

Г.В. Яворська¹, Р.І. Сибірна²

¹Львівський національний університет ім. Івана Франка,
вул. Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна

²Львівський державний університет внутрішніх справ,
вул. Городоцька, 26, Львів, 79000, Україна

МОРФОЛОГО-КУЛЬТУРАЛЬНІ І ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ АТИПОВИХ МІКОБАКТЕРІЙ

Досліджено морфолого-культуральні і фізіолого-біохімічні властивості культур атипичних мікобактерій, виділених від хворих на мікобактеріози. Показано можливість використання вказаних властивостей для своєчасної діагностики захворювання.

Ключові слова: атипичні мікобактерії, мікобактеріози, бактеріовиділення.

Маючи туберкульозоподібну клінічну картину, мікобактеріози важко піддаються діагностуванню і часто йдуть як міксти поряд із туберкульозом [2, 4, 6, 12]. Атипичні мікобактерії можуть виділятися не тільки хворими на туберкульоз, а й при неспецифічних захворюваннях легенів чи пухлинах. Відомо велике число представників цієї групи мікроорганізмів, які морфологічно подібні до типових мікобактерій туберкульозу і мають здатність зумовлювати бактеріоносійство, інфікування або ж бути причиною виникнення того чи іншого захворювання.

У даний час збільшується роль атипичних мікобактерій у патології людини, що, у першу чергу, пов'язане з неправильним застосуванням антибіотиків. Атипичні мікобактерії характеризуються широким спектром стійкості та потенційною патогенністю для людини і тварин [1, 3, 10, 11]. При виділенні з патологічного матеріалу атипичних мікобактерій важливо встановити значення їх у патології. В останні роки мікробіологічне вивчення основних характеристик мікобактерій залишається поза увагою дослідників [6, 10, 11]. Значно погіршує ситуацію ще й зниження опірності імунної системи людського організму, яке спостерігається в Україні внаслідок надмірного забруднення довкілля радіоактивними елементами та шкідливими хімічними речовинами. У зв'язку з цим актуальною залишається і проблема пошуку та вдосконалення діагностичних тестів для виявлення мікобактеріозів [5, 7, 8, 9, 12].

Ріст захворюваності на туберкульоз і послаблення уваги щодо вивчення атипичних мікобактерій зумовлюють необхідність комплексного підходу до питань, які стосуються профілактики та діагностики захворювань, спричинених мікобактеріями. Для ідентифікації атипичних мікобактерій запропоновано багато тестів, що базуються на імунологічних та генетичних методах дослідження. Однак у практичних лабораторіях їхнє використання значно утруднене, на відміну від мікробіологічних. Крім того, бактеріологічні методи займають основне місце, оскільки є необхідними не тільки для діагностики, але й для контролю ефективності терапії.

Найбільше занепокоєння спричиняють хворі, які активно виділяють збудника у навколишнє середовище. Саме такі пацієнти є основним джерелом інфекції і сприяють її поширенню. Не завжди своєчасна діагностика, малочисельний арсенал засобів лікування створюють надзвичайно складну проблему, що потребує вирішення. У зв'язку з цим аналіз основних мікробіологічних, біохімічних та імунологічних особливостей мікобактерій, виділених від хворих у сучасних умовах, та динаміки стійкості виділених культур мікобактерій до лікарських препаратів є актуальним.

У літературі не було знайдено повідомлень про бактеріовиділення та мікробіологічні характеристики виділених збудників атипичних мікобактерій в Україні.

Метою роботи було дослідження морфолого-культуральних та фізіолого-біохімічних властивостей штамів атипичних мікобактерій та визначення їхньої чутливості до основних антимікобактеріальних препаратів.

Об'єкт дослідження – штами атипичних мікобактерій, виділені від хворих на мікобактеріоз.

