. Спостерігається тенденція до росту кількості резистентних штамів, виділених у первинних хворих, до основних ПТП (до 4,09 %). Виявлено перехресну стійкість: більше 90 % левофлоксацин-резистентних штамів одночасно стійкі до 9 інших основних ПТП. Штами, резистентні до ципрофлоксацину, давали найвищі рівні перехресної стійкості до стрептоміцину, ізоніазиду, етамбутолу й піразинаміду (по 84,2 %), а також до циклосерину (78,9 %).

5. Ефективність протитуберкульозної терапії підвищується при використанні вихідних даних, отриманих із розробленої нами в ході проспективних досліджень анкети. Її можна рекомендувати для проведення аналізу епідеміологічної ситуації з туберкульозу в Україні і створення бази даних за групами ризику.

6. Дослідження показали, що найефективнішим поєднанням антимікобактеріальних препаратів є комбінація стрептоміцин + ізоніазід + рифампіцин + піразинамід (одужання в групі первинних хворих з абацилярними формами туберкульозу становило 65,1 %, а в групі хворих, у яких виділено чутливі до зазначеної комбінації препаратів штами *M. tuberculosis*, — 45 %). В групі хворих, що раніше приймали антимікобактеріальні препарати, і в яких виділено резистентні штами *M. tuberculosis*, найменш ефективним було поєднання препаратів із тих, що були в наявності, — ізоніазід, рифампіцин, етамбутол, канаміцин, етіонамід + препарат із групи фторхінолонів (одужання спостерігалось тільки в 10 %, прогресування захворювання — в 60 %, летальний кінець — в 30 % випадків).

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ РОБІТ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Застосування методів ДНК-аналізу у лабораторній діагностиці туберкульозу і мікобактеріозів / В. В. Ніколаєвський, Ю. І. Бажора, К. О. Прудникова, Н. А. Левицька // Одес. мед. журнал. — 2002. — № 4 (72). — С. 18-21. (Особистий внесок здобувача: розробка загальної концепції та схеми наукового дослідження, проведено пошук і аналіз літературних джерел, експериментальні дослідження, статистична обробка результатів).

2. Медикаментозна резистентність мікобактерій туберкульозу, що були виділені від хворих в Миколаївській області України протягом 2000–2002 рр. / Н. А. Левицька, Ю. І. Бажора, В. В. Ніколаєвський, О. К. Асмолов // Укр.

пульмонол. журнал. — 2003. — № 4. — С. 17-20. (Особистий внесок здобувача: проведені експериментальні дослідження, статистична обробка результатів, підготовлено матеріал до друку).

3. Діагностика стійкості мікобактерій туберкульозу до фторхінолонів / О. К. Асмолов, Н. А. Левицька, В. В. Ніколаєвський, Ю. І. Бажора // Укр. хіміотер. журнал. — 2004. — № 1-2 (19). — С. 44-47. (Особистий внесок здобувача: проведено огляд літератури, експериментальні дослідження, статистична обробка результатів, підготовлено матеріал до друку).

4. Розповсюдженість лікарсько-стійких штамів мікобактерій туберкульозу в Миколаївській області України / Ніколаєвський В. В., Левицька Н. А., Бажора Ю. І., Асмолов О. К., Шишкін В. М. // Одес. мед. журнал. — 2004. — № 5 (85). — С. 91-95. (Особистий внесок здобувача: проведено огляд літератури, експериментальні дослідження, статистична обробка результатів, підготовлено матеріал до друку).

5. Стійкість до специфічної терапії туберкульозної палички в хворих на туберкульоз Миколаївської області України / Левицька Н. А., Ніколаєвський В. В., Шишкін В. М., Бажора Ю. І., Асмолов О. К. // Труды VII з'їзду ВУЛТ. — Тернопіль, 2003. — С. 81-82. (Особистий внесок здобувача: проведено огляд літератури, експериментальні дослідження, статистична обробка результатів, підготовлено матеріал до друку).

6. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Southern Ukraine: evidence of drug resistance rates and Beijing strains prevalence / Nykolayevskyy V., Brown T., Bazhora Y., Asmolov A., Levitskaya N., Drobniowski F. // Proc. 14th European Congress of Cl. Microb. and Infec. Diseases. — Prague, Czech Republic, 2004. — P. 81. (Особистий внесок здобувача: проведено огляд літератури, експериментальні дослідження, статистична обробка результатів).

