

УДК 639.311:597.551.2+[636.087.8+574.64]

О. В. Барбухо, А. О. Жиденко

Чернігівський національний педагогічний університет ім. Т. Г. Шевченка

ПІДВИЩЕННЯ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ ЛИЧИНОК КОРОПА В УМОВАХ ДІЇ ГЕРБИЦИДУ РАУНДАП ПРОБІОТИЧНИМ ПРЕПАРАТОМ БПС-44

Вивчено вплив гербициду раундап (діюча речовина – ізопропіламінна сіль гліфосату, 480 г/л) у різних концентраціях на виживання личинок коропа (*Cyprinus carpio* L.). Показано можливість компенсації пробіотиком БПС-44 токсичної дії гліфосату. Раундап із концентрацією 0,01–80 мг/дм³ негативно впливає на личинок коропа. Попереднє гербицидне навантаження впродовж пренатального періоду онтогенезу сприяє незначному зростанню життєдіяльності личинок лише за найменшої концентрації (0,001 мг/дм³). В усіх інших випадках воно спричинює суттєве збільшення відходу личинок. Препарат БПС-44 сприяє підвищенню життєздатності личинок коропа, його найбільший ефект проявляється за умов гербицидного навантаження середньої інтенсивності (0,02–0,80 мг/дм³).

Е. В. Барбухо, А. А. Жиденко

Черниговский национальный педагогический университет им. Т. Г. Шевченко

ПОВЫШЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ЛИЧИНОК КАРПА В УСЛОВИЯХ ДЕЙСТВИЯ ГЕРБИЦИДА РАУНДАП ПРОБИОТИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТОМ БПС-44

Изучено влияние гербицида раундап (действующее вещество – изопропиламинная соль глифосата, 480 г/л) в разных концентрациях на выживание личинок карпа (*Cyprinus carpio* L.). Показана возможность компенсации пробиотиком БПС-44 токсического действия глифосата. Раундап в концентрации 0,01–80 мг/дм³ отрицательно влияет на личинок карпа. Предшествующая гербицидная нагрузка в течение пренатального периода онтогенеза способствует незначительному возрастанию жизнедеятельности личинок лишь при наименьшей концентрации (0,001 мг/дм³). Во всех других случаях она приводит к существенно большему отходу личинок. Препарат БПС-44 способствует повышению жизнеспособности личинок карпа, его наибольший эффект проявляется в условиях гербицидной нагрузки средней интенсивности (0,02–0,80 мг/дм³).

О. V. Barbukho, A. O. Zhidenko

T. G. Shevchenko Chernigiv National Pedagogical University

ENHANCING THE VIABILITY OF CARP LARVAE BY PROBIOTIC PREPARATION BPS-44 UNDER THE HERBICIDE ROUNDUP INFLUENCE

The influence of different concentrations of the herbicide roundup (active ingredient – isopropylamine salt of glyphosate, 480 g/l) on survival of the carp larvae (*Cyprinus carpio* L.) and the compensation of the adverse effects by probiotic BPS-44 are studied. Roundup (concentrations from 0.01 to 80 mg/dm³) makes negative effect on the carp larvae. Primary herbicide stress in prenatal period of ontogenesis leads to some increase of larvae viability only in minimal concentration – 0.001 mg/dm³, in all other cases it leads to

considerable increase of the larvae mortality. The preparation BPS-44 enhances the viability of carp larvae under conditions of medium toxic stress of the herbicide (0.02–0.80 mg/dm³).

Вступ

Значні масштаби застосування пестицидів для боротьби зі шкідливими організмами збільшили надходження цих речовин у водойми. Багато дослідників показали високу чутливість личинок риб до дії забруднювальних речовин, зокрема гербіцидів, які потрапляють у водне середовище та, навіть у невеликих концентраціях, згубно впливають на розвиток і виживання гідробіонтів [7; 14; 17], особливо на ранніх стадіях онтогенезу риб, призводячи до загибелі ікри та личинок, що, в свою чергу, впливає на процес відтворення та чисельність особин у популяції [2; 6].

Із метою підвищення виживання молоді риб на ранніх етапах онтогенезу в практиці рибного господарства широко застосовують пробіотики [5; 8]. На нашу думку, значного підвищення життєздатності личинок коропа в умовах токсичної дії гербіцидів можна досягти шляхом застосування пробіотичного препарату БПС-44. Цей препарат розроблено в Інституті сільськогосподарської мікробіології НААНУ (м. Чернігів), на основі живої культури мікробів *Bacillus subtilis* штаму 44-р, виділеного з рубця жуйних тварин, який володіє високою біологічною активністю. У зв'язку з позитивними результатами використання БПС-44 у тваринництві значний інтерес викликає ефективність застосування даного пробіотичного препарату для представників водної фауни, зокрема личинок риб, що зазнають гербіцидного навантаження.

Мета дослідження – охарактеризувати динаміку виживання личинок коропа лускатого, що перебували в умовах токсичного впливу гербіциду раундап, їх життєздатність під дією останнього з використанням пробіотичного препарату БПС-44.

Матеріал і методи досліджень

Експериментальний матеріал – личинки коропа лускатого (*Cyprinus carpio* L.), яких утримували в однолітрових акваріумах із відстояною водопровідною водою протягом 12, 24, 48, 72 і 96 годин. Досліди проводили у триразовій повторності. Середня температура води становила +21,5 °С, концентрація кисню – 7,0–7,8 мг/л, рН – 7,5–8,4. У різних варіантах досліду використовували по 100 личинок, перевезених із ВАТ «Чернігіврибгосп» у герметично закритих поліетиленових пакетах об'ємом 2 л, наповнену заповнених водою та киснем. Транспортування тривалістю 20 хв за температури води +18 °С пройшло зі 100 % виживанням личинок.

Варіанти досліду: 1) контроль; 2) вплив різних концентрацій раундапу 0,05 ГДК (гранично допустима концентрація) – 0,001 мг/дм³, 0,5 ГДК – 0,01, 1 ГДК – 0,02, 2 ГДК – 0,04, 4 ГДК – 0,08, 40 ГДК – 0,8, 400 ГДК – 8,0 та 4 000 ГДК – 80 мг/дм³ здійснювали тільки на личинок після їх вилуплення без попереднього впливу на ікру; 3) із попереднім впливом раундапу (в усіх визначених концентраціях) на ікру, а потім – на личинок; 4) вплив пробіотичного препарату БПС-44 (ТУУ 24.4-00497360-691-2003) та різних концентрацій раундапу на личинок коропа без попереднього їх впливу на ікру, дію на личинок здійснювали тільки після їх вилуплення шляхом додавання до води (за добу до внесення раундапу) пробіотичного препарату БПС-44 з концентрацією мікроорганізмів *Bacillus subtilis* 44-р $1,25 \times 10^8$ КУО/л води; 5) із попереднім впливом пробіотичного препарату БПС-44 та раундапу (в усіх визначених концентраціях) на ікру, потім їх спільна дія – на личинок.

Відхід личинок в усіх варіантах досліду визначали шляхом прямого обліку. Одержані результати обробляли статистично за стандартними методами. Відмінності між групами вважали достовірними при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Вживання личинок коропа за умов гербіцидного навантаження залежить як від використання певної концентрації раундапу, так і від того, чи піддавалися вони його впливу впродовж ембріонального розвитку, чи раундап почав впливати на личинок риб лише після їх вилуплення.

Через 12 годин дії на личинок коропа досліджуваного гербіциду в концентрації $0,001 \text{ мг/дм}^3$ живими лишалися $90,9 \%$ особин, у концентрації $0,01 \text{ мг/дм}^3$ – $90,1 \%$, у концентраціях $0,02$, $0,04$, $0,08$, $0,8$, $8,0$ та $80,0 \text{ мг/дм}^3$ – $89,6$, $87,3$, $84,5$, $80,2$, $69,3$ та $0,0 \%$ відповідно. Пояснення цих результатів – фізико-хімічні властивості гліфосату, який добре розчиняється у воді, його коефіцієнт ліпофільності $\text{Log } P = -2,36 \pm 0,64$, що свідчить про високу швидкість проникнення цієї речовини до організму риб. На 12-ту годину експозиції в контрольній групі вижило $91,8 \%$ інтактних личинок (рис. 1).

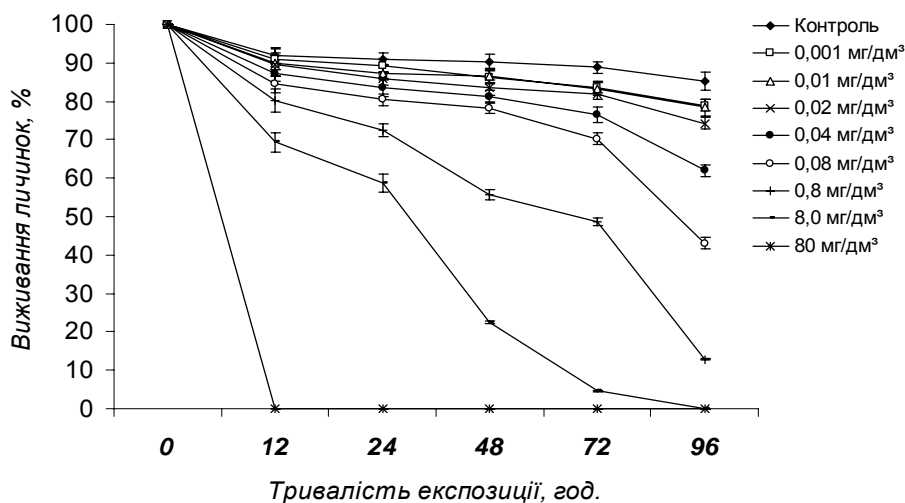


Рис. 1. Вплив раундапу на виживання личинок коропа, які не піддавались його попередній дії ($M \pm m$; $n = 300$)

Щодо личинок, які піддавалися токсичній дії раундапу ще з ембріонального розвитку (рис. 2), то за його концентрації $0,001 \text{ мг/дм}^3$ спостерігається виживання $91,4 \%$ особин, що більше за відповідне значення для тих личинок, ембріональний розвиток яких відбувався у чистій воді ($90,9 \%$). Можливо, це зумовлено тим, що низька доза гербіциду впродовж ранніх етапів онтогенезу сприяє активізації захисних і адаптаційних механізмів, за рахунок чого спостерігається деяке підвищення життєздатності личинок. Разом із цим, за вищих концентрацій токсиканта такого явища не спостерігається. За впливу раундапу у концентрації $0,01 \text{ мг/дм}^3$ на личинок, що вилупилися у воді з відповідною його концентрацією через 12 годин експозиції, живими залишалися $82,5 \%$ їх початкової кількості, за концентрації гербіциду $0,02 \text{ мг/дм}^3$ – $82,4 \%$, за концентрацій $0,04$, $0,08$ та $0,8 \text{ мг/дм}^3$ – $78,9$, $74,7$ і $73,2 \%$ відповідно, тобто відхід личинок в $1,4$ – $1,8$ рази перевищував аналогічні значення для личинок з інтактною ікри, де їх виживання становило $91,8 \%$ (рис. 2). Можливо, перебування гідробіонтів у токсичному середовищі ще з ембріонального розвитку – фактор додаткового навантажен-

ня, що посилює дію токсиканта на личинок коропа. Варіантів із личинками, ембріогенез яких проходив за концентрацій раундапу 8,0 та 80,0 мг/дм³, не було, оскільки за цих концентрацій 100 % ікри загинуло на стадіях утворення очних бокалів і рухливості ембріонів в оболонках [1].

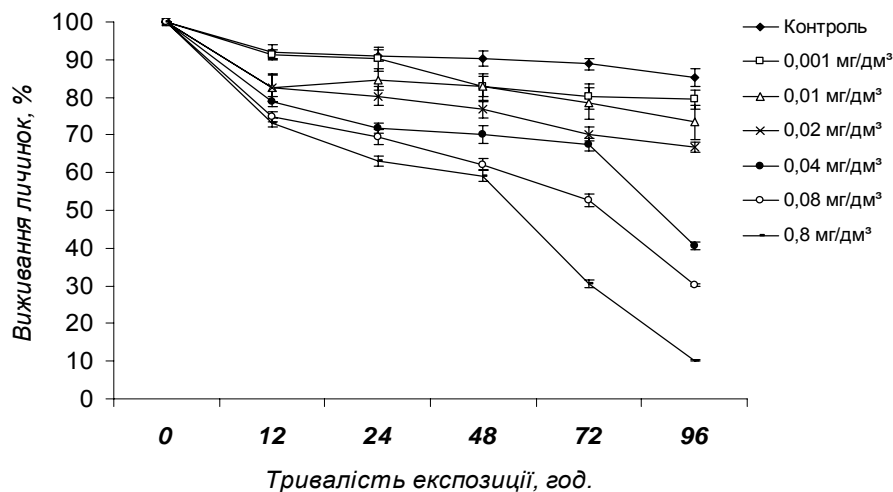


Рис. 2. Вплив раундапу на виживання личинок коропа, які піддавалися його попередній дії ($M \pm m$; $n = 300$)

Через 24 години експозиції раундапу відбувалося поступове відмирання тих личинок, які впродовж ембріонального розвитку не піддавалися попередній дії гербіциду: за концентрацій токсиканту 0,001, 0,01, 0,02, 0,04 та 0,08 мг/дм³ їх виживання становило 89,2, 87,3, 86,0, 83,5 і 80,4 % відповідно, тоді як інтактних личинок на цей час вижило 91,1 %, тобто відмирання личинок після 12-годинної контрольної точки за цих концентрацій відбувалося паралельно з контролем (див. рис. 1). Разом із цим, за концентрацій досліджуваного гербіциду 0,8 та 8,0 мг/дм³ відмирання личинок у проміжку часу від 12 до 24 годин значно прискорилося порівняно з контролем – кількість особин, що вижили, складала лише 72,6 і 58,7 % від їх початкової кількості. Динаміку виживання личинок коропа за дії раундапу в концентрації 80 мг/дм³ надалі не обраховували, оскільки впродовж першого облікового відрізка часу (12 годин) загинуло 100 % личинок. Дія 80 мг/дм³ гербіциду більшою мірою вплинула на личинок, у результаті чого відбулась повна їх загибель (див. рис. 1).