Матеріали і методи. Для культивування мікобактерій використовували середовище Левенштейна-Йенсена. Посіви інкубували при температурі 37 °С у термостаті протягом 2–21 днів до появи видимих колоній. Для виділення збудників використовували патологічний матеріал, одержаний від хворих на туберкульоз і мікобактеріоз легенів. Мазки фарбували за Грамом і Цілем-Нільсеном за загальноприйнятими методиками і використовували для вивчення морфологічних особливостей бактерій та наявності корд-фактора. Крім характеру росту на твердих середовищах, визначали здатність мікобактерій по-різному рости на рідких середовищах. Атипичні мікобактерії росли дифузно у вигляді купок, на відміну від істинних туберкульозних мікобактерій, що ростуть плівкою, або придонно, мають корд-фактор і ростуть у вигляді «кіс», «джгутів», «вусів» у тісному переплетенні окремих паличок одна з одною. Проте відомо, що стійкі мікобактерії туберкульозу до препаратів групи ГНК цілком або частково втрачають корд-фактор. Тому для диференціації атипичних культур від туберкульозних визначення корд-фактору використовували у комплексі з іншими тестами. Ідентифікацію виділених атипичних мікобактерій проводили використовуючи два комплекси досліджень. 1-й комплекс включав такі ознаки як швидкість росту, утворення пігменту, каталазно-пероксидазна активність, термостабільність каталази, стійкість до антимікобактеріальних препаратів; 2-й – ріст у мікрокультурах, гідроліз твіну-80, детальне вивчення морфолого-культуральних ознак.

Чутливість мікобактерій туберкульозу до антимікобактеріальних препаратів (ізоніазиду, стрептоміцину, канаміцину, рифампіцину, етамбутолу, тетрацикліну, пеніциліну, еритроміцину, фторхінолонів) визначали загальновідомим методом абсолютних концентрацій на твердих поживних середовищах.

Проводили визначення каталазної і пероксидазної активності у виділених від хворих культур мікобактерій. Для цього у пробірці з культурами вносили по 1 мл суміші пірогалолу і пероксиду водню. Суміш готували, змішуючи рівні об'єми 0,5 % розчину пірогалолу і 2 % розчину пероксиду водню. Каталазну активність оцінювали за видимим утворенням бульбашок. Активність пероксидази проявлялася в утворенні коричневого забарвлення колоній через 10–15 хв.

Ступінь активності оцінювали за 4-бальною системою: «+++» – висока, «++» – середня, «+» – низька, і «–» – відсутня каталазна і пероксидазна активність.

Для визначення термостабільності каталази готували 3,0 мл густої суспензії мікобактерій. 1,5 мл суспензії переносили у центрифужну пробірку, яку нагрівали на водяній бані при температурі 68 °С протягом 10 хвилин. Потім пробірку охолоджували і на предметне скло наносили по 1 краплі суспензії: на один кінець – непрогріту (служила контролем), на другу – суспензію після нагрівання. До цих суспензій додавали по 1 краплі 2 % пероксиду водню. Утворення пухирців свідчило про активність ферменту, відсутність – про пригнічення. Термостабільність каталази, так само як і її активність, вираховували за 4-бальною системою.

Результати та їх обговорення. Досліджували здатність виділених культур атипичних мікобактерій рости на середовищі Левенштейна – Йенсена з додаванням 500 мкг/мл саліцилового натрію. За наявності цієї сполуки типові мікобактерії (*M. tuberculosis*, *M. bovis*)

не ростуть, тоді як атипові дають хороший ріст. Посіви інкубували у темних термостатах і при необхідності на світлі. Після двох діб і далі щоденно відмічали наявність і особливості росту. Через 2–5 доби виростали види атипових мікобактерій, що належать до швидкоростучих (рис. 1). Їхній ріст спостерігався при температурі 25 °С і 45 °С (рис. 2). Вони мали ознаки розеткоподібного росту на середовищі, що містило 5 % NaCl, що додатково підтверджувало приналежність культури до групи швидкоростучих атипових мікобактерій. Колонії даних мікобактерій не були забарвленими і, як правило, мали R-форму (табл. 1). Морфологічно – це короткі палички без корд фактору. Такі культури попередньо відносили до *M. fortuitum*.

