

**ТКАЧЕНКО Олексій Андрійович**

доктор ветеринарних наук, професор
Дніпровський державний аграрно-економічний університет
ORCID ID: 0000-0003-0978-6575

БІЛАН Марина Володимирівна

кандидат ветеринарних наук, доцент
Дніпровський державний аграрно-економічний університет
ORCID ID: 0000-0003-3178-201X

ГЛЕБЕНЮК Володимир Володимирович

кандидат ветеринарних наук, доцент
Дніпровський державний аграрно-економічний університет
ORCID ID: 0000-0001-5599-651X

АЛЕКСЄВА Наталія Вікторівна

кандидат ветеринарних наук, доцент
Дніпровський державний аграрно-економічний університет
ORCID ID: 0000-0003-1984-5209

ГАВРИЛІНА Олена Геннадіївна

кандидат ветеринарних наук, доцент
Дніпровський державний аграрно-економічний університет
ORCID ID: 0000-0001-9624-9510
Україна

ЛІПІДИ ТА ВІРУЛЕНТНІСТЬ ПАТОГЕННИХ І НЕПАТОГЕННИХ МІКОБАКТЕРІЙ

У світі прокаріотів мікобактерії займають особливе місце за складністю організації їхньої оболонки, в якій важливу роль відіграють ліпіди, які надзвичайно різноманітні і складні. Загальний вміст ліпідів у клітинах мікобактерій складає 10–60 %¹, в той час як у клітинах інших прокаріотів не переважає 5 %².

З високим вмістом загальних ліпідів пов'язують високу стійкість мікобактерій до несприятливих умов зовнішнього середовища³.

Як стверджує ряд вчених⁴ ліпіди виконують багато важливих біологічних функцій. Як основна частина поверхневих клітинних структур, вони, перш за все, приймають участь у здійсненні зв'язку мікроорганізму зі зовнішнім середовищем та в кардинальних процесах метаболізму – синтезі білків і нуклеїнових

1 Бехтерева М.Н., Герасимова Н.М., Донец А.Т. Липиды сапрофитных микобактерий, выращенных на средах с жирными кислотами // Микробиология. 1971. Т. XL. Вып. 5. С.813–819.

2 Raetz C. R. (1978). Enzymology, genetics, and regulation of membrane phospholipid synthesis in *Escherichia coli*. *Microbiological reviews*, 42(3), 614–659.

3 Коронелли Т.В. Липиды микобактерий и родственных микроорганизмов. М.: Изд-во МГУ, 1984. 160 с.

4 Антонов В.Ф. Липиды и ионная проницаемость мембран. М.: Наука, 1982. 151 с.; Демиховский Е.И. Значение некоторых липидов микобактерий туберкулёза (обзор) // Проблемы туберкулёза. 1974. № 1. С. 59–62; Жирнокислотні профілі бактерій, патогенних для людини та тварин / З.П. Васюренко, А.Ф. Фролов, В.В. Смирнов, Н.М. Рубан. К.: Наукова думка, 1992. 264 с.; Пинчук Л.М., Лазовская А.Л. Липиды в таксономии и идентификации микобактерий. Горький, 1989. 128 с.

кислот, мембранних макромолекул різних класів ліпідів, пептидогліканів, тейхоевих кислот, ліпополісахаридів, поділі клітин, транспортуванні електронів, окислювальному фосфорилуванні, регуляції активності ферментів і проникливості оболонки для різних речовин. Ліпіди та полісахариди мікобактерій володіють максимальною активністю у всіх імунологічних реакціях⁵.

Згідно даних Nandedkar A.K.N. (1983)⁶, вивчення ліпідного складу мікобактерій проводиться з метою їх диференціації від споріднених організмів, особливо сапрофітних.

Калачева Г.С.⁷, вважає, що функціональна роль бактеріальних ліпідів визначається їхньою локалізацією у зовнішніх шарах клітини, специфікою структури і швидкістю зміни їхнього складу під час пристосування клітини до змін умов зовнішнього середовища.

Про здатність *M. bovis* та *M. tuberculosis* синтезувати набір унікальних і складних ліпідів, багато з яких діють як захисний, наступальний або адаптивний ефект вірулентності повідомляють Hotter G.S. and Collins D.M.⁸, Forrellad M.A. et al.⁹, Jankute M., Cox J.A.G., Harrison J. and Bersa G.S.¹⁰

Особливо важливим є дослідження ліпідів у швидкозростаючих вірулентних мікобактерій¹¹ у порівнянні з іншими відомими вірулентними повільнорослими штамми та атипovими мікобактеріями. Це значно розширить уяву про значення ліпідів в біологічній активності мікобактерій та в диференціальній діагностиці.

Дослідження по виділенню культур мікобактерій з біологічного матеріалу, встановленні виду, а також їх накопичення з послідовним відбором зразків біомаси для вивчення біохімічного складу (ліпідів) проводили в лабораторії кафедри епізоотології та інфекційних хвороб Дніпровського державного аграрно-економічного університету.

Передпосівну обробку проб патологічного матеріалу від великої рогатої худоби, реагуючої на ППД-туберкулін для ссавців, та піддослідних тварин здійснювали за методикою В.А. Матузенка зі співавт.¹². Всі етапи роботи проводили стерильно.

- 5 Goren M. B. (1970). Sulfolipid I of *Mycobacterium tuberculosis*, strain H37Rv. II. Structural studies. *Biochimica et biophysica acta*, 210(1), 127–138. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(70\)90068-8](https://doi.org/10.1016/0005-2760(70)90068-8); Ribi E., Meyer, T. J., Azuma, I., Parker, R., & Brehmer, W. (1975). Biologically active components from mycobacterial cell walls. IV. Protection of mice against aerosol infection with virulent mycobacterium tuberculosis. *Cellular immunology*, 16(1), 1–10. [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(75\)90180-x](https://doi.org/10.1016/0008-8749(75)90180-x)
- 6 Nandedkar A. K. (1983). Comparative study of the lipid composition of particular pathogenic and nonpathogenic species of *Mycobacterium*. *Journal of the National Medical Association*, 75(1), 69–74.
- 7 Калачева Г.С. Сравнительная характеристика липидов гетеро-, хемо- и фототрофных микроорганизмов в норме и при экспериментальных воздействиях: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.07 / Ленинградский ветеринарный институт. Л., 1986. 18 с.
- 8 Hotter, G. S., & Collins, D. M. (2011). *Mycobacterium bovis* lipids: virulence and vaccines. *Vet Microbiology*; 151 (1-2):91-98. // doi: 10.1016/j.vetmic.2011.02.030
- 9 Forrellad, M. A., Klepp, L. I., Giuffré, A., Sabio y García, J., Morbidoni, H. R., de la Paz Santangelo, M., Cataldi, A. A., & Bigi, F. (2013). Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*, 4 (1), 3–66. <https://doi.org/10.4161/viru.22329>
- 10 Jankute, M., Cox, J. A., Harrison, J., & Besra, G. S. (2015). Assembly of the Mycobacterial Cell Wall. *Annual review of microbiology*, 69, 405–423. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104121>
- 11 Tkachenko, O., Bilan, M., Hlebeniuk, V., Kozak, N., Nedosekov, V., Galatiuk, O. (2020). Dissociation of *Mycobacterium bovis*: Morphology, biological properties and lipids. *Adv. Anim. Vet. Sci.* 8(3): 312-326. <http://dx.doi.org/10.17582/journal.aavs/2020/8.3.317.326>; Tkachenko, O., Bilan, M., Hlebeniuk, V., Alekseeva, N., Nedosekov, V., Galatiuk, O. (2020). Chronology of Morphological Forms of *Mycobacterium bovis* Rapid-Growing Strain. *Acta Vet Eurasia* 2020; 46: 104-114. <https://DOI| 10.5152/actavet.2020.20007>.
- 12 Способ обогащения биологического материала при бактериологическом исследовании на туберкулёз: А.с. 1734699 СССР, А 61 В 10/00, С 12Q1/02 / В.А. Матузенко, В.А. Бусол, А.А. Ткаченко и др. № 479912; Заявлено 11.03.90; Опубл. 23.05.92, Бюл. № 19. 10 с.