7. Левицкая Н. А., Бажора Ю. И. Распространение мультирезистентного и полирезистентного туберкулеза в Николаевской области Украины // Матеріали Міжнародної наук.-практ. конф. «Розвиток наукових досліджень 2005». — Полтава, 2005. — С. 46-49. (Особистий внесок здобувача: проведено огляд літератури, експериментальні дослідження, статистична обробка результатів, підготовлено матеріал до друку).

8. Левицкая Н. А. Возникновение и распространение лекарственно-устойчивых штаммов *M. tuberculosis* в Николаевской области Украины // Матеріали Міжнародної НПК «Наукові дослідження — теорія та експеримент» 2006». — Полтава, 2006. — С. 45-49.

9. Левицкая Н. А. Анализ эпидемиологической ситуации с туберкулезом в Николаевской области Украины на основе результатов сполиготипирования выделенных штаммов микобактерий туберкулеза // Матеріали конференції

"Біофізичні стандарти та інформаційні технології в медицині". – Одеса, 2006. – С. 60-61.

АНОТАЦІЯ

Левицька Н. А. Молекулярно-генетичні особливості розвитку резистентності мікобактерій туберкульозу до лікарських засобів. — Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за фахом 14.03.05 — фармакологія. — Одеський державний медичний університет МОЗ України, Одеса, 2006.

Дисертація присвячена вивченню підвищення ефективності проведеної хіміотерапії туберкульозу в Миколаївській області на основі молекулярно-генетичних досліджень резистентних форм мікобактерій туберкульозу до протитуберкульозних препаратів. Як показали наші дослідження, популяція мікобактерій туберкульозу в Миколаївській області має унікальні особливості розвитку стійкості до антимікобактеріальних препаратів, що виявляється в рівнях первинної (4,78 %) і набутої (28,18 %) резистентності до протитуберкульозних препаратів; у наявності мутацій в областях генів *kat G*, *inh A*, відповідальних за розвиток стійкості мікобактерій до ізоніазиду і етіонаміду; виявлених штамів генетичного сімейства Beijing (18,4 %). Встановлено, що популяція мікобактерій туберкульозу в Миколаївській області характеризується низьким рівнем резистентності до препаратів із групи фторхінолонів (1,0 %). Отримані результати показали, що низькі показники ефективності лікування хронічних хворих, які виділяють резистентні штами до ізоніазиду, з використанням у схемі лікування етіонаміду, пов'язані з рівнем поширення штамів, стійких до цього препарату; аналогічна ситуація проявилася й у призначенні канаміцину в лікуванні хронічних хворих, які виділяють резистентні штами до стрептоміцину. Порівняльний аналіз результатів діагностики резистентних форм туберкульозу з використанням бактеріологічних і молекулярно-генетичних методів показав незаперечну перевагу молекулярно-генетичних методів як у часі (24–36 год і 1,5–2 міс), так і в чутливості (розбіжність у результатах у 41,9 %).

Ключові слова: протитуберкульозні препарати, полірезистентність, молекулярно-генетичні методи, мутації.

АННОТАЦИЯ

Левицкая Н. А. Молекулярно-генетические особенности развития резистентности микобактерий туберкулеза к лекарственным средствам. — Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.05 — фармакология. — Одесский государственный медицинский университет МЗ Украины, Одесса, 2006.