У динаміці виживання личинок, що піддавалися попередній дії раундапу (впродовж ембріонального розвитку), через 24 години експозиції спостерігалися ті самі закономірності, що й через 12 годин. За концентрації токсиканта 0,001 мг/дм³ вижило трохи більше личинок порівняно з тими, що не піддавалися дії гербіциду на стадії ікри (90,2 порівняно з 89,2 %). За концентрацій раундапу 0,01, 0,02, 0,04, 0,08 та 0,8 мг/дм³ живими залишалися 84,6, 80,3, 71,8, 69,4 та 63,1 % особин відповідно, тобто частка відмерлих особин в 1,2–1,7 раза перевищувала частку відмерлих личинок, що не піддавалися попередньому гербіцидному навантаженню відповідної інтенсивності (див. рис. 2). Можливо, більша частка загиблих личинок залежала від кількості раундапу в ікрі, накопиченого протягом в онтогенезу.

Через 48 та 72 години експозиції ступінь виживання личинок, які не піддавалися попередній дії раундапу, так само залежала від концентрації токсиканта у воді. На кінець цих проміжків часу залишалось живими 90,3 та 88,8 % інтактних особин

відповідно, за досліджуваних концентрацій раундапу від 0,001 до 0,08 мг/дм³ частка личинок, що вижили через 48 годин експозиції, складала 78,3–86,3 %, а через 72 години – 70,3–83,7 %, тобто й надалі повільно знижувалася, що свідчить про низьку здатність личинок до захисту від дії агресивного середовища через відсутність захисної зовнішньої оболонки, що виконує функцію бар'єра для проникнення токсичних речовин. За концентрації гербіциду 0,8 мг/дм³ відхід личинок стрімко зростав: через 48 годин живими залишилося 55,6 % особин. Через 72 години – 48,6 %; за концентрації 8,0 мг/дм³ більшість личинок коропа загинула: через 48 годин їх відхід склав 77,6 %, а через 72 години експозиції раундапу – 95,4 % (порівняно з 9,7 та 11,2 % відходу у контролі відповідно). Одержані фактичні докази токсичної дії гербіциду раундапу у різних концентраціях на виживання личинок риб разом із даними, отриманими в інших дослідках [3; 11; 12], дають підстави стверджувати, що значна їх загибель пов'язана зі зміною проникності покривів тіла в онтогенезі і, як наслідок, надходженням отрути в організм (низька у ікри, оскільки ембріон контактує із навколишнім середовищем через оболонку; і висока у личинок, оскільки взаємодія із середовищем відбувається безпосередньо через поверхню їх тіла).

Через 96 годин експозиції досліджуваного гербіциду у концентраціях 0,001, 0,01, 0,02 і 0,04 мг/дм³ частки личинок, які вижили, склали 79,0, 78,4, 74,3 і 62,0 % відповідно порівняно з 85,2 % у контролі. Щодо концентрацій раундапу 0,08 і 0,8 мг/дм³, то за їх впливу процес відмирання личинок значно посилювався: частка особин, що вижили, становила лише 43,1 і 12,9 % відповідно, що, можливо, пов'язано з тривалішим часом перебування їх у воді з токсикантом. За концентрації токсиканта 8,0 мг/дм³ через 96 годин експозиції відхід личинок становив 100 %, адаптація неможлива (див. рис. 1). Отримані результати підтверджують думку інших авторів про шкідливий вплив токсичних речовин на личинок риб із наступною фазою настання смерті за дії високих концентрацій токсиканта [4].

Щодо впливу попередньої експозиції досліджуваного токсиканта (упродовж ембріогенезу) на здатність до виживання личинок за умов гербіцидного навантаження, то починаючи з 48-ї години після вилуплення личинок він уже був незначним, через що різниця у ступені виживання личинок коропа, що не піддавалися попередній дії раундапу, та тих, що піддавалися, поступово згладжувалася впродовж перших діб постнатального розвитку (див. рис. 2). Відхід личинок за дії раундапу в концентраціях від 0,001 до 0,8 мг/дм³ порівняно з тими, що не зазнавали попередньої його дії, через 48 годин був більшим лише у 1,1–1,7 раза, через 72 години – у 1,1–1,6 раза, через 96 годин – лише до 1,5 раза.

Отже, раундапу у всіх використаних концентраціях (0,01–80 мг/дм³) виявляє токсичну дію відносно личинок коропа, що супроводжується зниженням їх життєздатності вже у перші години після вилуплення з ікри. Попереднє гербіцидне навантаження впродовж пренатального періоду онтогенезу сприяє незначному зростанню життєздатності личинок лише за найменшої використаної концентрації (0,001 мг/дм³). В усіх інших випадках воно призводить до суттєвого збільшення відходу личинок. Стимулювальний вплив низької концентрації раундапу на життєздатність личинок коропа може пояснюватися тим, що у відповідь на розвиток стресу в організмі гідробіонтів активуються біохімічні процеси, результат чого – посилення адаптаційних можливостей організму тварин, а відтак – зменшення частки особин, що гинуть унаслідок токсичної дії гербіциду. За більших концентрацій токсиканта адаптаційні зрушення для компенсації негативної дії стрес-фактора вже не виникають.

Як препарат із потенційно адаптогенними властивостями ми використали пробіотик БПС 44 на основі штаму аеробних спорових бактерій, додаючи його до води за добу до внесення раундапу. Виявлено, що пробіотичний препарат БПС 44 проявляє суттєвий позитивний вплив на виживання личинок коропа за високої інтенсивності гербіцидного навантаження: як тих, що потрапляли у токсичні умови вже у постнатальному розвитку, так і тих, які на стадії ікри піддавалися дії досліджуваного токсиканта. У перших: при концентрації раундапу, що не перевищує 0,02–0,04 мг/дм³, спостерігається помірний вплив пробіотичного препарату БПС-44 на виживання личинок коропа: кількість загинув особин менша на 1,5–5,0 % порівняно із впливом відповідних концентрацій раундапу без його компенсації пробіотиком (рис. 3).

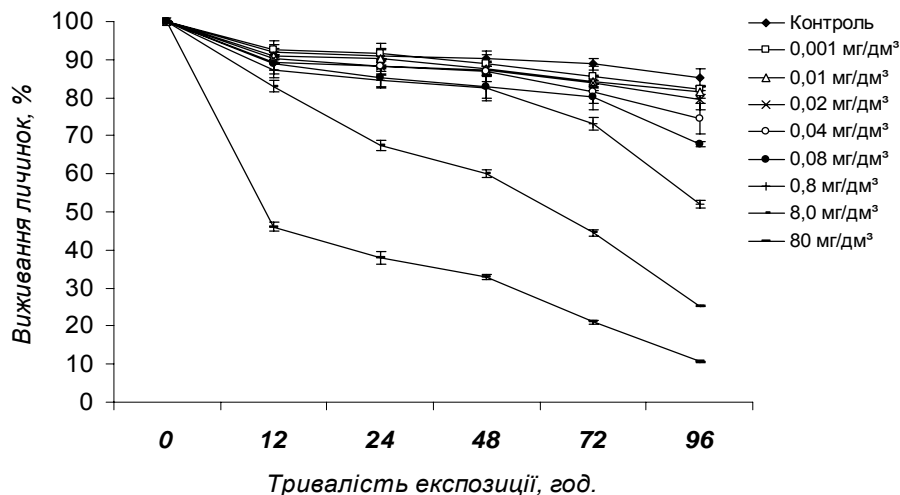


Рис. 3. Вплив пробіотичного препарату БПС-44 та раундапу на виживання личинок коропа, які не піддавалися їх попередній дії ($M \pm m$; $n = 300$)

Лише через 96 годин експозиції за концентрації гербіциду 0,04 мг/дм³ спостерігається зменшення відходу личинок на 12,6 % порівняно з відповідною контрольною точкою у варіанті без використання препарату БПС-44. Починаючи з концентрації раундапу 0,08 мг/дм³ і більше, за компенсації його токсичної дії пробіотичним препаратом ефект від застосування останнього проявляється більшою мірою, що, можливо, пов'язано з детоксикацією організму личинок завдяки дії бактерій *Bacillus subtilis* 44-р. За концентрацій токсиканта у воді 0,08, 0,8 і 8,0 мг/дм³ частка личинок коропа, що залишаються живими через 12 годин експозиції, склала 88,9, 87,1 і 83,0 % відповідно, що на 5,2–19,3 % перевищує їх виживання за дії лише раундапу. Через 24 години від початку експерименту живими залишалися 85,3, 84,6 і 67,5 % відповідно, що на 6,0–16,5 % більше, ніж без застосування пробіотика. Через 72 години – 80,2, 73,1 і 44,5 % відповідно, що на 9,9–39,9 % більше за відповідні концентрації раундапу, не компенсовані препаратом БПС-44 (див. рис. 1). Це узгоджується з відомостями про те, що додавання пробіотичних бактерій сприяє швидшому розкладанню шкідливих органічних речовин у воді, а також значно скорочує смертність личинок і мальків деяких риб [9; 10]. Ці процеси можуть бути пов'язані зі здатністю бактерій *Bacillus subtilis* виробляти низку органічних кислот (продуктів бродіння змішаного типу) і широкий спектр природних антибіотиків [15], за рахунок чого нормалізується склад мікрофлори макроорганізму, а відтак – підвищується життєздатність останнього.

Через 96 годин частка живих личинок за концентрації гербіциду 0,08 і 0,8 мг/дм³ становила 67,7 і 52,0 %, що в 1,6–4,0 раза більше, ніж у відповідних варіантах без пробіотика, за концентрації 8,0 мг/дм³ частка загиблих особин склала 74,7 % порівняно зі 100,0 % без додавання пробіотика. Отримані дані свідчать про те, що застосування пробіотиків сприяє підвищенню виживання личинок риб, зростанню їх стійкості до дії несприятливих факторів довкілля. За максимальної з використаних концентрацій токсиканта (80,0 мг/дм³) із додаванням досліджуваного пробіотичного препарату, через 12 годин експозиції живими залишилося 30,3 % особин, до 72-ї години експозиції їх кількість знизилася до 21,0 %, до 96-ї години – до 10,6 %. Проте за дії такої концентрації гербіциду без додавання у воду пробіотика БПС-44 всі личинки гинули впродовж перших 12 годин після потрапляння до токсичного середовища. Це, у свою чергу, узгоджується з даними Laga-Flores [16] щодо здатності пробіотичних бактерій зменшувати шкідливий вплив на личинок риб і підвищувати їх виживання за дії високих концентрацій токсиканта. Адже відомо, що одним із механізмів профілактичної дії пробіотичних препаратів на основі аеробних бацил вважається синтез мікроорганізмами ферментів, які каталізують гідролітичні та окисно-відновні реакції (оксидази зі змішаними функціями, низькоспецифічні естерази, епоксидгідролази тощо), за рахунок чого відбувається знешкодження токсичних органічних сполук [13].

Якщо порівнювати результати вивчення компенсаторної дії пробіотичного препарату БПС-44 за гербіцидного навантаження на личинок коропа, що виключилися з ікри, яка також піддавалася їх впливу, з вищенаведеними даними, то видно, що цей пробіотик також позитивно впливає на динаміку виживання личинок, як і у випадку, коли вони вперше поміщалися у воду з БПС-44 і раундапом лише на початку постнатального розвитку (рис. 4). Разом із цим, пробіотичний препарат також виявляє позитивний вплив на динаміку виживання личинок коропа, що перебувають у воді з концентрацією гербіциду, яка перевищує ГДК у 2–4 і більше разів. Це не дуже позначається на динаміці їх виживання у воді з нижчими концентраціями токсиканта. За компенсаторної дії пробіотичного препарату БПС-44 та мінімальної з використаних концентрацій гербіциду (0,001 мг/дм³) не спостерігається помітної різниці у частці загиблих особин між виживанням личинок коропа, що піддавалися впливу раундапу та БПС-44 упродовж пренатального розвитку з тими, які зазнавали їх дії у перші години після виходу з ікри.

Щодо личинок, які піддавалися попередній дії БПС-44 із раундапом ще з ембріонального розвитку, то за його концентрації 0,01 мг/дм³ через 12 годин експозиції живими залишалися 90,5 % від їх початкової кількості, за концентрації гербіциду 0,02 мг/дм³ – 87,4 % (можливо, личинки, що залишилися, завдяки дії бактерій *Bacillus subtilis* 44-р набули стійкості до раундапу й у наступні дні практично не гинули), за концентрацій 0,04, 0,08, 0,8, 8,0 та 80,0 мг/дм³ – 82,9, 80,1, 76,6, 70,2 і 40,3 % відповідно, а отже, відхід личинок в 1,1–1,8 раза перевищував аналогічні значення для личинок з інтактною ікри.

У динаміці виживання личинок, що піддавалися попередній спільній дії раундапу з БПС-44 упродовж ембріонального розвитку, через 24 години експозиції спостерігалися ті самі закономірності, що й через 12 годин, проте за концентрації токсиканта 0,001 мг/дм³ вижило трохи менше личинок порівняно з тими, що не піддавалися попередній дії гербіциду з пробіотичним препаратом на стадії ікри (91,1 % порівняно з 91,5 %) (див. рис. 4).