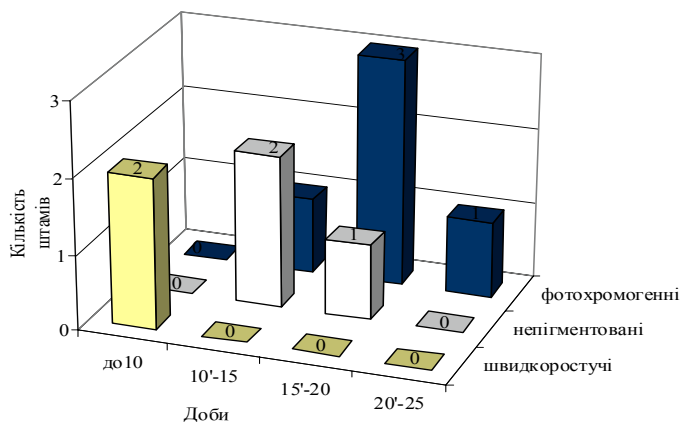


Рис. 1. Швидкість росту виділених штамів атипових мікобактерій

Таблиця 1

Морфолого-культуральні ознаки мікобактерій

Види мікобактерій	Ознаки				
	Морфологічні		Культуральні		
	При фарбуванні за Ціль-Нільсеном	Корд-фактор	Форма колоній	Колір колоній	Поверхня колоній
<i>M. tuberculosis</i>	Поліморфні, довгі, середньої товщини	Наявний	У більшості R	Кремовий	Нерівна
<i>M. bovis</i>	Товсті, довгі	Наявний	R і S	Білий (сірий)	Частіше нерівна
<i>M. fortuitum</i>	Короткі	Відсутній	R і S	Кремовий (при рості з малахітовим зеленим — зеленкуваті)	Частіше нерівна
<i>M. haemophilum</i>	Тонкі, короткі	Відсутній	R і S	Кремовий	Частіше гладка
<i>M. intracellulae</i>	Тонкі, короткі	Відсутній	R і S	Кремовий	Частіше гладка
<i>M. avium</i>	Тонкі, короткі	Наявний	R і S	Кремовий	Частіше гладка
<i>M. xenopi</i>	Довгі, ниткоподібні	Відсутній	R і S	Кремовий	Частіше гладка
<i>M. kansasii</i>	Довгі, товсті	Наявний	R і S	На світлі жовтогарячі	Частіше нерівна
<i>M. marinum</i>	Довгі, товсті	Відсутній	Частіше S	На світлі жовті, блискучі	Нерівна
<i>M. scrofulaceum</i>	Округлі	Відсутній	Частіше S	Жовтогарячі	Гладка

Через 5–10 діб починали рости непігментні атипіві мікобактерії (рис. 1). Вони росли у вигляді напівпрозорих колоній S-форми при температурі 45 °С. Серед непігментних форм клінічне значення мають чотири види: *M. haemophilum*, *M. intracellularae*, *M. avium* і *M. Xenopi*. Мікобактерії цієї групи ідентифікували за морфолого-культуральними ознаками та здатності рости при різних оптимальних температурах. Зокрема, виділені штами не росли на 5 % кров'яному агарі і на 2 % цитраті амонійного заліза, а тому не могли належати до *M. haemophilum*. Для ідентифікації культур даної групи атипівих мікобактерій має значення така ознака, як розмір утворених колоній за оптимальних умов росту. Зокрема, виділені культури на твердому середовищі утворювали дрібні колонії, що характерне для виду *M. avium*. Як видно з табл. 2, вони росли у вигляді напівпрозорих колоній S-форми. Колір колоній – кремовий. Найкращий ріст був при температурі 45 °С (рис. 2). Комплекс досліджених морфологічних ознак дозволив віднести виділені культури до виду *M. avium*.

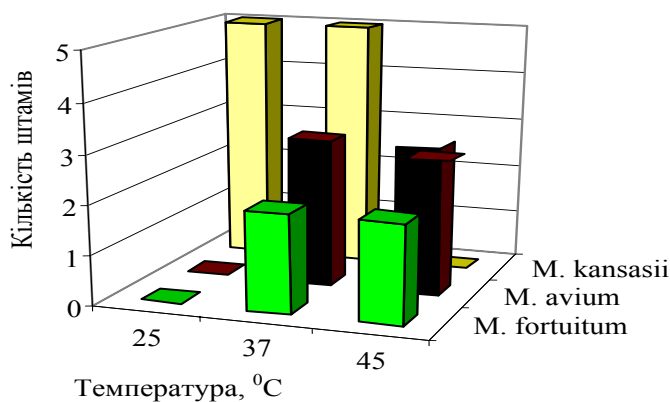


Рис. 2. Ріст атипівих мікобактерій при різних значеннях температури

На 10–15 добу відмічали ріст атипівих мікобактерій, що за класифікацією Раньйо-на відносяться до фотохромогенних (рис. 1). Вони росли при температурі 25 °С і 37 °С (рис. 2) у вигляді колоній S- і R-форм кремового (у темряві) і жовтого (на світлі) кольору (табл. 1). При перегляді фотохромогенних видів атипівих мікобактерій під мікроскопом (x100) було видно кристали. Згідно з літературними даними дані бактерії утворюють кристали β-каротину [6]. Наявність кристалів β-каротину і здатність рости при температурі 25–37 °С свідчили про те, що виділені культури належать до виду *M. kansasii*.