Диссертация посвящена изучению повышения эффективности проводимой химиотерапии туберкулеза в Николаевской области на основе молекулярно-генетических исследований резистентных форм микобактерий туберкулеза к противотуберкулезным препаратам. Как показали наши исследования, популяция микобактерий туберкулеза в Николаевской области обладает уникальными особенностями развития устойчивости к антимикобактериальным препаратам, что проявляется в уровнях первичной (4,78 %) и приобретенной (28,18 %) резистентности к противотуберкулезным препаратам; в наличии мутаций в областях генов *kat G*, *inh A*, ответственных за развитие устойчивости микобактерий к изониазиду — одному из самых эффективных противотуберкулезных препаратов I ряда и ассоциированной с ней устойчивостью к этионамиду — препарату II ряда. Мутации у 44,7% исследованных штаммов произошли в 315 кодоне гена *kat G*, миссенс мутация привела к замене аминокислоты серин на тирозин, при этом не произошла активация изониазида; у 15,7% штаммов возбудителя туберкулеза в 94 кодоне гена *inh A*, экспрессирующемся при синтезе белков клеточной стенки, произошла замена аминокислоты серин на аланин, что привело к невозможности связывания изониазида с мишенью-компонентами клеточной стенки, прежде всего миколовых кислот. Использованный метод гибридизации с олигонуклеотидными зондами позволил выявить мутации в высококонсервативном участке гена *rpo B* у 36,8% резистентных штаммов, выявленные олигонуклеотидные замены по данным литературы встречаются редко и значительно отличают популяцию микобактерий туберкулёза в Николаевской области, резистентные к рифампицину штаммы возбудителя туберкулеза в Одесской области характеризуются часто встречаемыми в мире (до 93%) мутациями с заменой нуклеотидов в позициях 526 (гистидин) и в позициях 531 (серин). Использование метода сполиготипирования позволило обнаружить в DR-регионе (регион прямых повторов микобактериальной хромосомы) микобактерий наличие последних 9 спейсеров из 43, что характеризует распространенные в мире (до 90%) штаммы семейства Beijing. В популяции МБТ в Николаевской области представительство штаммов Beijing незначительно и составляет 18,4%. Установлено, что популяция микобактерий туберкулеза в Николаевской области характеризуется низким уровнем

резистентности к препаратам из группы фторхинолонов (1,0 %), что в сложившейся неблагополучной ситуации по туберкулезу в исследованном регионе имеет стратегическое значение в лечении резистентных форм туберкулеза. Полученные результаты показали, что низкие показатели эффективности лечения хронических больных, выделяющих резистентные штаммы к изониазиду, с использованием в схеме лечения этионамида связаны с уровнем распространения штаммов, устойчивых к этому препарату II ряда в Николаевской области; аналогичная ситуация проявилась и в назначении канамицина — препарата II ряда в лечении хронических больных, выделяющих резистентные штаммы к стрептомицину. Пиразинамид и препараты из группы фторхинолонов обладают более выгодными позициями, связанными с низким уровнем распространения резистентных к ним штаммов МБТ, что и сказалось на результатах лечения больных туберкулезом. Сравнительный анализ результатов диагностики резистентных форм туберкулеза с использованием бактериологических и молекулярно-генетических методов показал неоспоримое преимущество молекулярно-генетических методов как во времени (24–36 ч и 1,5–2 мес.), так и в чувствительности (расхождение в результатах в 41,9 %).

Ключевые слова: противотуберкулезные препараты, полирезистентность, мутации, молекулярно-генетические методы.

SUMMARY

Levytsky N. A. Molecular-genetic features of developing of the mycobacterium tuberculosis drug resistance. — Manuscript.

Thesis for candidate scientific degree by specialty 14.03.05 — pharmacology. — Odessa State Medical University, Ministry of Health of Ukraine, Odessa, 2006.

Thesis is devoted to the study of increasing the effectiveness of tuberculosis chemotherapy that was put into practice in the Nikolaev region on the base of molecular-genetic research of the resistant forms of mycobacterium tuberculosis to antituberculous medications. As our researches have shown - the population of mycobacterium tuberculosis in Nikolaev region has the unique properties of developing the resistance to antimicrobial medications, that is shown in the levels of primary (4,78 %) and acquired (28,18 %) resistance to anti-TB medications; the presence of mutations in *kat G*, *inh A* genes, that are responsible for the development of mycobacterium's resistance to isoniasid and etionamid; discovered strains of Beijing genetic family (18,4 %). It is determined, that the population of mycobacterium tuberculosis in the Nikolaev region has the low level of resistance to the medications of fluoroquinolones group (1,0 %). The received results have shown, that low index of treatment effectiveness of the chronic patients, that discharge resistant cultures to isoniasid, using the etionamid in the treatment plan, are

connected to the level of spreading of the cultures, that are resistant to this medication; the similar situation was showed in purpose of the kanamicin in treatment of the chronic patients, that discharge resistant cultures to streptomycin. The comparative analysis of the results after diagnostics of the resistant forms of tuberculosis with use of bacteriological and molecular-genetic methods has shown conclusive advantage of the molecular-genetic methods as in time (24–36 hours and 1,5–2 months), and in sensitivity (a divergence in results is 41,9 %) of the method.

Key words: antitubercular preparations, polyresistency, molecular-genetic methods, mutations.

Підписано до друку _02._01.2007. Формат 60×84/16.
Папір письмовий. Друк різнографічний. Обл.-вид. арк. 0,9.
Тираж 100. Зам. _____.