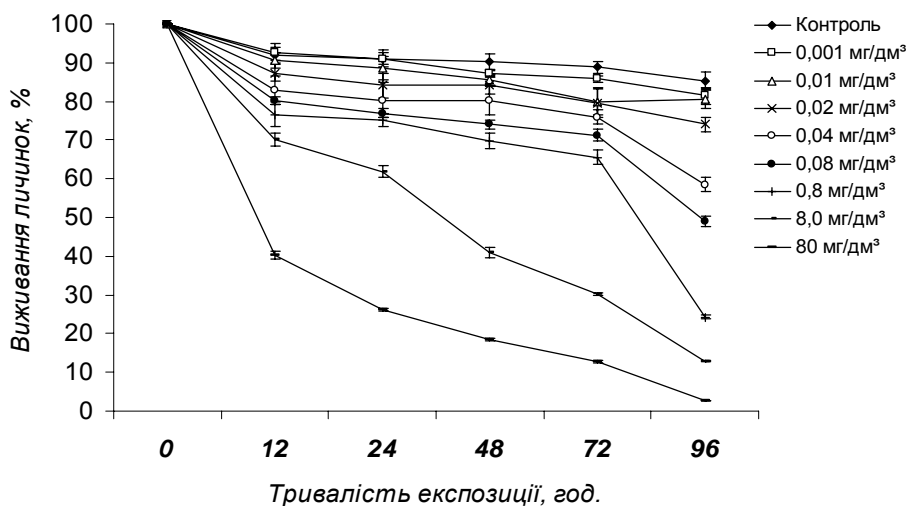


Рис. 4. Вплив пробіотичного препарату БПС-44 та раундапу на виживання личинок коропа, які піддавались їх попередній дії ($M \pm m$; $n = 300$)

Зі збільшенням терміну перебування личинок коропа у токсичних умовах, навіть за суттєвого позитивного впливу пробіотика БПС-44, кількість живих особин поступово зменшувалася, хоча і повільніше порівняно з варіантами без використання пробіотичного препарату. Щодо залежності життєздатності личинок гідробіонтів від того, чи перебувала їх ікра у токсичних умовах, простежується аналогічна закономірність, хоча різниця частки відмерлих особин дещо суттєвіша порівняно з відповідними варіантами без додавання у воду пробіотичного препарату.

Відхід личинок за дії раундапу в концентраціях 0,02–8,0 мг/дм³ порівняно з тими, що не зазнавали попередньої дії останнього за компенсаторного впливу пробіотичного препарату БПС-44, через 48 години експозиції був більшим в 1,2–1,7 раза, через 72 години – в 1,3–1,5 раза, через 96 години – в 1,4–2,2 раза.

Отже, за результатами дослідження впливу гербіцидного навантаження на виживання гідробіонтів і можливості підвищення їх життєздатності з використанням пробіотичного препарату БПС-44 встановлено, що раундап за дії всіх використаних концентрацій негативно впливає на личинок коропа. БПС-44 компенсує токсичний вплив гербіциду та сприяє підвищенню життєздатності личинок.

Висновки

Вживання личинок коропа залежить як від концентрації гербіциду раундап у воді, так і від того, чи піддавалися вони впливу токсиканта впродовж ембріонального розвитку, або пестицид почав впливати на личинок риб лише після їх вилуплення.

Раундап у концентраціях, що становлять 8,0–80 мг/дм³, характеризується високою токсичністю для личинок коропа. Пробіотичний препарат БПС-44 сприяє підвищенню їх життєздатності, його ефект найбільше проявляється за умов гербіцидного навантаження середньої інтенсивності (0,02–0,8 мг/дм³).

Бібліографічні посилання

1. **Барбухо Е. В.** Повышение жизнеспособности икры карпа при гербицидном загрязнении пробиотическим препаратом БПС-44 // Биология внутренних вод. Тез. докл. XIV школы-конф. молодых ученых (Борок, 26–30 октября 2010 г.). – Борок, 2010. – С. 5.

2. **Велдре А.** Токсическое воздействие нитритов на рыб / А. Велдре, М. Роома // Экология. – 1990. – № 11. – С. 71–73.
3. **Дехник Т. В.** Ихтиопланктон Черного моря. – К. : Наукова думка, 1973. – 234 с.
4. **До питання** про якість води водойм рибогосподарського призначення та її вплив на розвиток ікри коропа (*Cyprinus carpio* L.) / В. В. Цедик та ін. // Науковий вісник ЛНУВМБТ ім. С. З. Гжицького. – 2008. – Т. 10, № 4 (39). – С. 273–278.
5. **Карасева Т. А.** Влияние препарата «сухая бактериальная культура ацидофильной палочки» на здоровье и рост радужной форели / Т. А. Карасева, Н. К. Воробьева, М. А. Лазарева // Марикультура Северо-Запада России. Тез. докл. научн.-практ. конф. – Мурманск, 2000. – С. 22–23.
6. **Худияш Ю. Н.** Выживаемость икры карпа на ранних стадиях эмбриогенеза под воздействием N-оксида 2,6-диметилпиридина / Ю. Н. Худияш, А. С. Потрохов, О. Г. Зиньковский // Гидробиол. журнал. – 2003. – Т. 39, № 6. – С. 83–89.
7. **Экологические** аспекты биологии репродукции / Г. Г. Корниенко, А. А. Кожин, С. П. Воловик, Э. В. Макаров. – Ростов-на-Дону : Эверест, 1998. – С. 8–17.
8. **Юхименко Л. Н.** Перспективы использования субалина для коррекции микрофлоры кишечника и профилактики БГС / Л. Н. Юхименко, Г. С. Койдан, Л. И. Бычкова // Проблемы охраны здоровья рыб в аквакультуре. Тез. докл. научн.-практ. конф. – М. : МИК, 2000. – С. 10–13.
9. **Administration** of probiotic strain to improve sea bream wellness during development / O. Carnevali, M. C. Zamponi, R. Sulpizio et al. // Aquaculture Int. – 2004. – Vol. 12. – P. 377–386.
10. **Current** methodology for the use of probiotic bacteria in the culture of marine fish larvae / S. B. Kennedy, J. W. J. Tucker, M. Thomersen et al. // Aquaculture '98. Book of Abstracts. – 1998. – P. 286.
11. **Development** of swimming and feeding functions in larvae turbot, *Psetta maxima*, reared in the laboratory / H. Kohno, M. Moteki, K. Yosedo et al. // Turkish Journ. of Fisheries and Aquatic sciences. – 2001. – Vol. 1, N 1. – P. 9–15.
12. **Khanaichenko A. N.** Ways to improve turbot larvae rearing / A. N. Khanaichenko, Y. E. Bitjukova, N. K. Tkachenko // From Discovery to Commercialization. Abstracts of contributions presented at the Intern. Conf. World Aquaculture '93. Torremolines : EAS Spec. publ. (Spain, May 26–28, 1993). — Spain, 1993. – Vol. 19. – P. 399.
13. **Removal** of common *Fusarium* toxins *in vitro* by strains of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* / H. S. El Nezami, A. Chrevatidis, S. Auriola et al. // Food Additives and Contaminants. – 2002. – Vol. 19, N 7. – P. 680–686.
14. **Rudneva I. I.** The biochemical effects of toxicants in developing eggs and larvae of Black Sea fish species // Marine Environ. Res. – 1998. – Vol. 46, N 1–5. – P. 499–500.
15. **Stein T.** *Bacillus subtilis* antibiotics: Structures, syntheses and specific functions // Molecular Microbiology. – 2005. – Vol. 56, N 4. – P. 845–857.
16. **Use** of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) / M. Lara-Flores, M. A. Olvera-Novoa, B. E. Guzman-Mendez et al. // Aquaculture. – 2003. – Vol. 2 – P. 193–201.
17. **Westernhagen H.** Sublethal effects of pollutants on fish eggs and larvae // Fish Physiol. – 1998. – Vol. 11. – P. 253–346.

Надійшла до редколегії 19.01.2011

УДК 616.94:617(471.34)

О. Р. Бекташева, К. В. Лаврентьева, Н. В. Черевач, А. И. Винников, А. А. Москаленко

*Дніпропетровський національний університет ім. Олесь Гончара
Дніпродзержинська міська лікарня № 7*

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ СЕМЕЙСТВА ENTEROBACTERIACEAE – ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГНОЙНО-СЕПТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У ДЕТЕЙ

Досліджено біологічні властивості 27 штамів бактерій родини Enterobacteriaceae, виділених при гнійно-септичній інфекції у 24 пацієнтів дитячого хірургічного відділення міської лікарні № 7 (м. Дніпродзержинськ). Досліджена мікрофлора представлена чотирма видами бактерій: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxytoca* та *K. pneumoniae*. Найпоширеніший збудник гнійно-септичних захворювань у дітей – кишкова паличка. Виділені бактерії виявилися найчутливішими до фторхінолонів II покоління (офлоксацин і ципрофлоксацин) та цефалоспоринів III покоління (цефотаксим і цефоперазон).

А. Р. Бекташева, Е. В. Лаврентьева, Н. В. Черевач, А. И. Винников, А. А. Москаленко

*Днепрпетровский национальный университет им. Олесь Гончара
Днепродзержинская городская больница № 7*

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ СЕМЕЙСТВА ENTEROBACTERIACEAE – ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГНОЙНО-СЕПТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У ДЕТЕЙ

Исследованы биологические свойства 27 штаммов бактерий семейства Enterobacteriaceae, выделенных при гнойно-септической инфекции у 24 пациентов отделения детской хирургии городской больницы № 7 (г. Днепродзержинск). Исследованная микрофлора представлена четырьмя видами бактерий: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxytoca* и *K. pneumoniae*. Самый распространенный возбудитель гнойно-септических заболеваний у детей – кишечная палочка. Наибольшую чувствительность выделенные бактерии проявили к фторхинолонам II поколения (офлоксацин и ципрофлоксацин) и к цефалоспорином III поколения (цефотаксим и цефоперазон).

O. R. Bektasheva, K. V. Lavrentyeva, N. V. Cherevach, A. I. Vinnikov, A. A. Moskalenko

*Oles' Honchar Dnipropetrovsk National University
Dniprodzerzhinsk Hospital № 7*

BIOLOGICAL PROPERTIES OF ENTEROBACTERIACEAE STRAINS AS AGENTS OF SUPPURATIVE-SEPTIC INFECTION IN CHILDREN

It was investigated the biological properties of 27 strains of Enterobacteriaceae isolated from 24 children with suppurative-septic infection from the Surgical Department of Dnieprodzerzhinsk Hospital № 7. Isolated microflora was presented by four bacteria species: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxytoca* and *K. pneumoniae*. *Escherichia coli* was the most widespread agent of suppurative-septic

infection for children. All bacteria were the most sensitive to fluoroquinolones II generation (norfloxacin and ciprofloxacin) and cephalosporins III generation (cefotaxim and cefoperazon).

Вступ

Гнійно-септичні захворювання мають інфекційну природу, бо викликаються різними збудниками: грампозитивними та грамнегативними, аеробними та анаеробними, споротвірними та неспоротвірними формами мікроорганізмів, серед яких найпоширеніші бактерії родів *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* та *Clostridium* [5].

Запальний процес викликає серйозні зміни в організмі, порушення функції різних органів і систем. За певних умов запальний процес може бути викликаний умовно-патогенними мікроорганізмами. Вони можуть проникати до ран у зону ураження тканин із навколишнього середовища (екзогенне інфікування) або з вогнищ скупчення мікрофлори в самому організмі людини (ендогенне інфікування) [1]. У першому випадку подальше розповсюдження та розвиток запального процесу встановлюється співвідношенням кількості та вірулентності прониклих мікробів з імунологічними силами організму [7].

Основними класами антибіотиків, що використовуються при лікуванні гнійно-септичної інфекції, викликаній родиною Enterobacteriaceae, є бета-лактами, фторхінолони, аміноглікозиди. Більшість ентеробактерій стійкі до пеніцилінів (ампіцилін, амоксицилін) і менше – до цефалоспоринів I та II покоління (цефазолін, цефуроксим). Найефективнішими вважаються цефалоспоринові IV покоління (цефепім) та карбопеніми (іміпенем). Ефективна дія останніх забезпечується відносною стабільністю до дії AmpC бета-лактамаз [7; 9; 10].

Актуальність проблеми гнійно-септичних захворювань у наш час визначається декількома причинами: значною частотою захворювання, високою летальністю і, як наслідок, значним економічним збитком, заподіяним захворюванням.

У зв'язку з цим мета роботи – охарактеризувати біологічні властивості штамів бактерій родини Enterobacteriaceae, виділених із патологічного матеріалу від 24 пацієнтів дитячого хірургічного відділення Дніпродзержинської міської лікарні № 7, визначити їх чутливість до антибіотиків різних фармакологічних груп.

Матеріал і методи досліджень

Для виділення та вивчення ентеробактерій – збудників інфекційних захворювань у пацієнтів дитячого хірургічного відділення Дніпродзержинської клінічної лікарні № 7 здійснювали забір клінічного матеріалу під час пункції місцевих абсцесів або під час інших хірургічних процедур [2] і висів на елективне середовище Ендо. Надалі, згідно з Наказом МОЗ № 234 від 10.05.2007 р., проводили мікроскопію забарвлених за Грамом мазків із вирощених колоній, визначали рухливість бактерій і робили пересів колоній штрихом по скошеній частині та уколом у стовпчик середовища Олькеницького. Одночасно ставили додаткові тести для визначення родової належності штамів (ріст на цитраті Симонса, розщеплення сечовини за Крістенсенем, тест із метиловим червоним). Видову ідентифікацію штамів проводили за допомогою мінімального диференціального ряду тестів: виділення індолу та синтез лізиндекарбоксілази [4]. Чутливість до антибіотиків визначали диско-дифузійним методом [3].