Передпосівну обробку проб молока проводили за загальноприйнятою методикою¹³: 150 см³ молока центрифугували протягом 20–30 хв. при 3000 об/хв. Середній шар вилучали, з верхнього жирового шару та осаду робили мазки, які перед фарбуванням попередньо знежирювали ефіром протягом 20–30 хв. Потім осад обробляли 3–6 %-вим розчином сірчаної кислоти протягом 20–30 хв., 4 %-вим розчином гідроокису натрію протягом 10–15 хв., струшували і центрифугували 10–15 хв. при 3000 об/хв. Надосадову рідину вилучали, а осад використовували для посіву на живильне середовище.

При виявленні колоній мікроорганізмів проводили фарбування мазків за Цілем-Нільсеном і переглядали їх під мікроскопом MICROmed XS-3330.

Видову належність мікобактерій визначали шляхом зараження морських свинок підшкірно в ділянці паху (в дозі 1 см³) суспензією досліджуваного матеріалу, кожною пробую окремо. За тваринами спостерігали протягом 3-х місяців¹⁴.

Сенсibiliзувальні властивості досліджуваних штамів вивчали алергічним методом, через 20, 30, 60 та 90 діб після зараження морських свинок зависом мікобактерій. У вказані строки вводили ППД-туберкулін для ссавців у дозі 25 МО в 0,1 см³ ізотонічного розчину внутрішньошкірно зі зовнішнього боку стегна¹⁵.

Облік результатів проводили через 24 та 48 годин після введення алергену. За позитивну вважали реакцію у разі наявності гіперемії на місці введення та набряку діаметром 5 мм і більше.

З метою диференціації штаму *M. bovis* від *M. tuberculosis* та *M. avium* паралельно проводили зараження кроликів у краєву вену вуха (1 мг/см³ суспензії) та курей у підкрильцеву вену. За контроль було взято не заражені кролі та кури.

Курей досліджували ППД-туберкуліном для птахів, вводили в борідку внутрішньошкірно 0,1 см³ препарату, облік реакції проводили через 36 годин, визначаючи наявність набряку чи збільшення розміру сережки.

За морськими свинками та кролями спостерігали протягом 3-х місяців, за птицею – протягом 4-х місяців.

Властивості чистих культур, виділених мікобактерій, вивчали у першій генерації після пересіву на живильне середовище за допомогою культурально-морфологічних та біохімічних тестів: час появи колоній після посіву завису культури мікобактерій; характер росту і морфологію колоній на щільному живильному середовищі; морфологію мікобактерій¹⁶.

Ідентифікацію досліджуваних мікобактерій проводили шляхом визначення росту культури за різних температур (22, 37 та 45 °С); каталазну активність,

13 Лабораторная диагностика туберкулёза: Рекомендации. Омск, 1988. 66 с.

14 Туберкулёз животных и меры борьбы с ним / Ю.Я. Кассич, А.Т. Борзяк, А.Ф. Кочмарский и др.; Под ред. Ю.Я. Кассича. К.: Урожай, 1990. 304 с.

15 Динамика некоторых иммунобиологических и бактериологических показателей при микобактериозе и туберкулёзе / А.А. Ткаченко, М.И. Орлов, Л.В. Кравцова, О.Э. Дорошенко // Основные научные исследования по проблеме туберкулёза и бруцеллёза с.-х. животных, профилактике и ликвидации болезней в регионе Сибири: Тезисы докл. науч.-практ. конф. г. Новосибирска (12–13 июля 1995 г.) / РАСХН Сиб.отд.-ние ИЭВС и ДВ. Новосибирск, 1995. С. 29–30; Настанова по діагностиці туберкульозу / В.М. Манченко, З.Р. Троценко, М.С. Павленко та ін. Київ, 1994. 39 с.

16 Лабораторная диагностика туберкулёза: Рекомендации. Омск, 1988. 66 с.

активність каталази при нагріванні; нітратредуктазну активність; ріст на середовищі зі саліцилатом натрію¹⁷.

Вивчали ліпідний склад штамів мікобактерій: еталонного Vallee, *M. bovis* BCG, епізоотичного швидкорослого *M. bovis*¹⁸, швидкорослих атипових, виділених з молока (АТ-1) та лімфатичних вузлів (АТ-2) великої рогатої худоби, реагуючої на ППД-туберкулін для ссавців. Культивування та накопичення штамів проводили на яєчному живильному середовищі з рН 6,5.

Відбір біомаси із поверхні щільного живильного середовища проводили шпателем, не торкаючись його поверхні. Зняту культуру промивали ізотонічним розчином, віджимали між чотирма листками стерильного фільтрувального паперу і вносили у попередньо зважені пеніцилінові флакони, що дозволяло визначити кількість біомаси для вивчення ліпідного складу. Відбір культур з рідкого живильного середовища проводили методом фільтрування з послідовним віджиманням та зважуванням одержаної культури.

Виділення загальних ліпідів із досліджуваних зразків проводили за методикою Фолча в модифікації Блайя-Дайера для мікробіологічних проб¹⁹. Біомасу зразків (0,5 г) розводили дистильованою водою до 1 см³, доливали 3,5 см³ суміші хлороформ:етанол (1:2) і залишали на 2 год, періодично струшуючи. Потім центрифугували 5 хв на швидкості 3500 об/хв, зливали надосадову рідину, а до осаду додавали 4,75 см³ суміші хлороформ:метанол:дистильована вода (1:2:0,8). Суміш струшували і центрифугували (5 хв – 3500 об/хв). Надосадову рідину зливали до попередньої, сюди ж додавали по 2,5 см³ хлороформу та дистильованої води, добре струшували і залишали для розділення. Нижній шар (хлороформний з ліпідами) збирали і висушували бензолом (30–35 °С). Кількість загальних ліпідів обчислювали у відсотках на наважку та на суху речовину (за загальноприйнятим методом).

Фракційний склад ліпідів вивчали методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) на силікагелевих пластинах Silufol (Чехія), попередньо знежирених перегоненим ацетоном і активованих за температури 100 °С протягом 1 год, у системі розчинників – гексан : диетиловий ефір : метанол : льодяна оцтова кислота (9 : 2 : 0,2 : 0,3). Суміш заливали в скляну камеру на висоту 1,5 см, накривали склом і залишали для насичення паром розчинників на 1 год.

На пластини наносили мікрошприцем пробу на відстані 2,5 см від нижнього краю і боків пластини і дещо вище рівня розчинників. Опускали пластину в камеру і чекали доки розчинник не підійметься до рівня на 1 см від верхнього краю пластини, відмічали цей рівень. Пластину висушували під витяжкою і поміщали в іншу камеру з кристалічним йодом для проявлення.