Серед виділених культур представників скотохромогенних атипівих мікобактерій виявлено не було.

Для виділених атипівих мікобактерій, крім вказаних особливостей (швидкості росту, пігментоутворення, форми та розмірів клітин і морфології колоній, температурного діапазону), характерними властивостями були негативна ніацинова проба, висока каталазна активність, виражена термостабільність каталази, відсутність корд фактору і первинна стійкість до антимікобактеріальних препаратів. Лише деякі штами були здатні гідролізувати твін-80. Слід зазначити, що при ідентифікації виділених штамів зустрічаються певні труднощі. Вони часто виділяються з типовими мікобактеріями. У таких випадках відмічали кратність виділення атипівих мікобактерій і «рясність» росту на селективних середовищах.

Таким чином, проведені дослідження дозволили розробити диференціальну таблицю (табл. 2) для первинної ідентифікації культур атипівих мікобактерій.

Відомо, що мікобактерії відзначаються високою мінливістю [3, 6, 7, 13]. Форма, розміри та угруповання клітин змінюється залежно від методу фарбування, середовища вирощування, стадії росту і хіміотерапії. Так, у мазку, забарвленому за Цілем-Нільсенном, *M. tuberculosis*, що були виділені від вперше виявлених хворих, виглядали поліморфними тонкими паличками, часто зігнутими, що лежали під кутом одна до одної, часто утво-

рювали невеликі скупчення у вигляді так званих “кіс” (часточки від мікроколоній). Мікобактерії туберкульозу, виділені від хворих на хронічний туберкульоз, були дещо потовщеними, мали гетерогенну структуру і у мазку часто мали кокоподібну форму. Щодо атипових мікобактерій, то вони мали дещо іншу форму і характер просторового розташування у мазку. Так, *M. fortuitum* – це короткі палички, без корд фактору. *M. avium* – тонкі, слабо галузисті палички, розташовані хаотично. *M. kansasii* – довгі і порівняно широкі, часто розташовані стрічками.

Таблиця 2

Фізіолого-біохімічні властивості мікобактерій

Ознака	Мікобактерії									
	Типові		Атипові							
			швидко-ростучі		непігментовані			фото-хромогенні		скотохромо-генні
<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. haemophilum</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. xenopi</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	
Швидкість росту, доби	20-25	14-20	2-5	5-10	5-10	5-10	5-10	14-20	14-20	15-21
Утворення пігменту у темряві	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Утворення пігменту на світлі	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Каталазна активність	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Пероксидазна активність	+	+	±	-	-	±	-	±	-	-
Термостабільність каталази	±	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Ріст на середовищі з 500 мкг/мл саліцилового натрію	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
При температурі 25°C	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
При температурі 37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
При температурі 45°C	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-

Примітка: «+» – наявність ознаки, «-» – відсутність ознаки, «±» – варіабельність ознаки.

Спостерігався також різний ріст мікобактерій на твердих поживних середовищах. Так, штами *M. fortuitum* на твердому яєчному середовищі росли пишним газоном, у вигляді зморшкуватих R-колоній кремового або жовтого кольору (рис. 3). Вони часто поглинали барвник, мали зеленкуватий відтінок і припіднятий центр, нагадуючи цвітну капусту.

Культури *M. avium* давали ріст у вигляді кремових, напівпрозорих дрібних колоній, які мали S-форму і часто зливалися між собою (рис. 4).

Досліджувані штами *M. kansasii* при культивуванні на світлі давали ріст у вигляді колоній жовтогарячого кольору S- і R-форми. Спостерігався також «бородавчастий» ріст (рис. 5). Колоній такого типу погано змивалися водою і знімалися з середовища, а при прокалюванні петлею давали тріщину.