Результати та їх обговорення

Мікробіологічне дослідження матеріалу, відібраного при гнійно-септичній інфекції у дітей, проведене на базі бактеріологічної лабораторії Дніпродзержинської міської

лікарні № 7. Від 24 пацієнтів виділено 27 штамів бактерій, які за комплексом культуральних і фізіолого-біохімічних ознак віднесено до родини Enterobacteriaceae. Всі виділені штами на середовищі Ендо утворювали опуклі, із правильними краями, опалесцювальні, іноді слизові, забарвлені в червоний колір із металевим блиском або без нього колонії діаметром 1–2 мм; на комбінованому середовищі Олькеницького утилізували лактозу та глюкозу з утворенням газу або без нього, не розщеплювали сечовини та не утворювали сірководню. При мікроскопії мазків клітини мали вигляд прямих тонких паличок, забарвлених за Грамом негативно.

Родову ідентифікацію проводили за допомогою додаткових тестів: рухливості, здатності рости у середовищі Симонса, утворювати індол, давати реакцію у середовищі з метиловим червоним (табл. 1). Вісім штамів, які не були рухливими, віднесли до роду *Klebsiella*. 16 із 19 штамів, що характеризувались рухливістю, не використовували цитрат як єдине джерело вуглецю при рості у середовищі з цитратом натрію, мали здатність утворювати індол, були позитивні за тестом із метиловим червоним – віднесли до роду *Escherichia* виду *E. coli* (оскільки рід представлений єдиним видом). Інші 3 штами, які були рухливими, але використовували цитрат як єдине джерело вуглецю при рості у середовищі Симонса, не виділяли індолу, давали негативний тест із метиловим червоним, віднесено до роду *Enterobacter*.

Таблиця 1

Родова ідентифікація представників родини Enterobacteriaceae

Тест	Рід <i>Escherichia</i> (<i>E. coli</i>) 16 штамів	Рід <i>Klebsiella</i>		Рід <i>Enterobacter</i> 3 штами
		<i>K. oxytoca</i> 3 штами	<i>K. pneumoniae</i> 5 штамів	
За результатами посіву на комбіноване середовище Олькеницького				
– утилізація лактози	+	+		+
– утилізація глюкози (газоутворення)	+	+		+
– виділення сірководню	–	–		–
– розщеплення сечовини	–	–		–
Рухливість	+	–		+
Ріст на середовищі Симонса	–		+	+
Сечовина за Крістенсенем	–		+	+/-
Виділення індолу	+	–	+	–
Тест із метиловим червоним	+	-/+	-/+	–

Примітки: «-» – негативна реакція; «+» – позитивна реакція; «+/-» – частіше позитивна, ніж негативна реакція; «-/+» – частіше негативна, ніж позитивна реакція.

Для видової ідентифікації родів *Enterobacter* та *Klebsiella* використовували додаткові тести: утворення лізиндекарбоксілази – для ентеробактера та виділення індолу – для клебсієл. У клінічній практиці рід *Enterobacter* найчастіше представлений двома видами (*E. aerogenes* і *E. cloacae*), які відрізняються здатністю декарбоксілювати L-лізин. У нашому дослідженні для всіх трьох штамів при рості у середовищі з цією амінокислотою спостерігали зміну кольору останнього із зеленого на синій за рахунок накопичення лужних продуктів, що засвідчувало утворення культурами ферменту лізиндекарбоксілази. На основі результатів даного тесту всі штами роду *Enterobacter* віднесено до виду *E. aerogenes*.

В етіології гнійно-септичних захворювань, викликаних бактеріями роду *Klebsiella*, провідними є види *K. oxytoca* та *K. pneumoniae*. Тому для видової ідентифікації клебсієл використовували тест на утворення індолу. На основі результатів да-

татів даного тесту з виділених 8 штамів клебсієл три штами, що утворювали індол, віднесено до *K. oxytoca*, інші 5, що не утворювали – до *K. pneumoniae*.

Таким чином, вся грамнегативна мікрофлора, виділена при гнійно-септичних інфекціях у пацієнтів дитячого хірургічного відділення міської клінічної лікарні № 7 м. Дніпродзержинськ, представлена чотирма видами бактерій: *E. coli*, *E. aerogenes*, *K. oxytoca* та *K. pneumoniae*.

Важливим етапом при лікуванні інфекцій, викликаних бактеріями родини Enterobacteriaceae, є встановлення чутливості цих мікроорганізмів до найпоширеніших у практиці антибіотиків: цефалоспоринів, аміноглікозидів, тетрациклінів, амфеніколів і антибактеріальних препаратів групи фторхінолонів. Тому для дослідження антибіотикочутливості виділених штамів бактерій використано антибіотичні препарати різних фармакологічних груп: цефалоспоринового ряду I покоління (цефазолін, цефалексин), III покоління (цефотаксим, цефтріаксон, цефтазидим), аміноглікозидового ряду (амікацин, гентаміцин), β-лактами (ампіцилін) і фторхінолони (норфлорксацин, ципрофлоксацин) (табл. 2–4).

Таблиця 2

Визначення чутливості до антибактеріальних препаратів штамів *Escherichia coli*

Фармакологічна група		Чутливі штами, %	Помірно чутливі штами, %	Резистентні штами, %
Цефалоспори́ни	цефазолін	25,0	33,3	41,7
	цефалексин	40,0	20,0	40,0
	цефотаксим	40,0	30,0	30,0
	цефтазидим	30,0	20,0	50,0
	цефтріаксон	50,0	25,0	25,0
Фторхіноло́ни	норфлорксацин	66,7	26,7	6,6
	ципрофлоксацин	87,6	6,2	6,2
Аміноглікози́ди	амікацин	100,0	0,0	0,0
	гентаміцин	50,0	7,2	42,8
β-лакта́ми	ампіцилін	25,0	25,0	50,0

Половина штамів *E. coli*, виділених із клінічного матеріалу, мали значну стійкість до ампіциліну та цефтазидиму (див. табл. 2). Найактивнішими відносно кишкової палички виявилися антибактеріальні препарати фторхінолонової групи – ципрофлоксацин, норфлорксацин і аміноглікозид амікацин. До цих препаратів чутливі 66,7, 87,5 і 100,0 % штамів відповідно.

Вужчим діапазоном антибіотикостійкості характеризувалися бактерії роду *Klebsiella* (див. табл. 3). Із десяти перевірених антибіотиків лише до одного (ампіциліну) були стійкими більшість досліджених штамів *K. oxytoca* (66,7 %). До інших препаратів мікроорганізми цього виду високочутливі: препарати цефалоспоринового ряду – цефазолін і цефтазидим пригнічували ріст штамів *K. oxytoca* у 66,7 %, а цефотаксим і цефтріаксон – навіть у 100,0 % випадків. Препарати груп фторхінолонів (норфлорксацин, ципрофлоксацин) та аміноглікози́ди (амікацин, гентаміцин) однаково ефективні відносно 66,7 % штамів.

Штами *K. pneumoniae* проявляли стійкість до ампіциліну та цефазоліну (відповідно у 66,7 та 60,0 % випадків), поряд із цим характеризувалися високою чутливістю до гентаміцину (80,0 % штамів), цефтріаксону (80,0 %) та препаратів фторхінолонової групи: ципрофлоксацину (100,0 %) і норфлорксацину (80,0 %).

Що стосується *E. aerogenes*, то 66,7 % штамів цього виду були стійкими до ампіциліну (див. табл. 4). Проте 100,0 % штамів *E. aerogenes* були чутливими до цефа-

лоспоринів (цефотаксиму та цефтріаксону) і фторхінолонів (норфлоксацину та ципрофлоксацину). Відносно високу чутливість *E. aerogenes* проявляли і до інших цефалоспоринів (цефазоліну, цефтазидиму). Обидва антибіотики подавляли ріст культур у 66,7 %.

Таблиця 3

Визначення чутливості до антибактеріальних препаратів штамів бактерій роду *Klebsiella*

Фармакологічна група		<i>K. pneumoniae</i>			<i>K. oxytoca</i>		
		чутливі штамми, %	помірно чутливі штамми, %	резистентні штамми, %	чутливі штамми, %	помірно чутливі штамми, %	резистентні штамми, %
Цефалоспорины	цефазолін	40,0	0,0	60,0	66,6	33,3	0,0
	цефалексин	33,3	33,3	33,3	33,3	66,7	0,0
	цефотаксим	33,3	66,7	0,0	100,0	0,0	0,0
	цефтазидим	40,0	40,0	20,0	66,7	0,0	33,3
	цефтріаксон	80,0	0,0	20,0	100,0	0,0	0,0
Фторхінолони	норфлоксацин	80,0	20,0	0,0	66,7	0,0	33,3
	ципрофлоксацин	100,0	0,0	0,0	66,7	0,0	33,3
Аміноглікозиди	амікацин	80,0	0,0	20,0	66,7	0,0	33,3
	гентаміцин	80,0	0,0	20,0	66,7	0,0	33,3
β-лактами	ампіцилін	0,0	33,3	66,7	33,3	0,0	66,7

Таблиця 4

Визначення чутливості до антибактеріальних препаратів штамів *Enterobacter aerogenes*

Фармакологічна група		Чутливі штамми, %	Помірно чутливі штамми, %	Резистентні штамми, %
Цефалоспорины	цефазолін	25,0	33,3	41,6
	цефалексин	40,0	20,0	40,0
	цефотаксим	40,0	30,0	30,0
	цефтазидим	30,0	20,0	50,0
	цефтріаксон	50,0	25,0	25,0
Фторхінолони	норфлоксацин	66,6	26,6	6,6
	ципрофлоксацин	87,5	6,2	6,2
Аміноглікозиди	амікацин	100,0	0,0	0,0
	гентаміцин	50,0	7,1	42,8
β-лактами	ампіцилін	25,0	25,0	50,0

Таким чином, універсальними препаратами для терапії гнійно-септичної інфекції у дітей виявилися цефалоспорины III покоління (цефотаксим і цефоперазон) і фторхінолони II покоління (офлоксацин і ципрофлоксацин). Хоча останні і не рекомендують призначати дітям і підліткам, але клінічний досвід і спеціальні дослідження не підтвердили ризик виникнення ускладнень і побічних ефектів при лікуванні дітей даними антибіотиками. Крім того, ці препарати ефективні при виникненні захворювань, викликаних полірезистентними штамми бактерій [5; 6; 8].

Висновки

Виділено 27 штамів бактерій родини Enterobacteriaceae від 24 пацієнтів дитячого хірургічного відділення міської клінічної лікарні № 7 (м. Дніпродзержинськ). Вся досліджена мікрофлора представлена чотирма видами бактерій: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxytoca* та *K. pneumoniae*. Найпоширенішим збудником гнійно-септичної інфекції у дітей – пацієнтів хірургічного відділення міської клінічної лікарні № 7 (м. Дніпродзержинськ) є кишкова паличка. Серед протестованих ан-

тибактеріальних препаратів найефективнішими відносно всіх бактеріальних видів виявилися цефалоспорини III покоління (цефотаксим і цефоперазон) і фторхінолони II покоління (ципрофлоксацин і норфлоксацин), тому їх можна рекомендувати для терапії гнійно-септичної інфекції у дітей.

Бібліографічні посилання

1. **Зубков М. Н.** Современная таксономия и номенклатура облигатно-анаэробных бактерий, выделенных от человека // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2005. – Т. 7, № 4. – С. 312–319.
2. **Методические** указания по микробиологической диагностике заболеваний, вызванных энтеробактериями. – М. : МГУ, 1984. – 18 с.
3. **Наказ** МОЗ України «Про затвердження методичних вказівок «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів» від 05.04.2007 р. № 167. – 43 с.
4. **Наказ** МОЗ України «Про організацію профілактики внутрішньолікарняних інфекцій в акушерських стаціонарах» від 10.05.2007 р. № 234.
5. **Поздеев О. К.** Медицинская микробиология / О. К. Поздеев, В. И. Покровский. – М. : ГЕОТАР-МЕД, 2001. – 656 с.
6. **Clinical** experience of serious infections caused by Enterobacteriaceae producing VIM-1 metallo-beta-lactamase in a Greek University Hospital / M. Souli, F. V. Kontopidou, E. Papadomichelakis et al. // Clin. Infect. Dis. – 2008. – Vol. 46, N 6. – P. 847–854.
7. **Effects** of inoculum and beta-lactamase activity in AmpC- and extended-spectrum beta-lactamase (SBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates tested by using NCCLS ESBL methodology / A. M. Queenan, B. Foleno, C. Gownley et al. // J. Clin. Microbiol. – 2004. – Vol. 42. – P. 269–275.
8. **Elston D. M.** Epidemiology and prevention of skin and soft tissue infections // Cutis. – 2004. – Vol. 73, N 5. – P. 3–7.
9. **Ertapenem** resistance among *Klebsiella* and *Enterobacter* submitted in the UK to a reference laboratory / N. Woodford, J. W. Dallow, R. L. Hill et al. // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2007. – Vol. 29, N 4. – P. 456–459.
10. **Paterson D. L.** Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae // Am. J. Med. – 2006. – Vol. 119, N 6. – P. 62–70.

Надійшла до редколегії 24.11.2010

УДК 546.719:577.151.4

Ю. С. Воронкова, Н. І. Штеменко

Дніпропетровський національний університет ім. Олесь Гончара

ВПЛИВ КЛАСТЕРНИХ СПОЛУК РЕНІЮ З ОРГАНІЧНИМИ ЛІГАНДАМИ НА АКТИВНІСТЬ ГЛЮКОЗООКСИДАЗИ

Досліджено вплив кластерних сполук ренію на активність глюкозооксидази *in vitro*. Показано залежність інтенсивності взаємодії кластерних сполук ренію з білками від концентрації та структури сполуки. Кластерні сполуки ренію з органічними лігандами безпосередньо взаємодіють із білковими молекулами: активність глюкозооксидази достовірно змінюється на 4–24 %. Кластерна сполука ренію з ГАМК як ліганду знижує активність глюкозооксидази, а сполуки ренію з гідрофобними радикалами як лігандами здатні підвищувати активність ферментів, що свідчить про різні механізми взаємодії кластерних сполук ренію з ферментами.