Відсотковий склад кожного класу ліпідів розраховували від суми їхніх величин поглинання на денситометрі ДО-1М у видимій ділянці²⁰.

17 Савченко П.Е. Лабораторная диагностика туберкулёза животных: Практич. пособие. Чернигов, 1998. 64 с.; Яценко Т.Н., Мечева И.С. Руководство по лабораторным исследованиям при туберкулёзе. М.: Медицина, 1973. 260 с.

18 Ткаченко О. Швидкоростучі *M. bovis* у проблемі туберкульозу // Ветеринарна медицина України. 2004. № 7. С. 14–17.

19 Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов. М.: Мир, 1975. 322 с.

20 Ахрем А.А., Кузнецова А.И. Тонкослойная хроматография. М.: Наука, 1964. 176 с.

Метиллові ефіри жирних кислот були проаналізовані методом газорідинної хроматографії (ГРХ) на газовому хроматографі Chrom-5 («Laboratorni Pstroje», Чехія), після попереднього метилування. За температури 200–300 °С метиллові ефіри жирних кислот розділяються на колонці з сорбентом Хроматон N-Super, 5 % SP 2100 у відповідності з величиною коефіцієнтів їхнього газорідинного розподілу. Розділені в газовій фазі метиллові ефіри проявляються по зміні току іонізації на полуменево-іонізаційному детекторі (ПІД), в результаті одержували набір окремих піків на хроматограмі, кожен з яких відповідав окремій конкретній жирній кислоті, а площа кожного піку відповідає їхнім концентраціям.

Метилування вільних жирних кислот: до зразків загальних ліпідів додавали по 3 см³ 5 %-вого диметилсульфату в метанолі, підігрівали 15 хв, при 65 °С, потім охолоджували до кімнатної температури, додавали по 7 см³ дистильованої води і 1 см³ чотирьоххлористого вуглецю, суміш струшували і залишали для розподілення шарів. Нижній шар відбирали шприцом в гідролізні пробірки, випаровували насухо. У випарені проби додавали по 20–50 мкл гексану і 5–10 мкл вводили у випаровувач хроматографа.

Аналіз зразків метилових ефірів жирних кислот проводили за таких умов: колонка L = 1 м × 4 мм, на сорбенті Хроматон N-Super з 5 % SP 2100 (0,16–0,20 мм). Температуру колонки програмували від 180 до 270 °С зі швидкістю нагрівання 5 °С/хв; температура випаровувача становила 200 °С, детектора – 230 °С, газ-носії – азот (осч), полуменево-іонізаційний детектор (ПІД)²¹.

Якісний аналіз метилових ефірів жирних кислот проводили шляхом порівняння з часом утримання стандартів, а кількісний – розрахуванням площі піків та визначенням їх відсотка від загальної площі піків, яку приймали за 100 %.

Розрахунки та статистичну обробку результатів досліджень здійснювали за допомогою персонального комп'ютера в електронних таблицях Excel програмного пакету Office XP Professional.

Нашими дослідженнями встановлено²², що в організмі тварин кожного господарства персистують мікобактерії, які формують на штучному живильному середовищі в першій генерації колонії як на восьму, так і в більш віддалені строки – 22–27 добу. Це може свідчити про перебування в організмі патогенних та атипівих мікобактерій.

Крім того виявлено, що деякі (три із восьми) виділені штами *M. bovis*, характеризувалися своєрідною здатністю до розмноження збудника та швидким формуванням колоній на штучному живильному середовищі. У третій генерації згадані штами формували чітко виражені колонії на другу добу після посіву. Саме ці особливості сприяли на необхідність подальшого поглибленого вивчення біології збудника, а також його ліпідного складу.

У мікобактерій штамів, які досліджували: ізольованих епізоотичних швидко-рослих *M. bovis*, швидко-рослих атипівих, виділених з молока (АТ-1) та лімфатичних вузлів (АТ-2) великої рогатої худоби, реагуючої на ППД-туберкулін для ссавців

21 Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов. М.: Мир, 1975. 322 с.

22 Ткаченко О. Швидко-рослих атипівих, виділених з молока (АТ-1) та лімфатичних вузлів (АТ-2) великої рогатої худоби, реагуючої на ППД-туберкулін для ссавців. Ветеринарна медицина України. 2004. № 7. С. 14–17.

визначали морфологічні ознаки, культуральні, біохімічні та біологічні властивості. Для порівняння брали штами: еталонний Vallee та *M. bovis* BCG.

Швидкорослі штами *M. bovis* на яєчному середовищі для культивування мікобактерій з рН 7,1 формували колонії у вигляді R-форм (врослі в середовище, шорсткі, з нерівними краями, кольору слонової кістки, сухої консистенції) на 2 добу після посіву. На живильному середовищі з рН 6,5 – S-форми (випуклі, гладкі, блискучі, кольору слонової кістки, сухувато-маслянистої консистенції, відокремлені одна від одної колонії), також, на 2 добу. Мікроскопією мазків засвідчили, що мікобактерії мали розміри 1–3×0,3–0,5 мкм, що характерно для *M. bovis*.

Атипові мікобактерії, виділені з молока (АТ-1), на яєчному середовищі з рН 7,1 формували на 7 добу після посіву колонії у вигляді S-форм (випуклі, блискучі, маслянистої консистенції, кольору слонової кістки), а на яєчному середовищі з рН 6,5 – S-форми, але на 5 добу після посіву. Останні були різних розмірів, блискучі, жовтуваті за кольором. У мазках, пофарбованих за Цілем-Нільсенем, виявили червоні прямі палички довжиною 1–4 мкм, шириною 0,4–0,6 мкм і коковидні форми до 20 %.

Атипові мікобактерії, виділені з лімфатичних вузлів великої рогатої худоби (АТ-2), на яєчному середовищі з рН 7,1 інтенсивно росли на 2 добу після посіву у вигляді двох видів колоній: S-форм (маслянистої консистенції, сіруватого кольору) та R-форм (зморшкуваті, сухуваті, кольору слонової кістки), а на яєчному середовищі з рН 6,5 – на 2 добу після посіву, лише у вигляді S-форм, які були схожі на колонії з яєчного середовища з рН 7,1. За морфологією клітин були подібні атиповим мікобактеріям, виділених з молока (АТ-1). Коковидні форми в мазках складали до 20 %.

За біохімічними властивостями швидкорослі епізоотичні штами *M. bovis* характеризувалися наступним: мікобактерії не редукували нітрати, не володіли каталазною активністю, не росли за температури 22 та 45 °С. Між тим, формували колонії на середовищі зі саліцилатом натрію в концентрації 0,5 мг/см³, але за мікроскопічних досліджень були виявлені змінені червоні палички: на фоні нормальної морфології збудника спостерігалися зігнуті, деформовані, в два–три рази довші, ніж у мазках, які були виготовлені з колоній, зареєстрованих на середовищі без саліцилату натрію.

Атипові мікобактерії цих епізоотичних штамів мали добре виражену каталазну активність, давали ріст колоній на середовищі зі саліцилатом натрію і без нього, росли за всіх температурних режимів. Атипові мікобактерії, виділені з лімфатичних вузлів (АТ-2), на відміну від (АТ-1), не володіли властивістю редукувати нітрати.

Швидкорослі штами *M. bovis* стимулювали алергію протягом дослідження й викликали загибель морських свинок.