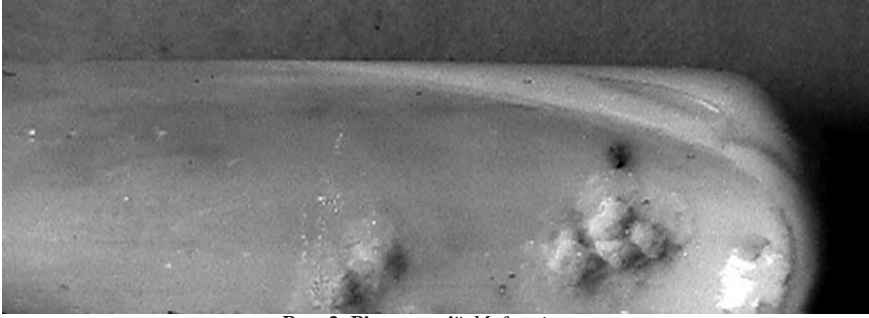


Рис. 3. Ріст колоній *M. fortuitum*

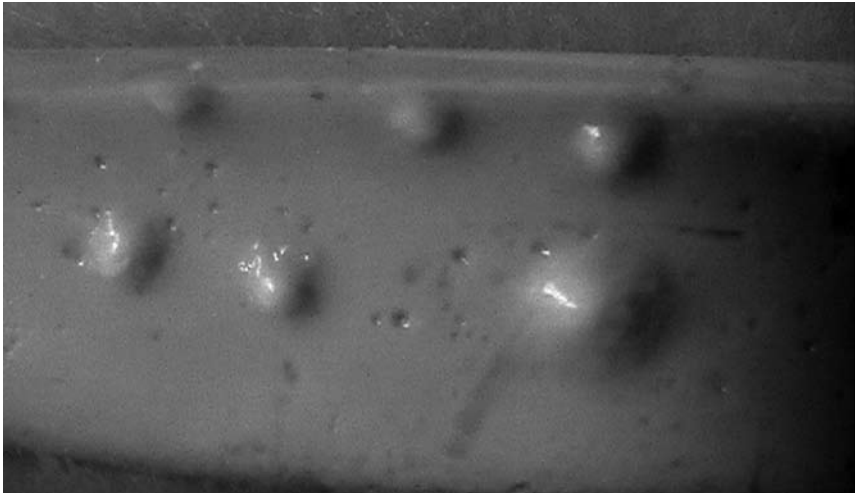


Рис. 4. Ріст колоній *M. avium*

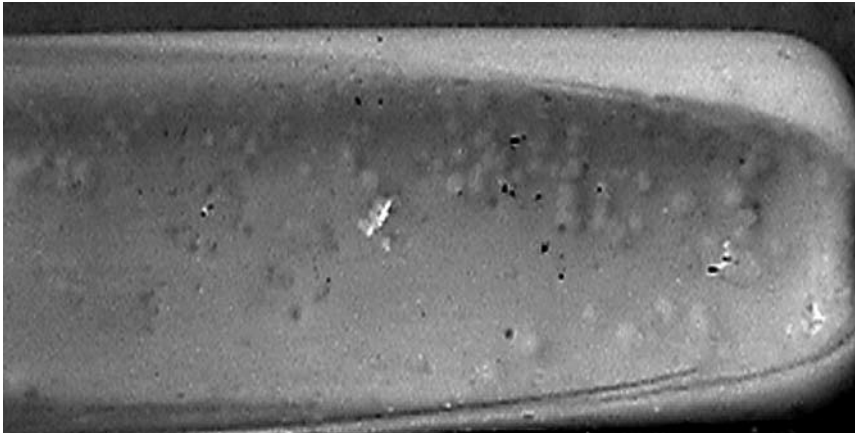


Рис. 5. Ріст колоній *M. kansasii*

Досить важливим і цікавим на сьогодні є дослідження окисно-відновних ферментів у мікобактерій туберкульозу. Знання про наявність тих чи інших ферментних систем у мікобактерій дозволяє краще зрозуміти такі особливості мікобактерій, як вірулентність, стійкість до антимікобактеріальних препаратів, а також правильно ідентифікувати штами.

Проводилися дослідження каталазної і пероксидазної активності виділених штамів *M. fortuitum*, *M. avium* і *M. kansasii* на різні доби вирощування. Контролем служила каталазна активність музейних штамів із колекції Львівського науково-дослідного інституту епідеміології та гігієни МОЗ України.