Ю. С. Воронкова, Н. И. Штеменко

Днепрпетровский национальный университет им. Олесь Гончара

ВЛИЯНИЕ КЛАСТЕРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ РЕНИЯ С ОРГАНИЧЕСКИМИ ЛИГАНДАМИ НА АКТИВНОСТЬ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ

Исследовано влияние кластерных соединений рения на активность глюкозооксидазы *in vitro*. Установлена способность исследуемых соединений рения оказывать влияние на активность оксидазы в зависимости от структуры соединения и времени инкубации: активность глюкозооксидазы изменяется на 4–24 %. Кластерное соединение рения с ГАМК в качестве лиганда снижает активность глюкозооксидазы, а соединения рения с гидрофобными радикалами в качестве лигандов способны повышать активность, что свидетельствует о разных механизмах взаимодействия кластерных соединений рения с ферментами.

Y. S. Voronkova, N. I. Shtemenko

Oles' Honchar Dnipropetrovsk National University

INFLUENCE OF CLUSTER RHENIUM COMPOUNDS WITH ORGANIC LIGANDS ON ACTIVITY OF GLUCOSE OXIDASE

Influence of cluster rhenium compounds with different ligands on the activity of glucose oxidase was studied. Ability of the rhenium compounds to influence on the enzyme's activity was ascertained. It is depended on the compound structure and the time of incubation: activity of the glucose oxidase changed by 4–24 %. The cluster compound with GABA ligand reduced the enzymatic activity, but compounds with hydrophobic ligands increased the activity of glucose oxidase. Different mechanisms of the cluster rhenium compound–enzyme interactions are suspected.

Вступ

Дослідження взаємодії металоорганічних сполук із ферментами має значний практичний і теоретичний інтерес, оскільки торкається таких важливих аспектів протео-

міки як транспорт, токсичність, механізм дії, індукція або гальмування активності та інші питання, пов'язані з упровадженням лікарських препаратів, розроблених на основі сполук металів [2; 15–17; 19; 20; 22–23].

У наших попередніх працях в експериментах *in vivo* та *in vitro* показано, що кластерні сполуки ренію з органічними лігандами виявляють протипухлинну, антигемолітичну та антирадикальну дію та є біохімічними модуляторами цисплатину, тобто посилюють його дію з одночасним зниженням токсичності [1; 10; 24–27]. Показано здатність кластерних сполук ренію впливати на взаємодію антиген – антитіло [8; 9; 24] та на активність фосфатаз [3]. Проте механізм взаємодії сполук ренію з найважливішими біополімерами живої клітини – білками вивчено недостатньо. Особливо цікавим питанням є можливий безпосередній вплив кластерів ренію на систему оксидаз. Отже, мета цієї роботи – з'ясувати вплив кластерних сполук ренію різної структури на активність глюкозооксидази.

Матеріал і методи досліджень

Досліджували такі сполуки ренію: $Re_2(CH_3COO)_2Cl_4 \cdot 2H_2O$ – Re1 – бісакватетрахлориди- μ -ацетатодиреній (III); $Re_2(i-C_3H_7COO)_4Cl_2$ – Re2 – дихлоротетра- μ -ізутиратодиреній (III); цис- $[Re_2(GABA)_2Cl_3]Cl \cdot H_2O$ – Re3 – цис-тетрахлориди- μ - γ -амінобутиратодиреній (III) хлорид, які готували в Українському державному хіміко-технологічному університеті на кафедрі неорганічної хімії [8; 11; 25; 26].

Об'єкт для проведення дослідження – двокомпонентна ферментна система – глюкозооксидаза-пероксидаза [6; 14], яка складається з розчинів ензимів: пероксидази та β -глюкозооксидази. Зміни активності оксидази від часу інкубування досліджували, використовуючи метод визначення глюкози у біологічних рідинах глюкозооксидазним методом, який базується на тому, що глюкоза за присутності глюкозооксидази окиснюється киснем повітря до глюконової кислоти та перекису водню, який за присутності пероксидази реагує з фенолом та 4-амінофеназином з утворенням хіноніміну червоно-фіолетового забарвлення; останній визначається фотометрично при довжині хвилі 540 нм [5]. Для проведення дослідження готували водні розчини сполук ренію Re1, Re2 та Re3 у діапазоні концентрацій від 10^{-6} до 10^{-10} . Досліди проводили після попередньої інкубації сполук ренію з оксидазою (+37 °C). Для кожної концентрації проводили чотири серії вимірювань, які розрізнялися за часом інкубації оксидази з кожним комплексом ренію: у пробірці першої серії глюкозу додавали через 10 хвилин, другої – через годину, третьої – через 2 години, четвертої – через 3 години після додавання досліджуваних комплексів. Активність ферментативних реакцій вимірювали протягом хвилини. Через хвилину додавали до робочого розчину 0,02 мл 10 мМ глюкози.

Як контроль використовували розчин глюкози, який не містив кластерних сполук ренію з органічними лігандами. Статистичну обробку результатів проводили, використовуючи *t*-критерій Стьюдента. Вірогідним вважали результат, якщо $p < 0,05$ [13].

Результати та їх обговорення

Кластерні сполуки ренію з органічними лігандами впливають на активність глюкозооксидази (табл. 1). Існує залежність активації ферментної системи від часу інкубації зі сполуками ренію. У цьому відношенні між реній-ацетатними (Re1) та реній-ізутиратними (Re2) сполуками можна відмітити значну подібність у активації досліджуваної оксидази: відбувається зростання показника, що вивчається, до часу інкубації 2 години, а після 3 годин інкубації відмічали зниження активності при застосуванні комплексу Re1 в концентрації 10^{-6} до значень, менших за контрольний показник.

Для системи Re2 також виявлено подібну залежність, однак навіть після 3 годин інкубації активність системи залишається вищою за показник контролю на 4–9 %.

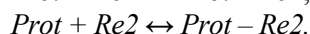
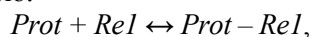
Таблиця 1

Активність глюкозооксидази при інкубації з досліджуваними комплексами ренію (моль/л)

Час інкубації, години	Контроль	Re1			Re2			Re3		
		10 ⁻⁶	10 ⁻⁸	10 ⁻¹⁰	10 ⁻⁶	10 ⁻⁸	10 ⁻¹⁰	10 ⁻⁶	10 ⁻⁸	10 ⁻¹⁰
0,15	0,085 ± 0,004	0,082 ± 0,004	0,102 ± 0,005	0,088 ± 0,004	0,092 ± 0,005	0,096* ± 0,005	0,091 ± 0,005	0,056 ± 0,003	0,041 ± 0,002	0,064 ± 0,003
1	0,085 ± 0,004	0,091 ± 0,005	0,106* ± 0,005	0,098* ± 0,005	0,091 ± 0,005	0,094 ± 0,005	0,092 ± 0,005	0,067* ± 0,003	0,045* ± 0,003	0,068* ± 0,003
2	0,085 ± 0,004	0,089 ± 0,003	0,102* ± 0,005	0,091 ± 0,005	0,088 ± 0,004	0,094 ± 0,005	0,090 ± 0,005	0,050 ± 0,002	0,052* ± 0,003	0,053* ± 0,003
3	0,085 ± 0,004	0,082 ± 0,004	0,088 ± 0,004	0,086 ± 0,004	0,090 ± 0,005	0,093 ± 0,005	0,089 ± 0,003	0,044* ± 0,002	0,051* ± 0,003	0,061 ± 0,003

Примітка: * – порівняно з контролем $p < 0,05$ ($n = 8$).

Отримані дані свідчать про зворотний механізм зв'язування кластерних сполук ренію з білками системи: спочатку утворюється щільніший комплекс білок – Re1 та білок – Re2. Але реакція має зворотній механізм, тобто реакція між білками (Prot) та сполуками ренію є рівноважною:



Із часом відбувається гідроліз сполук ренію Re1 та Re2 [11], отже рівновага зсувається у бік вільного ферменту. При концентрації сполук ренію 10⁻⁶ сполуки ренію Re1 та Re2 майже не впливають на активність глюкозооксидази порівняно з контролем (рис. 1); активність зростає на 4–7 % для Re1 після одно- та двогодинної інкубації та на 3–8 % для Re2, а Re3 знижує активність оксидази удвічі порівняно з контролем.

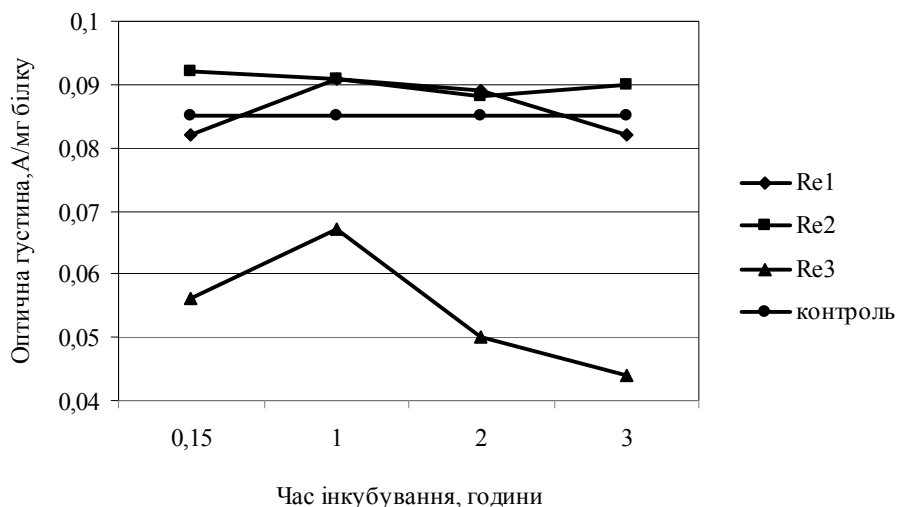


Рис. 1. Активність глюкозооксидази при інкубації зі сполуками ренію в 10⁻⁶ М розчинах

При дослідженні сполук ренію при концентрації 10⁻⁸ відмічено (рис. 2), що активувальний вплив належить комплексу ренію Re1: після однієї години інкубації його активність зростає на 24 %, а вже після трьох годин відбувається зниження показників до рівня контролю, що може бути пояснено зворотним зв'язуванням комплексу з ак-

тивним центром глюкозооксидази, в якому розташовані залишки гістидину [12; 21]. Для Re2 показано незначне збільшення активності (на 12 %) після 15 хвилин інкубації та поступове зниження активності (на 9 %) порівняно з контролем. При дослідженні Re3 показано, що з часом інкубації активність зростає, що може бути доказом незворотного зв'язування комплексу ренію з молекулою білка.

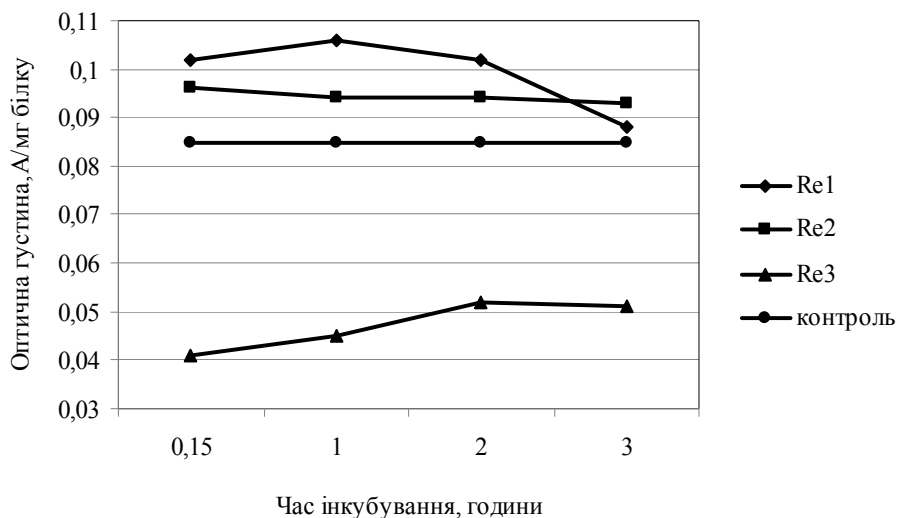


Рис. 2. Активність глюкозооксидази при інкубації зі сполуками ренію в 10^{-8} М розчинах

Активність глюкозооксидази залежно від часу інкубації та концентрації 10^{-10} М комплексів Re1 та Re2 також практично не змінюється порівняно з контролем (рис. 3). Відмічене збільшення активності для Re1 після одно- та двогодинної інкубації на 7–15 % порівняно з контролем, але вже після трьох годин показник сягає значень контролю. Ідентичну картину відмічено і для Re2: після однієї години інкубації зареєстроване збільшення на 8 % порівняно з контролем, а після трьох годин показник досяг значень контролю. Все це підтверджує припущення щодо механізму взаємодії кластерних сполук ренію з органічними лігандами білками.