На розтині загиблих морських свинок виявлено ураження внутрішніх органів, характерні для туберкульозу: гіпертрофія печінки, селезінки, лімфатичних вузлів. Крім того, у селезінці та в легенях виявляли різну кількість напівпрозорих вузликів.

У морських свинок, заражених атиповими мікобактеріями, спостерігався прояв алергічної реакції, проте тварини були забиті наприкінці досліду. На розтині макроскопічних патологоанатомічних змін не виявлено.

Патогенність досліджуваних штамів мікобактерій визначали за результатами біологічної проби на морських свинках, кролях та курях.

Тварини, заражені швидкорослими штамми *M. bovis*, реагували на введений туберкулін на 20 та 30 добу і загинули на 34–40 добу дослідження. У морських свинок спостерігали схуднення та, в області введення матеріалу, утворення виразки, яка довго не загоювалася, збільшення та ущільнення лімфатичних вузлів регіональних до місця ін'єкції завису мікобактерій. Із патологічного матеріалу експериментально заражених морських свинок виявлено ріст швидкорослих штамів *M. bovis* на сьому добу інкубації. У другій та наступних генераціях на живильному середовищі швидкорослі штами *M. bovis* формували колонії на другу добу культивування.

У дослідних тварин, заражених штамми атипичних мікобактерій, виявлено алергічні реакції, проте загибелі їх не відмічено. Після забивання морських свинок наприкінці досліду макроскопічних патологоанатомічних змін не виявлено.

Досліджувані кролики, заражені швидкорослими штамми *M. bovis*, загинули на 27–35 добу від початку досліду. При патолого-анатомічному розтині загиблих тварин було виявлено туберкульозні зміни, характерні для генералізованої форми перебігу: у легенях відмічалися вогнища ураження різної величини, некрози нирок, збільшення печінки та селезінки, але без видимих вогнищ.

При патологоанатомічному розтині курей, через 120 діб досліду, змін, властивих туберкульозу, не виявили.

Еталонний штам Vallee на живильному середовищі з рН 6,5 формував колонії на живильному середовищі на 21 добу та викликали загибель морських свинок на 43 добу, *M. bovis* BCG – на 7–10 добу у вигляді G-форм колоній, але морські свинки залишалися живими впродовж досліду (3 міс). На розтині змін не виявлено.

Отже, встановлено, що досліджувані швидкорослі штами *M. bovis* – патогенні та високовірулентні, хоча за часом формування колоній та здатністю до росту на середовищі зі саліцилатом натрію у концентрації 0,5 мг/см³ подібні до атипичних мікобактерій. Біологічні дослідження підтвердили їх належність до мікобактерій бичачого виду і високу вірулентність. Водночас виявили відмінності за морфологічними ознаками, культуральними, ферментативними властивостями та вірулентністю між патогенними та атипичними штамми мікобактерій. Оскільки всі три штами швидкорослих *M. bovis* були подібними, то для визначення ліпідного складу використали тільки один штам.

У результаті проведених досліджень біохімічного складу (ліпідів) виявили (табл. 1), що штам Vallee синтезує на яєчному живильному середовищі з рН 6,5 приблизно в 1,7 рази більше загальних ліпідів, ніж штам атипичних мікобактерій (АТ-2), які виділені з лімфатичних вузлів (АТ-2) великої рогатої худоби, реагуючої на ППД-туберкулін для ссавців, та в 5 разів більше, ніж штам *M. bovis* BCG (8,82 проти 5,20 % та 1,74 % на наважку відповідно). Не вірогідно, але менше (в 1,3 рази), виявлено загальних ліпідів у штаму атипичних мікобактерій, виділених з молока (АТ-1) по відношенню до мікобактерій штаму Vallee.

Таблиця 1.

Вміст загальних ліпідів у досліджуваних штамів

Показник	Мікобактерії, штамп				
	<i>Vallee</i>	BCG	швидко- рослий <i>M. bovis</i>	AT-1	AT-2
Вміст загальних ліпідів, % на наважку	8,82±0,79	1,74±0,28**	8,05±0,20	6,80±0,68	5,20±0,51*

* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$.

ТШХ-аналіз загальних ліпідів усіх зразків показав наявність основних шести фракцій, серед яких переважали фосфоліпіди (від 23,17±0,41 % у *Vallee* до 27,97±0,26 % у швидко-рослого *M. bovis*) (табл. 2).

Встановлено, що у музейного штаму *Vallee*, *M. bovis* BCG та двох штамів атипів мікобактерій кількість фосфоліпідів була практично на одному рівні.

На відміну від штаму *Vallee*, у швидко-рослого штаму *M. bovis* виявлено вірогідні відмінності по кількості усіх виділених фракцій: фосфоліпідів, діацилгліцеролів, стеринів ($P \leq 0,01$), вільних жирних кислот ($P \leq 0,05$), триацилгліцеролів ($P \leq 0,001$), ефірів стеринів ($P \leq 0,05$).

Таблиця 2.

Склад ліпідів у зразках (ТШХ-аналіз), % від суми

Показник	Мікобактерії, штамп				
	<i>Vallee</i>	BCG	швидко- рослий <i>M. bovis</i>	AT-1	AT-2
Фосфоліпіди	23,17±0,94	24,80±0,51	27,97±0,26**	24,17±0,43	24,24±0,39
Діацилгліцероли	17,08±0,60	17,60±0,33	12,54±0,27**	17,58±0,29	19,26±0,31*
Стерини	17,68±0,65	16,80±0,41	12,23±0,20**	18,14±0,28	17,13±0,37
Вільні жирні кислоти	16,46±0,54	14,40±0,21*	14,47±0,23*	14,84±0,23*	12,59±0,26**
Триацилгліцероли	13,41±0,52	10,40±0,18**	18,32±0,16***	11,54±0,18*	13,33±0,28
Ефіри стеринів	12,20±0,45	16,00±0,25**	14,47±0,24*	13,73±0,22*	13,45±0,32
∑ ліпідів	100	100	100	100	100

* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$.

Кількістю складових фракції діацилгліцеролів різнилися атипів мікобактерій, виділені з лімфатичних вузлів (AT-2, $P \leq 0,05$), фракції вільних жирних кислот – мікобактерій штамів BCG ($P \leq 0,05$), атипів, які виділені як з молока ($P \leq 0,05$), так і з лімфатичних вузлів ($P \leq 0,01$), фракції триацилгліцеролів – штами *M. bovis* BCG ($P \leq 0,01$) та атипів мікобактерій, які виділені з молока (AT-1, $P \leq 0,05$), фракції ефірів стеринів у мікобактерій штаму *M. bovis* BCG ($P \leq 0,01$) та атипів мікобактерій, які виділені з молока (AT-1, $P \leq 0,05$).

У жирнокислотному складі фракції вільних жирних кислот всіх досліджуваних зразків було встановлено перевагу суми насичених жирних кислот (табл. 3) за

рахунок великої кількості пальмітинової кислоти ($C_{16:0}$), яка, є основним компонентом суміші цієї фракції у мікобактерій. Виявлено на одному рівні вміст цієї кислоти у мікобактерій штамів Vallee та у швидкорослого *M. bovis* ($18,87 \pm 0,98$ та $19,62 \pm 0,53$ % відповідно), а також у мікобактерій штамів *M. bovis* BCG, атипових, які виділені з молока (AT-1) та лімфатичних вузлів (AT-2) ($21,12$ %, $22,67$ % та $23,16$ % відповідно).