Найбільша кількість культур мікобактерій мали високу каталазну активність. Відзначено залежність збільшення ступеня активності з часом культивування (вона збільшува-

лася). Очевидно, мікобактерії здатні швидко змінювати метаболічні процеси і пристосовуватися до умов оточуючого середовища.

У більшості культур мікобактерій встановлено низьку пероксидазну активність, у решті вона була відсутньою. Ступінь пероксидазної активності також змінювався залежно від часу культивування.

Дослідження термолабільності каталази у 10 штамів атипичних мікобактерій показали зменшення термостійкості ферменту з підвищенням температури. Критичною температурою для каталази атипичних мікобактерій є температура 70 °С, тоді як для *M. tuberculosis* – 68 °С. Термолабільність каталази була однаковою у штамів, чутливих і стійких до антимікобактеріальних препаратів

Атипичні мікобактерії виявилися стійкими до двох, трьох, чотирьох і більше антимікобактеріальних препаратів.

Досліджені штам *M. fortuitum* були чутливими до фторхінолонів, тетрацикліну і макролідів. Штами *M. avium* виявилися чутливими до рифампіцину, тетрацикліну, еритроміцину і фторхінолонів. Штами *M. kansasii* були чутливими до еритроміцину.

Таким чином, дослідження морфолого-культуральних і фізіолого-біохімічних властивостей атипичних мікобактерій може бути основним тестом для своєчасного діагностування захворювання і правильного вибору схеми лікування для хворих на мікобактеріози.

Г.В. Яворская¹, Р.И. Сыбирная²

¹Львовский национальный университет им. Ивана Франка, Львов

²Львовский государственный университет внутренних дел, Львов

МОРФОЛОГО-КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ И ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АТИПОВЫХ МИКОБАКТЕРИЙ

Исследовано морфолого-культуральные и физиолого-биохимические свойства культур атипичных микобактерий, выделенных от больных на микобактериозы. Показана возможность использования указанных свойств для своевременной диагностики заболевания.

К л ю ч е в ы е с л о в а : атипичные микобактерии, микобактериозы, бактериовыделение

G.V. Yavorska¹, R.I. Sybirna²

¹Ivan Franko Lviv National University

²Lviv State University of Internal Affairs

MORPHOLOGIC-CULTURAL AND PHYSIOLOGIC-BIOCHEMICAL PROPERTIES OF ATYPICAL MYCOBACTERIA

S u m m a r y

Morphologic-cultural and physiologic-biochemical properties of atypical mycobacteria, isolated from patients with mycobacterioses have been studied. A possibility of the use of the above properties for the timely diagnosis of the disease is shown.

The paper is presented in Ukrainian.

K e y w o r d s : atypical mycobacteria, mycobacterioses, bacterioisolation.

The a u t h o r ' s a d d r e s s : *G.V. Yavorska*, Ivan Franko Lviv National University, 4 Grushevsky St., 79005, Ukraine.

1. Басыбеков С.Д., Благодарный Я.А., Жомузаков Н.Ж. Животные – источники микобактериозов у человека. Диагностика и профилактика. – Алма-Ата, 1985. – 111 с.
2. Бескровный П.С., Варенко Ю.С., Устимова Т.П. Микобактериозы, обусловленные *M. fortuitum* // Проблемы туберкулеза. – 1980. – № 2. – С. 68–69.
3. Вейсфеллер Ю.К. Биология и изменчивость микобактерий туберкулеза и атипичные микобактерии. – Будапешт: Издательство Академии наук Венгрии, 1975. – 334 с.
4. Вильдерман А.М., Чебанова О.К. Микобактериозы и туберкулез у лиц с ВИЧ-инфекцией // Терапевтический архив. – 1991. – № 11. – С. 139–144.