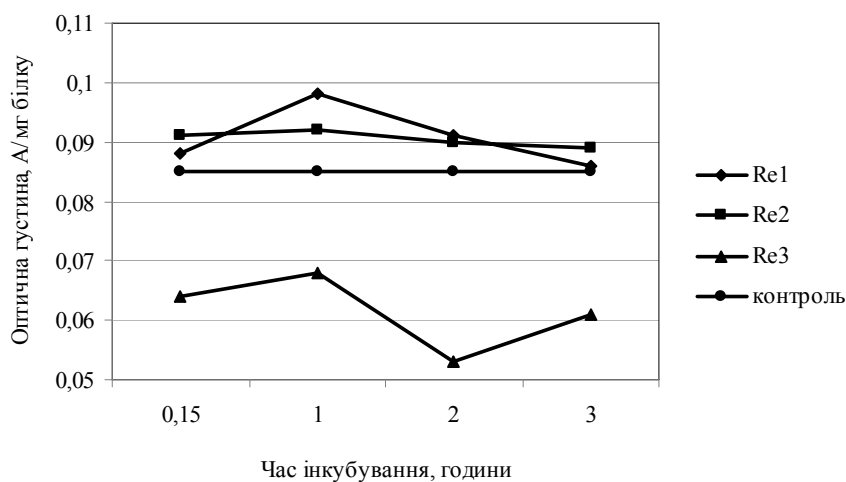


Рис. 3. Активність глюкозооксидази при інкубації зі сполуками ренію в 10^{-10} М розчинах

Активувальна дія пригнічується разом із ліпофільністю радикала. В усіх випробуваних концентраціях комплексів (окрім Re3) максимальну активність спостерігали після одноденної інкубації (7–24 %). Після дво- та триденної інкубації активація ферментів зменшувалася: для Re1 зменшення зареєстроване для всіх концентрацій, для Re2 – для концентрацій 10^{-8} та 10^{-10} моль/л, для Re3 – в усіх досліджуваних концентраціях відмічене зниження активності майже удвічі порівняно з контролем.

Проаналізувавши залежність впливу Re3 на активність системи досліджуваних ферментів, можна сказати, що ця реакція практично незворотна. Оскільки в Re1 та Re2 лігандів, що оточують кластерний фрагмент, є гідрофобні радикали, можна припустити, що ці сполуки реагують із гідрофобними залишками амінокислот, що значно не впливає на конформацію активного центру оксидоредуктаз та їх активність. На відміну від Re1 та Re2, Re3 має позитивно заряджений радикал ГАМК. Ця кластерна сполука може реагувати з іоногенними амінокислотами, розташованими в активному центрі глюкозооксидази (залишки гістидину) [12; 21] та амінокислотами, розташованими в активному центрі пероксидази (гістидин і аргінін) [4; 13; 18]; або зв'язується з іоногенними амінокислотами глобули ферментів шляхом утворення іонних зв'язків, що, на відміну від гідрофобних взаємодій, значно змінює конформацію білків і негативно впливає на активні центри ферментів.

Висновки

Кластерні сполуки ренію з органічними лігандами безпосередньо взаємодіють із білковими молекулами системи глюкозооксидази. Активність глюкозооксидази достовірно змінюється на 4–24 %. Кластерна сполука ренію Re3 знижує активність глюкозооксидази, а сполуки ренію Re1 та Re2 з гідрофобними радикалами здатні підвищувати активність ферментів, що свідчить про різні механізми взаємодії кластерних сполук ренію з ферментами.

Бібліографічні посилання

1. **Антиокислювальна** активність біядерних комплексів ренію в експерименті *in vitro* / І. В. Пирожкова-Паталах, Н. І. Штеменко, О. А. Лихолат, І. І. Паталах // Питання біоіндикації та екології. – 2001. – Вип. 6, № 1. – С. 61–67.
2. **Взаємодіє** белков с соединениями платины и палладия, обладающими различной биологической активностью / Е. Н. Жмарева, Г. Д. Зегжда, Г. Б. Касьян, О. А. Ливенская // Укр. биохим. журн. – 1996. – Т. 68, № 3. – С. 74–79.
3. **Вплив** комплексних сполук диренію (III) на каталітичну активність фосфатаз / О. В. Берзєніна, Н. І. Штеменко, Ю. С. Воронкова та ін. // Вопросы химии и химической технологии. – 2007. – № 6. – С. 40–44.
4. **Газарян И. Г.** Особенности структуры и механизма действия пероксидаз растений / И. Г. Газарян, Д. М. Хушпульян, В. И. Тишков // Успехи биологической химии. – 2006. – Т. 46. – С. 303–322.
5. **Горячковский А. М.** Пособие по клинической биохимии. – Одесса : ОКФА, 1994. – С. 255–258.
6. **Гульий М. Ф.** Фермент глюкозооксидаза и его применение. – К. : Наука, 1964. – 278 с.
7. **Дослідження** впливу кластерних сполук ренію на взаємодію антиген – антитіло методом імунодифузії за Ухтерлоні / Н. І. Штеменко, А. В. Штеменко, М. В. Горіла, Л. М. Александрова // Вісник Дніпропетр. ун-ту. Біологія. Екологія. – 2002. – Вип. 10, т. 2. – С. 100–104.
8. **Єгорова Д. Є.** Взаємодія біядерних кластерів ренію (III) з фосфоліпідами та вищими карбоновими кислотами за формування мікрокапсул. Автореф. дис. ... канд. хім. наук; Держ. хім.-тех. ун-т. – Д., 2010. – 18 с.

9. **Закономірності** взаємодії антиген – антитіло у розчинах кластерних сполук ренію та цисплатину / М. В. Горіла, Т. М. Полішко, А. М. Аношко та ін. // Вісник Дніпропетр. ун-ту. Біологія. Екологія. – 2009. – Вип. 17, т. 2. – С. 37–40.
10. **Изучение** влияния комплексов рения с органическими лигандами на кислотною резистентность эритроцитов человека / Н. И. Штеменко, И. В. Пирожкова-Паталах, А. В. Штеменко, А. А. Голиченко // Укр. биохим. журн. – 2000. – Т. 72, № 3. – С. 77–81.
11. **Изучение** процессов гидролиза биядерных кластерных соединений рения (*III*) различных структурных типов / Д. Е. Егорова, О. В. Берзенина, В. Г. Столяренко, А. В. Штеменко // Вопросы химии и химической технологии. – 2008. – № 1. – С. 27–31.
12. **Минаев Б. Ф.** Модели электронного строения флавопротеидов и механизм действия оксидаз / Б. Ф. Минаев, В. А. Минаева, В. Н. Лещенко // Биополимеры і клітина. – 2004. – Т. 20, № 3. – С. 224–232.
13. **Лакин Г. Ф.** Биометрия. – М. : Высшая школа, 1990. – 352 с.
14. **Рогожин В. В.** Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов. – СПб : ГИОРД, 2004. – 240 с.
15. **A thermodynamic** study on the binding of human serum albumin with new synthesized anticancer *Pd (II)* complex / G. R. Behbehani, A. Divsalar, A. A. Saboury et al. // Journal of Solution Chemistry. – 2008. – Vol. 37, N 12. – P. 1785–1794.
16. **Clarke M. J.** Ruthenium metallopharmaceuticals // Coordination Chemistry Reviews. – 2003. – Vol. 236. – P. 209–233.
17. **Effects** of human serum albumin in some biological properties of Rhodium (*II*) complexes / B. P. Esposito, E. de Oliveira, S. B. Zyngier et al. // J. Braz. Chem. Soc. – 2000. – Vol. 11, N 5. – P. 447–452.
18. **Howard R. A.** The interaction of Rhodium (*II*) carboxylates with enzymes / R. A. Howard, T. G. Spring, J. L. Bear // Cancer Research. – 1976. – Vol. 36. – P. 4402–4405.
19. **Jones C. J.** Medicinal applications of coordination chemistry / C. J. Jones, J. R. Thornback. – Cambridge, UK : RSC Publishing, 2007. – 353 p.
20. **Keppler B. K.** Anti-tumor properties of metal complexes / B. K. Keppler, E. A. Vogel // Handbook of Metal-Ligand Interactions in Biological Fluids – Bioinorganic Medicine. – 1995. – Vol. 2, p. 3. – P. 1200–1229.
21. **Prabhakar R.** A theoretical study of the dioxygen activation by glucose oxidase / R. Prabhakar, P. Siegbahn, B. F. Minaev // Biochem. Biophys. Acta. Bioenergetics. – 2003. – Vol. 1647. – P. 173–178.
22. **Reedijk J.** Medicinal application of heavy metal compounds // Curr. Opin. Chem. Biol. – 1999. – Vol. 3. – P. 236–240.
23. **Reversible** precipitation of bovine serum albumin by metal ions and synthesis, structure and reactivity of new tetrathiomallate chelating agents / V. E. Lee, J. M. Schulman, E. I. Stiefel et al. // Journal of Inorganic Biochemistry. – 2007. – Vol. 101. – P. 1707–1718.
24. **Shtemenko N. I.** Interaction of Rhenium cluster compounds with human blood proteins / N. I. Shtemenko, M. V. Gorelaya, L. M. Alexandrova // Metal Ions in Biology and Medicine. – 2002. – Vol. 7. – P. 34–36.
25. **Shtemenko A. V.** Synthesis of novel tetracarboxylato dirhenium (*III*) compounds and crystal structure of them / A. V. Shtemenko, A. A. Golichenko, K. V. Domasevitch // Z. Naturforsch. – 2002. – Vol. 56b. – P. 381–385.
26. **Shtemenko N. I.** Dichlorotetra-*m*-isobutiratodirhenium (*III*): Enhancement of cisplatin action and RBC-stabilizing properties / N. I. Shtemenko, P. Collery, A. V. Shtemenko // Anticancer Research. – 2007. – Vol. 27, N 4. – P. 2487–2492.
27. **Synthesis**, characterization, *in vivo* antitumor properties of the cluster rhenium compound with GABA ligands and its synergism with cisplatin / A. V. Shtemenko, P. Collery, N. I. Shtemenko et al. // Dalton Trans. – 2009. – Vol. 26. – P. 5132–5136.

Надійшла до редакції 21.03.2011

УДК 504.5:546.48

С. О. Гунько

Дніпропетровський національний університет ім. Олесь Гончара

КАДМІЙ У ҐРУНТАХ м. ДНІПРОДЗЕРЖИНСЬК

Наведено дані щодо поширення кадмію у ґрунтах промислової, селитебної та рекреаційної частин м. Дніпродзержинськ. Згідно із класифікацією міських ґрунтів, на території міста визначено такі типи ґрунтів: власне урбаноземи, плантоземи, антропогенно-поверхнево-перетворені природні ґрунти та ристоземи. Проведено екологічну оцінку ґрунтів за вмістом кадмію, розглянуто проблему забруднення ґрунтового покриву міста як території з високим антропогенним навантаженням. У ґрунтовому покриві селитебної, промислової та рекреаційної підсистем м. Дніпродзержинськ уміст валової форми кадмію варіює в межах 0,6–10,5 мг/кг, а рухомої – 0,1–3,4 мг/кг ґрунту. Коефіцієнт варіації вмісту валової форми кадмію перебуває в межах 2–18 %, а рухомої – 5–20 %. Вміст валової форми кадмію у власне урбаноземах центру правобережжя міста перевищує ГДК удвічі, у східній, західній правого берега та лівобережній частинах м. Дніпродзержинськ перебуває в межах ГДК.

С. А. Гунько

Днепрпетровский национальный университет им. Олесь Гончара

КАДМИЙ В ПОЧВАХ г. ДНЕПРОДЗЕРЖИНСК

Приведены данные о распространении кадмия в почвах промышленной, селитебной и рекреационной частей г. Днепродзержинск. Согласно классификации городских почв, на территории города определены следующие типы почв: собственно урбаноземы, плантоземи, антропогенно-поверхностно-преобразованные природные почвы и ристоземы. Проведена экологическая оценка почв по содержанию кадмия, рассмотрена проблема загрязнения почвенного покрова города как территории с высокой антропогенной нагрузкой. В почвенном покрове селитебной, промышленной и рекреационной подсистем г. Днепродзержинск содержание валовой формы кадмия варьирует в пределах 0,6–10,5 мг/кг, а подвижной – 0,1–3,4 мг/кг почвы. Содержание кадмия в собственно урбаноземах центра правобережья города превышает ПДК вдвое, в восточной и западной правого берега и левобережной частях г. Днепродзержинск находится в пределах ПДК.

S. A. Goon'ko

Oles' Honchar Dnipropetrovsk National University

CADMIUM IN SOILS OF DNIPRODZERZHINSK

Data on cadmium distribution in the soils of industrial, residential and recreational areas of Dniprodzerzhinsk city are presented. According to the classification of urban soils the following types of soils were identified in the city: urban soil proper, plantosol, anthropogenic-surface-transformed natural soil and lawn soil. We have made the estimation of cadmium content. The problem of soils contamination in the city with high anthropogenic load is discussed. The total cadmium content in the industrial, residential and recreational soils of Dniprodzerzhinsk varies within 0.6–10.5 mg/kg, but movable forms make 0.1–3.4 mg/kg of soil. Cadmium in the urban soil proper of the right-bank city surpasses the maximum permissible concentration (MPC) twice. At the same time the soils in the left-bank area and in the eastern and western areas of the right-bank were under MPC.

Вступ

На п'ятій сесії Міжурядового форуму з хімічної безпеки, що відбулася в Будапешті у вересні 2006 року, схвалено заяву стосовно металів першого класу небезпеки (ртуть, свинець і кадмій) «Важкі метали: необхідність подальших глобальних дій?». У цьому документі зафіксовано вплив ртуті, свинцю та кадмію на навколишнє середовище та здоров'я людей у всьому світі. У ньому відмічено теперішні та майбутні міжнародні дії для зменшення ризиків, пов'язаних із надходженням ртуті, свинцю та кадмію до компонентів навколишнього середовища. Особливо відмічено роботу, що ведеться нині, програмами ЮНЕП за глобальною оцінкою кадмію та ртуті в компонентах навколишнього середовища. У документі підкреслюється необхідність дослідження впливу цих металів на здоров'я людей і стан навколишнього середовища на локальному, регіональному та глобальному рівнях із певним фокусом на потребах країн [10].

Оптимізація екологічної ситуації в Україні та окремих її регіонах, у тому числі в Дніпродзержинську, тісно пов'язана з переорієнтацією економічної та, насамперед, екологічної політики держави. Згідно з розпорядженням Президента України в м. Дніпродзержинськ протягом 2000–2004 рр. проведено еколого-економічний експеримент. Мета даного експерименту – вихід з екологічної кризи шляхом забезпечення для населення міста безпечного для життя та здоров'я довкілля [10].