Проте, вміст стеаринової кислоти ($C_{18:0}$), також однієї з основних, становив від $7,42$ % у швидкорослого *M. bovis*, до $12,3$ % у атипових мікобактерій, які виділені з лімфатичних вузлів (AT-2). Слід зазначити, що лише у швидкорослого *M. bovis* та атипових мікобактерій, виділених з молока (AT-1) відмічено вірогідну різницю по кількості цієї кислоти ($P \leq 0,01$ та $P \leq 0,05$).

У складі насичених жирних кислот, по відношенню до еталонного штаму Vallee, відмічено домінування кількості миристинової кислоти у двох штамів атипових мікобактерій ($P \leq 0,001$), маргаринової (у *M. bovis* BCG, $P \leq 0,001$), арахінової (у мікобактерій швидкорослого штаму *M. bovis* ($P \leq 0,001$, $P \leq 0,01$), генейкозанової (швидкорослого штаму *M. bovis*, $P \leq 0,05$), бегенової (атипових мікобактерій, виділених з молока, $P \leq 0,001$), тетракозанової (у штамів швидкорослого *M. bovis*, AT-1 та AT-2, $P \leq 0,05$), пентакозанової (у штаму *M. bovis* BCG, $P \leq 0,001$), гексакозанової (у AT-2, $P \leq 0,01$) кислот. Проте встановлено нижчий рівень кількості стеаринової (у швидкорослого штаму *M. bovis* та AT-1; $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$), нонадеканової (у штамів *M. bovis* BCG ($P \leq 0,05$), AT-1 та AT-2, арахінової у штаму BCG ($P \leq 0,01$), генейкозанової (у штамів *M. bovis* BCG, атипових, виділених з молока (AT-1), $P \leq 0,001$), трикозанової (у атипових, виділених з молока (AT-1), $P \leq 0,01$), тетракозанової (у *M. bovis* BCG, $P \leq 0,05$), пентакозанової (у швидкорослого *M. bovis* та атипових мікобактерій, виділених як з молока, так і з лімфатичних вузлів, $P \leq 0,01$; $P \leq 0,001$). Відмічали лише сліди (менше $0,01$ %) довголанцюгової гептакозанової кислоти у мікобактерій штамів Vallee та атипових мікобактерій, виділених з молока, та таких насичених коротколанцюгових жирних кислот як лауринова (у AT-2), тридеканова та пентадеканова (у AT-1 та AT-2), маргарінова (у AT-1), нонадеканова (у AT-1).

Максимальна кількість вільних жирних кислот з парним числом атомів вуглецю відмічена у атипових мікобактерій, виділених з молока (96 %), дещо нижча – у атипових, виділених з лімфатичних вузлів ($82,3$ %), майже на одному рівні їх кількість була у мікобактерій штамів Vallee та швидкорослого *M. bovis* (75 % та 74 % відповідно) і найнижча – *M. bovis* BCG (64 %).

Серед ненасичених жирних кислот основну частину пулу становила олеїнова кислота у всіх штамів мікобактерій ($14,57$ – $27,18$ %). Максимальна її кількість виявлена у мікобактерій штаму Vallee, дещо нижча у швидкорослого штаму *M. bovis* та вірогідно нижча у атипових мікобактерій, виділених з молока (AT-1, $P \leq 0,05$), лімфатичних вузлів (AT-2, $P \leq 0,01$) та *M. bovis* BCG ($P \leq 0,01$). Також у штамів *M. bovis* BCG, AT-1 та AT-2 переважали пальмітолеїнова та лінолева + ліноленова кислоти ($P \leq 0,05$; $P \leq 0,01$). Проте наявність арахідонової кислоти відмічено лише у штамів атипових мікобактерій (AT-1 та AT-2: $7,67$ та $1,94$ % відповідно).



Таблиця 3.

Вміст вільних жирних кислот у зразках, % від суми

Вільні жирні кислоти	Код	Мікобактерії, штам					
		Vallee	BCG	швидкорослий M. bovis	АТ-1	АТ-2	
Лауринова	C _{12:0}	0,41±0,15	0,04±0,03	0,04±0,02	0,32±0,01	сліди	
Тридеканова	C _{13:0}	0,25±0,12	0,11±0,002	0,10±0,02	сліди	сліди	
Миристинова	C _{14:0}	0,41±0,10	0,46±0,01	0,27±0,04	2,67±0,10***	1,76±0,03***	
Пентадеканова	C _{15:0}	0,36±0,13	0,08±0,002	0,22±0,02	сліди	сліди	
Пальмітолеїнова	C _{16:1}	0,99±0,32	2,30±0,01*	0,55±0,07	2,35±0,04**	1,85±0,06*	
Пальмітинова	C _{16:0}	18,87±0,98	21,12±0,07	19,62±0,53	22,67±0,8*	23,16±0,86*	
Маргарінова	C _{17:0}	1,27±0,20	5,97±0,18***	0,81±0,07	сліди	0,86±0,02	
Олеїнова	C _{18:1}	27,18±1,43	14,57±0,40**	23,87±0,60	20,80±0,50*	19,56±0,67**	
Стеаринова	C _{18:0}	11,75±0,59	11,48±0,23	7,42±0,11**	9,07±0,20*	12,30±0,36	
Лінолева + ліноленова	C _{18:2+} C _{18:3}	2,79±0,85	5,36±0,20*	2,97±0,16	5,88±0,18*	5,95±0,09*	
Нонадеканова	C _{19:0}	2,31±0,50	0,55±0,02*	3,34±0,06	сліди	0,97±0,04	
Арахідонова	C _{20:4}	-	-	-	7,67±0,23	1,94±0,04	
Арахінова	C _{20:0}	2,68±0,37	0,61±0,01**	5,23±0,14**	сліди	2,29±0,08	
Генейкозанова	C _{21:0}	5,13±0,43	0,61±0,01***	6,74±0,23*	0,64±0,01***	3,27±0,07*	
Бегенова	C _{22:0}	5,21±0,49	4,29±0,08	5,78±0,18	19,21±0,66***	4,86±0,17	
Трикозанова	C _{23:0}	3,31±0,57	0,23±0,03**	5,89±0,35*	0,50±0,02**	3,60±0,07	
Тетракозанова	C _{24:0}	2,90±0,81	1,84±0,02	5,57±0,19*	5,34±0,20*	5,43±0,16*	
Пентакозанова	C _{25:0}	12,72±1,05	27,78±1,16***	7,43±0,26**	2,88±0,10***	7,22±0,18**	
Гексакозанова	C _{26:0}	1,46±0,46	1,99±0,06	2,53±0,30	сліди	3,15±0,11**	
Гептакозанова	C _{27:0}	сліди	0,61±0,01	1,62±0,19	сліди	1,83±0,06	
∑ ненасичених		30,96±1,39	22,23±0,90**	27,39±0,44	36,70±1,37*	29,32±1,14	
∑ насичених 69,04±1,40		77,77±2,90	72,61±0,50	63,30±1,83	70,70±1,78		

*P≤0,05; **P≤0,01; ***P≤0,001.

Примітки:

1. C_{A:0} – насичена жирна кислота (A – кількість атомів вуглецю);
2. C_{A:n} – ненасичена жирна кислота (n – кількість подвійних зв'язків);
3. Сліди – наявність кислоти менше 0,01 %.

Відношення насичених до ненасичених жирних кислот виявилось найвищим у мікобактерій штаму *M. bovis* BCG (у 3,4 рази) і найнижчим – у атипівих мікобактерій, виділених з молока (AT-1) (у 1,7 рази).