5. *Войтова Д.Н., Оттин Т.Ф.* Микобактериозы // Проблемы туберкулеза. — 1995. — № 5. С. 11–14.
6. *Вуль С.М.* О роли некоторых атипичных микобактерий в патологии человека // Проблемы туберкулеза. — РІК — № 9. — С. 66–70.
7. *Зыков М.П., Ильина Т.Б.* Потенциально патогенные микобактерии и лабораторная диагностика микобактериозов — М: «Медицина» 1978. — С. 22–24; 145–160.
8. *Ильина Т.Б., Оречкина М.Л.* Применение некоторых биохимических методов для дифференциации микобактерий // Лабораторное дело. — 1972. — № 11. — С. 685–688.
9. *Лотоцкая Р.А., Зеберга А.К.* Выделение и идентификация атипичных микобактерий // Здравоохранение (Кишинев). — 1976. — № 2. — С. 21–23.
10. *Лотоцкая Р.А., Кузнцова Е.Е., Соулите В.М., Зеберга А.К., Имкена Л.Я., Лащенко Е.Л., Фрейдман Б.Н., Залесский Р.Р.* К вопросу о нетуберкулезных микобактериях и микобактериозе // Проблемы туберкулеза. — 1979. — № 9 — С. 58–61.
11. *Новожилова И.А.* Микобактериозы: прошлое, настоящее и будущее // Український пульмонологічний журнал. — 2004. — № 2. — С. 3–7.
12. *Сибірна Р.І., Литвин Л.М., Сибірний А.В., Гречуха Н.Г., Юкало В.Е.* Діагностика особливості клінічної картини й перебігу мікобактеріозів // Лікарська справа. — 1999. — №1. — С. 88–90.
13. *Яворська Г.В.* Морфолого-культуральні особливості мультирезистентних штамів *Mycobacterium tuberculosis* // Вісник Львівського університету: Сер.: біологічна. — 2004. — Вип. 38. — С. 165–170.

Отримано 12.02.2008

УДК 579.22+579.26+579.84+616.89

**Т.П. Криштаб¹, В.О. Романовська¹, Н.А. Стогній², Т.В. Ковтун²,
Д.С. Лебедев², Г.М. Тищенко²**

¹Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ МСП, Д03680, Україна

²Український НДІ соціальної і судової психіатрії та наркології МЗ України,
вул. Фрунзе, 103, Київ, 80, Україна

АНТИАЛКОГОЛЬНА І АНТИНАРКОТИЧНА ДІЯ METHYLOBACTERIUM EXTORQUENS УКМ В-3368

Показано ефективність дії мікробної біомаси на характерні показники при алкогольній і морфінній інтоксикації організму. Досліджена мікробна біомаса впливає на регуляторні біохімічні і фізіологічні системи у експериментальних тварин, нормалізуючи активність алкогольдегідрогенази та альдегіддегідрогенази, а також вміст дофаміну, які порушені під впливом алкоголю і морфіну. Завдяки цьому знижується інтоксикація організму. Окрім специфічної дії, дана мікробна біомаса може бути джерелом білку, амінокислот, вітамінів, мікроелементів. Тому розроблений на її основі мікробний препарат може бути використано для лікування алкогольної і наркотичної залежності у вигляді біологічно активної добавки. Таким чином, розроблено мікробний препарат, призначений для лікування алкогольної і опійної залежності. Один із механізмів його дії базується на здатності мікроорганізмів трансформувати спирти і альдегіди, завдяки наявності алкоголь- і альдегіддегідрогенази, інші механізми його дії знаходяться у стадії дослідження.

Ключові слова: алкогольна і наркотична залежність, бактерії, мікробний препарат.

На даний час відомі засоби для лікування залежності від алкоголю і наркотиків недостатньо ефективні. Наявні препарати лише знижують інтоксикацію, купірують абстиненцію, тим самим тимчасово поліпшують загальний стан хворих. Для лікування хворих з алкогольною та опійною залежністю використовуються, зокрема, препарати природного походження (з рослинної сировини), за приготуванням це досить трудомісткі процедури і за дією недостатньо ефективні [10]. Існують препарати на основі рецептів давньокитайської медицини, в сучасному сприйнятті — це біологічні харчові добавки, які складають протиалкогольний комплекс із продуктами харчування [19, 20]. Ці добавки лише пом'якшують токсичну дію етанолу і його метаболітів, і можуть використовуватися з метою профілактики.

Відомо, що при зловживанні алкоголем в організмі відбувається порушення метаболізму етанолу, змінюється активність основних ферментів його метаболізму (алкогольдегідрогенази та ацетальдегіддегідрогенази), що призводить до накопичення в органах

© Т.П. Криштаб, В.О. Романовська, Н.А. Стогній, Т.В. Ковтун, Д.С. Лебедев, Г.М. Тищенко, 2009