У зв'язку з цим проведено моніторинг стану атмосферного повітря, питної води, води поверхневих водойм, але не досліджено ґрунтовий покрив міста. За результатами п'ятирічного еколого-економічного експерименту встановлено, що екологічний стан довкілля, а з ним і здоров'я населення в м. Дніпродзержинськ мають стійку тенденцію до погіршення [10]. Для отримання повніших даних щодо екологічного стану міста обов'язково необхідно проводити дослідження забруднення едафотопів, у тому числі такими поллютантами як кадмій.

Один із поширених видів антропогенного забруднення едафотопів – надходження до ґрунту важких металів. На відміну від хімічних елементів, що складають основну масу живої речовини (так званих макроелементів – вуглевод, кисень, водень, нітроген, сірка, фосфор, кальцій, натрій тощо), елементи, вміст яких в організмах дуже невеликий та складає 10^{-3} – 10^{-12} %, отримали назву мікроелементів (слідових елементів). До останніх відносять кадмій, марганець, мідь, цинк, кобальт, нікель, йод, фтор, молібден тощо [5].

Починаючи з 1916 р. В. І. Вернадським розроблялось вчення про зв'язок між хімічним складом організмів і хімічним складом земної кори. У численних працях ученого показано, що середовище та організм нерозривно пов'язані загальною історією атомів хімічних елементів [1].

Геохімічні процеси, що безперервно відбуваються в земній корі, та еволюція хімічного складу організмів – процеси нерозривні. Життя, за В. І. Вернадським, не складає зовнішнього випадкового явища на земній поверхні, а як найщільніше пов'язане з будовою земної кори [2]. Вміст елементів у живій речовині пропорційний складу середовища існування організму з поправкою на розчинність сполук, що включають ці елементи, та наявність інших хімічних елементів [3]. У неживій природі для кадмію таким елементом є цинк [5].

Масовий процент кадмію земної кори складає $5,0 \cdot 10^{-5}$ %. Кларк кадмію гранітного шару кори континентів складає $9,0 \cdot 10^{-4}$ %. Кількість кадмію у ґрунтах у сотні раз нижча, ніж кількість цинку. Наприклад, співвідношення $Zn : Cd$ у чорноземах

у середньому складає 1000 : 1 [5]. Гранично допустима концентрація кадмію для ґрунтів становить 1 мг/ кг ґрунту [7].

Таблиця 1

Вміст валової форми кадмію ґрунтів колишнього СРСР (за О. Виноградовим, 1957)

Назва ґрунтів	Вміст Cd, %
Тундрові	$1,0 \cdot 10^{-6}$ – $6,0 \cdot 10^{-6}$
Підзолисті	$1,0 \cdot 10^{-6}$ – $1,5 \cdot 10^{-5}$
Сірі лісові	$1,0 \cdot 10^{-6}$ – $7,0 \cdot 10^{-5}$
Чорноземи	$2,0 \cdot 10^{-6}$ – $1,3 \cdot 10^{-5}$
Каштанові, сіроземи	$1,0 \cdot 10^{-6}$ – $8,5 \cdot 10^{-6}$
Червоноземи	$1,0 \cdot 10^{-6}$

Поширення кадмію, як і інших важких металів, по поверхні ґрунту визначається багатьма чинниками. Воно залежить від особливостей джерел забруднення, метеорологічних особливостей регіону, геохімічних факторів ландшафту в цілому [15].

Токсичні метали вимагають особливої уваги. Вони наділені високою токсикологічною активністю, олігодинамічною дією, кумулятивними властивостями, наявністю специфічних, у тому числі вибіркових, ефектів впливу на організм людини. Основні джерела антропогенного надходження важких металів до природного середовища – теплові електростанції, металургійні та хімічні заводи, автотранспорт. У структурі промислового виробництва міста переважає металургія та обробка металу (67 %), хімічна галузь (18 %), виробництво коксу (5 %), машинобудування (2 %), виробництво будматеріалів, електроенергетики, деревообробна, харчова, легка і інші галузі промисловості. Технологічні процеси підприємств чорної та кольорової металургії не забезпечені надійними засобами очищення газових викидів, що спричинює сильне забруднення атмосфери навколо цих підприємств. Забруднена атмосфера в цьому випадку – головне джерело накопичення важких металів у ґрунті та рослинах [11].

Визначенням важких металів (мікроелементів) у ґрунтах і рослинах займалися багато дослідників в Україні та за кордоном [4; 7; 9; 24]. Вивчали поширення металів у окремих регіонах світу, СНД і України. У м. Дніпродзержинськ фрагментарно вивчали вміст важких металів у корененасиченому шарі ґрунтового покриву [10; 11; 17]. Велике значення кадмію як пріоритетного токсиканта вимагає постійних моніторингових досліджень.

Завдання даної роботи – оцінити особливості радіального та латерального розподілу елемента першого класу небезпеки кадмію у ґрунтах, дати екологічну оцінку ґрунтам за вмістом і поширенням кадмію в місті Дніпродзержинськ – промислового центрі Середнього Придніпров'я. Актуальність подібних досліджень зумовлена, насамперед, необхідністю зниження загрозливих екологічних наслідків забруднення ґрунтів важкими металами та оптимізації умов життя населення.

Матеріал і методи досліджень

Об'єкт досліджень – ґрунтовий покрив м. Дніпродзержинськ. Проби ґрунту відбирали з корененасиченого шару 0–50 см за загальноприйнятими методами в поліетиленові пакети для уникнення зайвого забруднення. Територія міста історично поділена на дві частини: правий та лівий берег р. Дніпро. Для повнішої характеристики вмісту кадмію у ґрунтовому покриві правобережна частина міста умовно поділена на підсистеми: східну, центральну та західну. Лівобережна частина не підлягала поділу, оскільки її територія незначна порівняно з усією площею м. Дніпродзержинськ. Застосовуючи системний підхід у дослідженнях, місто представили як систему, а селитебна, промислова та рекреаційна зони виступили підсистемами. При виконанні дослідження

застосовано методи статистичної обробки даних. Вміст кадмію визначали атомно-абсорбційним методом [16], визначення рухомих форм проводили в буферній амонійно-ацетатній витяжці (pH 4,8).

Результати та їх обговорення

Класифікаційна проблематика належить до найскладніших розділів ґрунтознавства. Вона – методологічна, філософська основа будь-якої науки. Ґрунтознавство як відносно молода наука постійно розвивається, а з її розвитком удосконалюється і класифікація ґрунтів [21; 22]. Тому кожному новому етапу розвитку ґрунтознавства відповідає якісно новий рівень вирішення класифікаційної проблематики, основу якої заклали В. В. Докучаєв [6] і М. М. Сибірцев [19]. На сьогодні є класифікації ґрунтів, розроблені відомими ґрунтознавцями світу, а також національні класифікації конкретних країн: Росії, США, Німеччини, Франції, Канади, Великобританії, Китаю, Японії, Індії тощо [21; 23].

На основі аналізу найвідоміших і вживаних класифікацій зроблено висновок [13; 14], що у жодній із них міським ґрунтам не приділено належної уваги й, у кращому випадку, їх визначення можливе лише на найвищих таксономічних рівнях. Це ускладнює діагностику та невиправдано спрощує сприйняття специфіки міських ґрунтів як особливих об'єктів дослідження ґрунтознавців. Уперше цій проблемі особливу увагу приділила М. М. Строганова [20]. Вона розробила оригінальну класифікацію ґрунтів і ґрунтоподібних тіл міських територій Росії. На підставі даної розробки доповнено міськими ґрунтами існуючу та новітню класифікацію ґрунтів України [13; 14; 22]. Запропонована екологічна класифікація природних, антропогенно- та антропотехногенно-перетворених ґрунтів [8] степової зони України базується на особливостях профільно-генетичної будови ґрунтових профілів як досить простого та об'єктивного підходу, а також на характері ґрунтовірних порід.

Треба відзначити, що вперше поняття «міські ґрунти» введено Bockheim (США) у 1974 році [25]. Міські ґрунти визначали як «ґрунтовий матеріал, який містить антропогенний шар несільськогосподарського походження потужністю понад 50 см, утворений шляхом перемішування, заповнення або забруднення поверхні землі на міських і приміських територіях». У подальшому це визначення отримало широке визнання та в незначній модифікації використовується у багатьох країнах світу [12].

За класифікацією М. М. Строганової [20], досліджувані ґрунти у зв'язку зі ступенем виразності антропогенного впливу можна віднести до таких типів. Ґрунти селищної частини міста належать до власне урбаноземів: ґрунтовий профіль складається з діагностичного горизонту «урбік» та серії діагностичних підгоризонтів, утворених своєрідним пилювато-гумусним субстратом різної потужності та якості з домішками сміття; можуть застилатися непроникним матеріалом – асфальтом, фундаментом, бетонними плитами, комунікаціями. Характеризуються відсутністю генетичних горизонтів до глибини 50 см і більше. Ґрунти промислової зони належать до плантоземів (від англ. *plant* – завод): ґрунти промислово-комунальних зон техногенно забруднені важкими металами та іншими токсичними речовинами. Ґрунти даної групи часто надмірно ущільнені, безструктурні, із включеннями токсичного неґрунтового матеріалу, що становить понад 20 %. Ґрунти рекреаційної зони належать до типу природних порушених (природно-антропогенних поверхнево-перетворених). Антропогенно-поверхнево-перетворені природні ґрунти містять діагностичний горизонт «урбік» потужністю менше 50 см і непорушену нижню частину профілю. Ґрунти лівобережжя намивні та належать до ристоземів (від англ. *restore*) – техногенні поверхневі

грунтоподібні утворення, грунтоподібні тіла, що складаються з малопотужного гумусового шару, шару торфо-компостної суміші або шару органічно-мінеральної речовини, нанесених на поверхню грунтоподібного субстрату [12].

Грунтовий покрив (власне урбаноземи, плантоземи, антропогенно-поверхнево-перетворені природні ґрунти та ристоземи) м. Дніпродзержинськ досліджено на вміст кадмію. У результаті виявлено (табл. 2), що вміст валової форми кадмію в урбаноземах найменший на лівобережжі (0,6 мг/кг), а в урбаноземах центру правобережжя складає 2,0 мг/кг (перевищення ГДК удвічі), у західній і східній частинах правого берега м. Дніпродзержинськ – 1,0 мг/кг (у межах ГДК). Максимальне значення вмісту кадмію у ґрунтах пояснюється тим, що селитебна підсистема центральної частини міста зазнає інтенсивних техногенних навантажень завдяки розташуванню поряд із промисловою зоною міста та особливостями рельєфу, що, у свою чергу, сприяє осіданню основних викидів промислових підприємств. Лівобережна частина вважається умовно чистою через значну віддаленість від основних джерел забруднювальних речовин. Коефіцієнт варіації для вмісту валової форми кадмію в селитебній підсистемі міста лежить в межах 2–18 % (у середньому – 11 %), рухомої форми – 7–17 % (у середньому – 12 %).

Плантоземи м. Дніпродзержинськ характеризується різноманітністю. Серед усіх обстежених територій найнижчий уміст кадмію зафіксований знову ж у плантоземах лівобережжя, а найвищий – у центрі та на сході правобережної частини міста, перевищення ГДК складає понад 10 разів (10,5 мг/кг). Значне перевищення вмісту кадмію у ґрунті пояснюється тим, що промислова підсистема розташована в центральній і східній частинах міста. Газопилові викиди підприємств і автотранспорту створюють потужні технічні потоки токсичних речовин на поверхні ґрунтів, спричинюючи їх забруднення. За даними Дніпропетровського обласного управління статистики, на 1 км² території Дніпродзержинська припадає 959,7 т викидів шкідливих речовин в атмосферне повітря від різних джерел забруднення [11].

Таблиця 2

Концентрація кадмію (мг/кг ґрунту) у ґрунтах м. Дніпродзержинськ

Міська підсистема	Форма	Правобережжя			Лівобережжя
		захід	центр	схід	
Селітебна	валова	1,0 ± 0,1	2,0 ± 0,3	1,0 ± 0,2	0,6 ± 0,1
Промислова		5,8 ± 0,3	10,5 ± 0,5	10,5 ± 0,9	1,5 ± 0,2
Рекреаційна		1,5 ± 0,3	1,7 ± 0,2	1,4 ± 0,1	0,8 ± 0,1
Селітебна	рухома	0,3 ± 0,1	1,2 ± 0,2	0,7 ± 0,2	0,1 ± 0,01
Промислова		0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,3	3,4 ± 0,5	0,6 ± 0,1
Рекреаційна		0,7 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,5 ± 0,1

Коефіцієнт варіації вмісту валової форми кадмію у промисловій зоні міста складає 5–18 % (у середньому – 11 %). Щодо коефіцієнта варіації для вмісту рухомої форми кадмію, то він становить 5–17 % (у середньому – 12 %).

Антропогенно-поверхнево-перетворені природні ґрунти визначаються таким вмістом кадмію: у лівобережній частині міста – 0,8 мг/кг (найнижчий), у центрі правобережної частини – 1,7 мг/кг (незначно перевищує ГДК). Забруднення ґрунтів кадмієм відбувається внаслідок осідання викидів промислових підприємств міста й автомобільного транспорту, вимивання шкідливих речовин із місць скупчення побутового сміття та промислових відходів. Коефіцієнт варіації вмісту валової форми кадмію в рекреаційній підсистемі міста складає 6–14 % (у середньому 9,5 %), коефіцієнт варіації для вмісту рухомої форми кадмію – 8–20 % (у середньому 16 %).