Загальна сума коротколанцюгових кислот ($C_{12}-C_{20}$) переважала над довголанцюговими ($C_{21}-C_{27}$) в усіх досліджуваних зразках. За кількістю коротколанцюгових жирних кислот були подібними між собою штами Vallee, AT-1 та AT-2 (69,27 %; 71,43 %; 70,64 % проти 30,73 %; 28,57 %; 29,36 % довголанцюгових), *M. bovis* BCG та швидкорослий *M. bovis* (62,65 %; 64,44 % проти 37,35 %; 35,56 % довголанцюгових відповідно). Найнижче відношення коротколанцюгових до довголанцюгових кислот відмічено у *M. bovis* BCG та швидкорослого *M. bovis* (1,7 та 1,8 рази відповідно). Майже на одному рівні виявлено співвідношення цих кислот у мікобактерій штамів Vallee та атипівих мікобактерій (AT-1 та AT-2) (у 2,3; 2,5 та 2,4 рази відповідно).

Таким чином, штами мікобактерій, які ми досліджували різнилися між собою за вмістом загальних ліпідів, фракційним складом, а також вмістом окремих насичених та ненасичених жирних кислот, що зумовлено різним ступенем вірулентності.

Активне пізнання структури клітинної стінки *Mycobacterium* spp. відбулося в 1960–1970-ті роки. Ліпіди, як і біохімічний склад видів мікобактерій, широко вивчаються дослідниками з використанням різноманітних методів і методологічних підходів. На сьогоднішній день, розробки тонкошарової і газорідної хроматографії, ядерного магнітного резонансу, мас-спектрального аналізу та визначення геному мікобактерій привели до глибокого розуміння структури їхньої клітинної стінки, ліпідів останньої, а також основ генетики та біосинтезу²³. Minnikin D.E. (1982)²⁴; Brennan P.J. and Nikaido, H. (1995)²⁵ стверджують, що мікобактерії у своєму складі містять, крім звичайних бактеріальних ліпідів, надзвичайно багато різноманітних ліпідів, які не схожі на попередні.

Найбільш поширеним методом дослідження ліпідів є хроматографічний. Як стверджують J.J. Perez, M. Fauville-Dufaux, J.L. Dossogne, E. de Hoffmann, F. Pouthier (1994)²⁶: аналіз методом газорідної хроматографії (ГРХ) дозволив повністю ідентифікувати 8 із 22 видів мікобактерій через 24 години. Також, автори застосували тонкошарову хроматографію (ТШХ) для повної ідентифікації трьох видів мікобактерій. Результати ідентифікації загальноприйнятими методами співпадали з результатами ГРХ та ТШХ у 161 із 169 штамів (93 %), які представляли 21 вид мікобактерій.

23 Brennan P. J. (2003). Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* (Edinburgh, Scotland), 83(1-3), 91–97. [https://doi.org/10.1016/s1472-9792\(02\)00089-6](https://doi.org/10.1016/s1472-9792(02)00089-6); Couderc F. (1995). Gas chromatography/tandem mass spectrometry as an analytical tool for the identification of fatty acids. *Lipids*, 30(8), 691–699. <https://doi.org/10.1007/BF02537794>.

24 Minnikin, D.E. (1982). Lipids: complex lipids, their chemistry, biosynthesis and roles. In *The Biology of the Mycobacteria: Vol. 1.44. Physiology, Identification and Classification*. Rat-ledge, C., and Stanford, J. (eds). New York: Academic Press, 95–184.

25 Brennan, P. J., & Nikaido, H. (1995). The envelope of mycobacteria. *Annual review of biochemistry*, 64, 29–63. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.64.070195.000333>

26 Perez, J. J., Fauville-Dufaux, M., Dossogne, J. L., de Hoffmann, E., & Pouthier, F. (1994). Faster identification of mycobacteria using gas liquid and thin layer chromatography. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology, 13(9), 717–725. <https://doi.org/10.1007/BF02276054>

Knisley, C.V., Damato, J.J., McClatchy, J.K., Brennan P.J. (1985)²⁷ стверджують, що із застосуванням ГРХ та ТШХ вдалося вірно ідентифікувати усі 49 культур *M. tuberculosis-M. bovis* та багато інших таксонів мікобактерій.

Результати досліджень загальних ліпідів штамів мікобактерій засвідчили: найвищий їх вміст у штамів Vallee та швидкорослого *M. bovis*, і найнижчий – у *M. bovis* BCG (8,82 %, 8,05 %, 1,74 % відповідно).

При розподілі загальних ліпідів на фракції, нами виявлено відмінності у штамів мікобактерій, які досліджували. За однакових умов культивування, найбільше виділено фракції фосфоліпідів, які за даними Коронелли Т.В. (1984)²⁸ є головними компонентами клітинної стінки мікобактерій і належать до полярних ліпідів.

Найнижчий рівень фосфоліпідів виявлено у мікобактерій штаму Vallee (23,17 %), дещо вищий у *M. bovis* BCG, AT-1 та AT-2 (24,8 %, 24,17 % та 24,24 % відповідно) та найвищий у швидкорослого *M. bovis* (27,97 %, $P \leq 0,01$).

У швидкорослого штаму *M. bovis*, по відношенню до Vallee, виявлено відмінності у кількості складових всіх фракцій: перевагу фосфоліпідів ($P \leq 0,01$), триацилгліцеролів ($P \leq 0,001$) та ефірів стеринів ($P \leq 0,05$); вірогідно нижчий вміст діацилгліцеролів та стеринів ($P \leq 0,01$), а також фракції вільних жирних кислот ($P \leq 0,05$).

Також, вірогідно більше відмічено фракції ефірів стеринів у *M. bovis* BCG, AT-1 ($P \leq 0,05$ та $P \leq 0,01$), проте менше – фракції вільних жирних кислот у штамів *M. bovis* BCG, AT-1 ($P \leq 0,05$) та у AT-2 ($P \leq 0,01$); триацилгліцеролів у *M. bovis* BCG, AT-1 ($P \leq 0,01$ та $P \leq 0,05$ відповідно).

Встановлена перевага фракцій фосфоліпідів та триацилгліцеролів у швидко-рослого *M. bovis*, серед усіх штамів мікобактерій, підтверджує їхню патогенність і відповідає даним Бондаренка Б.Н. (1976)²⁹, Рубана Е.Р. (1977)³⁰, які вказують на те, що фосфоліпіди є пусковою точкою в розвитку патологічних процесів у макроорганізмі, а И.Л. Диким й співавт. (2004)³¹ доведено, що триацилгліцероли здатні спричиняти на шкірі здорових тварин утворення специфічних гранульом, які складаються з моноцитів та епітеліоїдних клітин, за повторного введення – появу казеозних туберкул і здатні послаблювати резистентність організму щодо туберкульозу, при цьому фтіонова кислота активно гальмує міграцію лейкоцитів. Brennan, P.J. (1988)³²; Daniel et al. (2004)³³ стверджують, що триацилгліцероли служать енергетичним резервом для довгострокового виживання мікобактерій туберкульозу під час персистуючої фази інфекції а також засобом детоксикації вільних жирних кислот.

27 Knisley, C.V., Damato, J.J., McClatchy, J.K., & Brennan, P.J. (1985). Rapid and sensitive identification of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of clinical microbiology*, 22 (5), 761–767. <https://doi.org/10.1128/JCM.22.5.761-767.1985>

28 Коронелли Т.В. Липиды микобактерий и родственных микроорганизмов. М.: Изд-во МГУ, 1984. 160 с.

29 Бондаренко Б.Н. Количественное определение липидов // Вопросы мед. химии. 1973. Т. 41. № 1. С.17–20.

30 Рубан Е.Р. Микробные липиды и липазы. М.: Наука, 1977. 218 с.

31 Микробиология / И.Л. Дикий, И.Ю. Холупяк, Н.Е. Шевелёва, М.Ю. Стегний. К.: ИД «Профессионал», 2004. 624 с.

32 Brennan, P.J. (1988). *Mycobacterium* and other actinomycetes. In: Ratledge C., Wilkinson S.G.(eds). *Microbial lipids*, Vol 1, Academic Press, London, pp 203–298 .

33 Daniel, J., Deb, C., Dubey, V. S., Sirakova, T. D., Abomoelak, B., Morbidoni, H. R., & Kolattukudy, P. E. (2004). Induction of a novel class of diacylglycerol acyltransferases and triacylglycerol accumulation in *Mycobacterium tuberculosis* as it goes into a dormancy-like state in culture. *Journal of bacteriology*, 186 (15), 5017–5030. <https://doi.org/10.1128/JB.186.15.5017-5030.2004>

Шляхом газорідинної хроматографії виділили насичені та ненасичені жирні кислоти з 12–27 атомами вуглецю, що співпадає з повідомленнями інших дослідників (Зелинский Н.Д. та Бондарь Л.С., 1951³⁴; Hung J. G. and Walker R. W., 1970³⁵; Лебедева Ж.Д., Волкова И.Т. и Рубан Е.Л., 1976³⁶; Larsson L. and Mårdh P.A., 1976³⁷; Minnikin D.E., 1982³⁸; Brennan P.J. and Nikaido H., 1995³⁹), які стверджують, що у складі жирних кислот мікобактерій виділяються кислоти з числом атомів вуглецю від 8 до 26 (переважно 15–19).

Нами встановлено, що у складі вільних жирних кислот усіх штамів мікобактерій, які досліджували, виділяються такі основні як пальмітинова, пальмітолеїнова, олеїнова, стеаринова, сума яких складає біля 70 % від загальної кількості жирних кислот. Ці результати відповідають даним Т.П. Ефимова зі співавт. (1977)⁴⁰, Teng, L.J. et al. (1997)⁴¹, Nandedkar A.K.N. (1982)⁴², які стверджують, що основними клітинними жирними кислотами у всіх видів мікобактерій являються миристинова, пальмітинова, пальмітолеїнова і туберкулостеаринова кислоти.

Також, Е. Р. Рубан (1977)⁷⁴ повідомляє, що пальмітинова кислота переважає у *M. phlei*, у *M. avium*, *M. tuberculosis*, *Mycobacterium* sp. 607 у всі періоди росту, у *M. smegmatis* – на початку росту. Але у *M. album* вона присутня в невеликій кількості, а переважають ейкозанова (C_{14:2}) і декозанова (C_{16:2}) кислоти.

Нами встановлено, що мікобактерії штамів швидкорослого *M. bovis* та *Vallee* мали подібні профілі жирних кислот: пентадеканової (C_{15:0}), пальмітолеїнової (C_{16:1}), пальмітинової (C_{16:0}), лінолевої + ліноленової (C_{18:2}+C_{18:3}), нонадеканової (C_{19:0}), генейкозанової (C_{21:0}) кислот. Проте мали відмінності по кількості лауринової (C_{12:0}), стеаринової (C_{18:0}), арахінової (C_{20:0}), трикозанової (C_{23:0}), тетракозанової (C_{24:0}), пентакозанової (C_{25:0}), гексакозанової (C_{26:0}) та гептакозанової (C_{27:0}) кислот.

Проте, у штамів патогенних та непатогенних мікобактерій, виявлено відмінності у вмісті певних кислот, що подібно до результатів, одержаних Ozbek, A. and Aktas, O. (2003)⁴³.

34 Зелинский Н.Д., Бондарь Л.С. Высшие жирные кислоты и их отношение к туберкулёзным бациллам. М.: Изд-во Моск. общества испытательной природы, 1951. 84 с.

35 Hung, J. G., & Walker, R. W. (1970). Unsaturated fatty acids of *Mycobacteria*. *Lipids*, 5(8), 720–722. <https://doi.org/10.1007/BF02531442>

36 Лебедева Ж.Д., Волкова И.Т., Рубан Е.Л. Липиды и липазы микобактерий и близких к ним микроорганизмов. Изв. АН СССР. Сер. биол. 1976. Вып. 2. С. 221–237.

37 Larsson, L., & Mårdh, P. A. (1976). Gas chromatographic characterization of mycobacteria: analysis of fatty acids and trifluoroacetylated whole-cell methanolysates. *Journal of clinical microbiology*, 3(2), 81–85.

38 Minnikin, D.E. (1982). Lipids: complex lipids, their chemistry, biosynthesis and roles. In *The Biology of the Mycobacteria: Vol. 1.44. Physiology, Identification and Classification*. Rat-ledge, C., and Stanford, J. (eds). New York: Academic Press, pp. 95–184.

39 Brennan, P.J., & Nikaido, H. (1995). The envelope of mycobacteria. *Annual review of biochemistry*, 64, 29–63. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.64.070195.000333>

40 Ефимова Т.П., Цыганов В.А. Жирные кислоты низших форм лучистых грибов и родственных организмов. Изв. АН СССР. Сер. биол. 1977. Вып. 6. С. 879–885.

41 Teng, L. J., Liaw, S. J., Hsueh, P. R., Fan, J. H., Luh, K. T., & Ha, S. W. (1997). Constitutive fatty acid and enzyme profiles of *Mycobacterium* species. *Journal of the Formosan Medical Association*, 96(5), 336–345.

42 Nandedkar A.K. (1982). Fatty acid composition of mycobacterial lipids as an index of pathogenicity. *Journal of the National Medical Association*, 74(12), 1191–1193.

43 Ozbek, A., & Aktas, O. (2003). Identification of three strains of *Mycobacterium* species isolated from clinical samples using fatty acid methyl ester profiling. *The Journal of international medical research*, 31(2), 133–140. <https://doi.org/10.1177/147323000303100210>

Результати наших досліджень засвідчили, що патогенні мікобактерії штамів швидкорослого *M. bovis* та Vallee можна диференціювати від атипових та *M. bovis* BCG за профілями таких кислот як нонадеканова ($C_{19:0}$) та генейкозанова ($C_{21:0}$). Про ідентифікацію 17 видів (60 %) мікобактерій до виду за допомогою визначення таких жирних кислот як $C_{19:0}$ та $C_{21:0}$ повідомляють Zhang, Y., Zhuang, Y., Liu, Z., Ruan, J. (1991)⁴⁴.

У двох штамів атипових мікобактерій та *M. bovis* BCG мононенасичена пальмітолеїнова кислота ($C_{16:1}$) виділялася у кількості майже від 2 % та вище. Подібні дані одержали Luquin, M., Lopez, F. and Ausina, V. (1989)⁴⁵, які у 26 випробовуваних штамів *M. xenopi* виділяли її від 2 до 5 %. Крім того, нами встановлено, що вміст олеїнової кислоти ($C_{18:1}$) у атипових та *M. bovis* BCG становив до 21 %. У мікобактерій штамів швидкорослого *M. bovis* та Vallee, вміст цієї кислоти – 24 % та 27 % відповідно.

У обох штамів атипових мікобактерій виявлено сліди (менше 0,01 %) тридеканової ($C_{13:0}$), пентадеканової ($C_{15:0}$) кислот у атипових мікобактерій, виділених з молока, спостерігали сліди маргаринової ($C_{17:0}$), нонадеканової ($C_{19:0}$) та двох довголанцюгових гексакозанової ($C_{26:0}$), та гептакозанової ($C_{27:0}$) кислот, у атипових мікобактерій, які виділено з лімфатичних вузлів – сліди коротколанцюгової лауринової ($C_{12:0}$) кислоти. Проте, лише у цих двох штамів атипових мікобактерій, газоріднинною хроматографією відмічено наявність поліненасиченої арахідонової ($C_{20:4}$) кислоти (АТ-1 – 7,67 %, АТ-2 – 1,94 %).

Також, у цих двох штамів та у *M. bovis* BCG, які не є патогенними, вміст незамінних ненасичених жирних кислот (лінолевої + ліноленової, $C_{18:2} + C_{18:3}$) був на одному рівні – 5,88 %, 5,95 % та 5,36 % відповідно.

Виділені обидві культури атипових мікобактерій містили миристинової кислоти ($C_{14:0}$) у кількості від 1,5 % (2,67 % та 1,76 %), а вміст бегенової кислоти ($C_{22:0}$) у атипових, виділених з молока, становив вище 19 %.

Тому, за даними наших досліджень ліпідного складу, ми не можемо стверджувати про достатню ефективність діагностики мікобактерій, різної біологічної активності хроматографічним методом.

У той же час, склад жирних кислот мікобактерій може слугувати диференціальною ознакою роду *Mycobacterium*, хоча на нього в значній мірі можуть впливати зовнішні чинники, на що вказують й інші автори⁴⁶. Вважається, що саме ліпіди визначають

44 Zhang, Y., Zhuang, Y., Liu, Z., & Ruan, J. (1991). Identification of twenty-eight species of mycobacteria with their cellular fatty acids by capillary gas chromatography (in Chinese). *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 31(3) 187–197.

45 Luquin, M., Lopez, F., & Ausina, V. (1989). Capillary gas chromatographic analysis of mycolic acid cleavage products, cellular fatty acids, and alcohols of *Mycobacterium xenopi*. *Journal of clinical microbiology*, 27(6), 1403–1406. <https://doi.org/10.1128/JCM.27.6.1403-1406.1989>

46 Модель Л.М. Биология и биохимия туберкулёзных микобактерий. М.: Изд. АМН СССР. 1952. 247 с.; Коронелли Т.В. Образование липидов микобактерий при использовании н-гексадекана и глюкозы // Микробиология. 1968. Т. XXXVII. Вып. 6. С. 984; Taneja, R., Malik, U., & Khuller, G. K. (1979). Effect of growth temperature on the lipid composition of *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607. *Journal of general microbiology*, 113 (2), 413–416. <https://doi.org/10.1099/00221287-113-2-413>; Tisdall, P. A., Roberts, G. D., & Anhalt, J. P. (1979). Identification of clinical isolates of mycobacteria with gas-liquid chromatography alone. *Journal of clinical microbiology*, 10(4), 506–514. <https://doi.org/10.1128/JCM.10.4.506-514.1979>; Nandedkar A.K. (1983). Comparative study of the lipid composition of particular pathogenic and nonpathogenic species of *Mycobacterium*. *Journal of the National Medical Association*, 75(1), 69–74; Жирнокислотні профілі бактерій, патогенних для людини та тварин / З.П. Васюренко, А.Ф. Фролов, В.В. Смирнов, Н.М. Рубан. К.: Наукова думка, 1992. 264 с.; Гизатулина Н.М. Липидные и углеводные компоненты микобактерий и методы их определения // Проблемы туберкулёза. 1996. № 4. С. 59–62; Ткаченко О.А., Бусол В.О., Зеленська М.В., Ковалова Л.О. (2006). Біохімічний склад швидкорозростаючого штаму *M. bovis* в залежності від тривалості пасажування. *Ветеринар. Мед. України*, 2: 20–22.

стійкість мікобактерій до факторів довкілля, тривалість виживання на об'єктах та в продуктах й сировині тваринного походження. Допускається, що по даних умісту ліпідів, їх фракцій, у тому числі вільних жирних кислот, можна ідентифікувати види мікобактерій та покращити на підставі цього ефективність діагностики туберкульозу тварин і людини.

З цього приводу стверджується, що традиційно латентна інфекція, яка виникає в окремих макроорганізмах, залишаючись в неактивній стаціонарній фазі в гранульомі як стабільна латентна популяція мікобактерій, що спроможні виживати в стресових умовах створених хазяїном (Cardona, P.J., 2007)⁴⁷. Гранульоми туберкульозу, які відіграють немаловажне значення в цьому явищі, є компактні організовані скопичення інфікованих і неінфікованих макрофагів, Т-клітин, нейтрофілів й інших клітин. Стверджується (Qualls, J.E. & Murray, P.J., 2016)⁴⁸, що в середині гранульом відбуваються особливі метаболічні адаптації, які змінюють поведінку імунних клітин. Це сприяє стійкості мікобактерій синхронно з захистом від імунопатології. В цих умовах унеможливується повне знищення мікобактерій в макрофагах (Orme, I.M., Robinson, R.T., & Cooper, A.M.)⁴⁹. Virschow, R. (1860)⁵⁰ пояснює це накопиченням в інфікованих макрофагах крапельок ліпідів. За цього фагосоми, які вміщують мікобактерії, мігрують в напрямку ліпідних тілець клітин-хазяїна, і цей процес завершується поглинанням палички ліпідними краплями і, відповідно, накопиченням ліпідів, в середині мікробної клітини. Ліпіди - відома живильна речовина для вірулентних мікобактерій. Проте, відмічають автори, в середині таких клітин (макрофагів) мікобактерії не розмножуються і залишаються живими, засвоюють ліпіди та потенційно забезпечують ймовірність в часі вихід в незаражені (здорові) тканини провокуючи розвиток інфекційного процесу туберкульозу.

Саме тому ліпіди, окрім впливу на ступінь вірулентності мікобактерій, відіграють важливу роль в збереженні збудника туберкульозу в природі та зумовлюють постійну загрозу виникнення хвороби тварин та людини.

DOI: 10.51587/9781-7364-13302-2021-002-298-312

47 Cardona P.J. (2007). New insights on the nature of latent tuberculosis infection and its treatment. *Inflammation & allergy drug targets*, 6(1), 27–39. <https://doi.org/10.2174/187152807780077282>

48 Qualls, J.E., & Murray, P.J. (2016). Immunometabolism within the tuberculosis granuloma: amino acids, hypoxia, and cellular respiration. *Seminars in immunopathology*, 38(2), 139–152. <https://doi.org/10.1007/s00281-015-0534-0>

49 Orme, I.M., Robinson, R.T., & Cooper, A.M. (2015). The balance between protective and pathogenic immune responses in the TB-infected lung. *Nature immunology*, 16 (1), 57–63. <https://doi.org/10.1038/ni.3048>

50 Virschow R. (1860) *Cellular pathology as based on physiological and pathological histology*. London: John Churchill (reprinted by The classics of Medicine Library, 1978, Birmingham, A.I.).