При оцінці забруднення ґрунтів необхідно проводити дослідження вмісту рухомих форм важких металів. За визначенням Перельмана [18], рухома форма являє собою такий стан хімічного елементу в гірських породах, ґрунтах і рудах, перебуваючи в якому елемент легко може переходити у розчин і мігрувати, тобто стає доступним для рослин. Уміст рухомих форм, виражений у відсотках від валового вмісту, становить показник, який дає змогу оцінити ступінь техногенного забруднення території. Для всієї селитебної зони міста (правобережжя та лівобережжя) частка рухомих форм кадмію від її валового вмісту варіює в межах 16,6–70,0 %, для промислової зони – 8,5–40,0 %, для рекреаційної зони – 23,5–62,5 %. У досліджених ґрунтових зразках частка рухомої форми кадмію коливається від 8,5 до 70 % від валового, що свідчить про техногенне походження цього елемента.

Висновки

За класифікацією міських ґрунтів, на території Дніпродзержинська визначено такі типи ґрунтів: власне урбаноземи, плантоземи, антропогенно-поверхнево-перетворені природні ґрунти та ристоземи. У ґрунтовому покриві селитебної, промислової та рекреаційної підсистем міста вміст валової форми кадмію варіює в межах 0,6–10,5 мг/кг, рухомої – 0,1–3,4 мг/кг ґрунту. Коефіцієнт варіації вмісту валової форми кадмію складає 2–18 %, рухомої – 5–20 %.

Вміст валової форми кадмію у власне урбаноземах центру правобережжя міста перевищує ГДК удвічі, у східній, західній правого берега та лівобережній частинах м. Дніпродзержинськ перебуває в межах ГДК. У плантоземах міста відзначаються суттєві коливання вмісту кадмію. Отримані дані свідчать про вміст у ґрунтах лівобережної частини м. Дніпродзержинськ 1,5 мг/кг кадмію, у західній частині правобережжя – 5,8 мг/кг, надзвичайно високим вмістом кадмію характеризуються плантоземи центру та сходу правобережної частини міста (10,5 мг/кг). Антропогенно-поверхнево-перетворені природні ґрунти міста характеризуються незначним перевищенням ГДК кадмію (крім лівобережної частини, де вміст важкого металу складає 0,8 мг/кг ґрунту та перебуває в межах норми).

Показник вмісту рухомих форм, виражений у відсотках від валового вмісту, коливається від 8,5 до 70 %, що свідчить про техногенне надходження кадмію до ґрунтового покриву м. Дніпродзержинськ.

Бібліографічні посилання

1. **Вернадский В. И.** Биосфера. – Л. : Наука, 1926. – 244 с.
2. **Вернадский В. И.** Избранные сочинения. – Т. 5–6. – М.–Л. : Изд-во АН СССР, 1954–1960. – С. 17–23.
3. **Виноградов А. И.** Геохимия редких и рассеянных химических элементов в почвах. – М. : Изд-во АН СССР, 1957. – 296 с.
4. **Власюк П. А.** Биологические элементы в жизнедеятельности растений. – Рига : Зинатне, 1972. – 355 с.
5. **Войнар А. И.** Микроэлементы в живой природе. – М. : Высшая школа, 1962. – 90 с.
6. **Докучаев В. В.** Разбор главнейших почвенных классификаций. Естественно-историческая классификация русских почв. – М. : Географгиз, 1949. – 237 с.
7. **Жовинский Э. Я.** Геохимия тяжелых металлов в почвах Украины / Э. Я. Жовинский, И. В. Кураева. – К. : Наукова думка, 2002. – 213 с.
8. **Зонн С. В.** Географо-генетические аспекты почвообразования, эволюции и охраны почв / С. В. Зонн, А. П. Травлеев. – К. : Наукова думка, 1989. – 216 с.

9. **Кабата-Пендиас А.** Микроэлементы в почвах и растениях / А. Кабата-Пендиас, Х. Пендиас. – М. : Мир, 1989. – 440 с.
10. **Клименко Т. К.** Біоекологічні особливості розподілу важких металів в урбосистемах промислового Дніпродзержинська: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Д., 2007. – 19 с.
11. **Клименко Т. К.** Особливості розповсюдження важких металів у ґрунтах урбоєкосистем Придніпровського району (на прикладі м. Дніпродзержинськ) // Вісник Дніпропетр. ун-ту. Біологія. Екологія. – 2004. – Вип. 12, т. 1. – С. 72–75.
12. **Медведєва О. В.** Досвід класифікації міських ґрунтів степової зони України // Ґрунтознавство. – 2004. – Т. 5, № 1–2. – С. 34–39.
13. **Мірзак О. В.** Досвід дослідження ґрунтів великих промислових центрів степової зони України (на прикладі м. Дніпропетровська) // Ґрунтознавство. – 2001. – Т. 1, № 1–2. – С. 87–92.
14. **Мірзак О. В.** Екологічні особливості едафотопів урбанізованих територій степової зони України (на прикладі м. Дніпропетровська): Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Д., 2001. – 19 с.
15. **Мудрий И. В.** О возможном нарушении поверхностно активных веществ эколого-гигиенического равновесия в условиях комплексного антропогенного загрязнения окружающей среды (Обзор) // Гигиена и санитария. – 1995. – № 3. – С. 38.
16. **Обухов А. И.** Атомно-абсорбционный анализ в почвенно-биологических исследованиях / А. И. Обухов, И. О. Плеханова. – М. : МГУ, 1991. – 184 с.
17. **Пасічний Г. В.** Геоєкологічні моніторингові дослідження вмісту важких металів у ґрунтах техногенно змінених ландшафтів (на прикладі м. Дніпродзержинська) / Г. В. Пасічний, С. М. Сердюк // Вісник Дніпропетр. ун-ту. Геологія. Географія. – 2002. – Вип.4. – С. 161–166.
18. **Перельман А. И.** Геохимия ландшафта. – М. : Высш. шк., 1975. – 344 с.
19. **Сибирцев Н. М.** Избранные сочинения. – М. : Сельхозгиз, 1951. – Т. 1. – 472 с.
20. **Строганова М. Н.** Городские почвы: генезис, систематика и экологическое значение (на примере г. Москвы): Автореф. дисс. ... д-ра биол. наук. – М., 1998. – 71с.
21. **Тихоненко Д. Г.** Класифікація ґрунтів. – Х. : Вид-во Харківського нац. аграрн. ун-ту ім. В. В. Докучаєва, 2009. – 59 с.
22. **Тихоненко Д. Г.** Агрогенне ґрунтоутворення і класифікація ґрунтів // Вісник Харківського нац. аграрн. ун-ту. Ґрунтознавство. – 2010. – № 5. – С. 5–10.
23. **Травлев А. П.** Материалы к номенклатуре и классификации лесных почв подзоны настоящих степей // Вопросы степного лесоведения. – Д. : Изд-во ДГУ, 1972. – Вып. 3. – С. 16–21.
24. **Цветкова Н. Н.** Особенности миграции органо-минеральных веществ и микроэлементов в лесных биогеоценозах степной Украины. – Д. : Изд-во ДГУ, 1992. – 238 с.
25. **Hollis J. M.** The classification of soils in urban areas // Soils in Urban Environments. – Oxford, 1991. – P. 5–27.

Надійшла до редколегії 24.04.2011

УДК 514.315

С. Г. Гюльяхмедов, Н. Ф. Гусейнова, Н. А. Абдуллаева, А. А. Кулиев

Бакинський державний університет, Азербайджан

**ВЛИЯНИЕ ЛЕЦИТИНА И КАЗЕИНА
НА СПЕКТР АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ
БАКТЕРИОЦИНОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ,
ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ АЗЕРБАЙДЖАНСКИХ СЫРОВ**

Изучено влияние лецитина и казеина на спектр антимикробной активности бактериоцинов, выделенных из штаммов *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* BN ATS 8w, *Enterococcus faecium* A5 и *Lactobacillus rhamnosus* FAZ 16m. В качестве пассивной культуры использованы *Lactobacillus bulgaricus* 340, *Listeria innocua* CIP 80.11, *Escherichia coli* ATCC 23355, *Enterococcus faecalis* ATCC 1.144. При исследуемых концентрациях лецитин и казеин отрицательно влияли на активность бактериоцинов. Эти факторы входят в состав большинства ферментированных продуктов.

С. Г. Гюльяхмедов, Н. Ф. Гусейнова, Н. А. Абдуллаева, А. А. Кулиев

Бакинський державний університет, Азербайджан

**ВПЛИВ ЛЕЦИТИНУ ТА КАЗЕЇНУ НА СПЕКТР АНТИМИКРОБНОЇ
АКТИВНОСТІ БАКТЕРІОЦИНІВ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ,
ІЗОЛЬОВАНИХ З АЗЕРБАЙДЖАНСЬКИХ СИРІВ**

Досліджено вплив лецитину та казеїну на спектр антимікробної активності бактериоцинів, виділених із штамів *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* BN ATS 8w, *Enterococcus faecium* A5 і *Lactobacillus rhamnosus* FAZ 16m. Як пасивну культуру використано *Lactobacillus bulgaricus* 340, *Listeria innocua* CIP 80.11, *Escherichia coli* ATCC 23355, *Enterococcus faecalis* ATCC 1.144. За дослідних концентрацій лецитин і казеїн негативно впливали на активність бактериоцинів. Ці фактори входять до складу більшості ферментованих продуктів.

S. G. Gulahmedov, N. F. Huseynova, N. A. Abdullaeva, A. A. Kuliev

Baku State University, Azerbaijan

**INFLUENCE OF LECITHIN AND CASEIN ON THE ANTIMICROBIAL
ACTIVITIES OF BACTERIOCINS OF LACTIC-ACID BACTERIA,
ISOLATED FROM AZERBAIJANI CHEESES**

The influence of lecithin and casein on the antimicrobial activities of bacteriocins isolated from *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* BN ATS 8w, *Enterococcus faecium* A5 and *Lactobacillus rhamnosus* FAZ 16m strains was studied. *Lactobacillus bulgaricus* 340, *Listeria innocua* CIP 80.11, *Escherichia coli* ATCC 23355, *Enterococcus faecalis* ATCC 1.144 were used as target organisms. Used concentrations of lecithin and casein – 0.1 % and 1–5 g/L respectively – were antagonistic to the bacteriocins. These substances are constituents of most fermented products.

Введение

Молочнокислые бактерии продуцируют ряд биологически-активных веществ с антимикробными свойствами. Антагонизм МКБ в ферментированных продуктах ассоциируется с их метаболитами, такими как молочная и уксусная кислоты, перекись водорода или бактериоцины – молекулы пептидной природы [2; 4].

Секретия бактериоцинов внутри ферментированного продукта штаммами-продуцентами зависит от многих физико-химических и экологических факторов. Однако информация о взаимодействии бактериоцинов с ингредиентами пищи ограничена и касается только активности низина против клеток *L. monocytogenes* [7–9].

Цель настоящих исследований – оценить влияние лецитина и казеина на спектр антимикробной активности бактериоцинов молочнокислых бактерий, изолированных нами из Азербайджанских сыров [1; 6; 10].

Материал и методы исследований

В качестве пассивной культуры использованы *Lactobacillus bulgaricus* 340, *Listeria innocua* CIP 80.11, *Escherichia coli* ATCC 23355, *Enterococcus faecalis* ATCC 1.144. Изолированные нами штаммы *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* BN ATS 8w, *Enterococcus faecium* A5 и *Lactobacillus rhamnosus* FAZ 16m использовали как продуценты параказеина 8w, энтероцина A5 и рамнозицина 16m соответственно.

Все организмы молочнокислых бактерий культивировали в модифицированной МРС среде [5]. В одном литре среда содержала: 10 г – триптон, 5 г – дрожжевой экстракт, 2 г – K_2HPO_4 , 2 г – диаммоний-цитрат, 1 г – Твин 80, 0,1 г – $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,05 г – $MnSO_4 \cdot H_2O$, 20 г – глюкоза (все реактивы фирмы Merck, Darmstadt, Germany). После стерилизации среды значение *pH* в ней составляло 6,4–6,5. Молочнокислые бактерии выращивали в анаэробных условиях при +30 °С, все остальные штаммы – на качалке без остановки (200 об./мин) при +37 °С.

Активность бактериоцинов определяли путем реципрокного разбавления их растворов до проявления минимальной антимикробной активности (2 мм), обнаруженной методом диффузии, и выражали как ПЕ/мл.

Лецитин из яичного желтка (Serva, Heidelberg, Germany) и казеин (Sigma, Deisenhofen, Germany) растворяли в модифицированной (мМРС) среде и раствор стерилизовали путем фильтрации. Влияние каждого компонента среды на активность бактериоцинов определяли отдельно при стандартных условиях. Влияние самих компонентов на рост пассивных культур определяли таким же путем без добавления бактериоцина.

Результаты и их обсуждение

Составные компоненты ферментированных пищевых и кормовых продуктов самыми различными путями влияют на микроорганизмы, населяющие эти продукты. При этом они могут взаимодействовать с клеточной мембраной бактерий или же с их метаболитами [7; 8]. Антимикробная активность бактериоцина является результатом гидрофобных и электростатических взаимодействий этих амфифильных, положительно заряженных пептидов с клеточной мембраной пассивной культуры. Поэтому мы изучили влияние лецитина (как эмульгатора) и казеина на активность бактериоцинов против клеток пассивных культур, список которых приводится в методической части.

Добавление лецитина в концентрации 1 % приводит к полному исчезновению бактериоциновой активности против всех пассивных штаммов (табл. 1). Лецитин в концентрации 0,1 % понижает активность бактериоцина против *L. bulgaricus* 340 на

45–63 %. Ингибирование бактериоциновой активности в аналогичных концентрациях по отношению к клеткам другого пассивного штамма – клеток *Listeria innocua* CIP 80.11 носило более интенсивный характер (59–76 %). По-видимому, устойчивость клеток второго пассивного штамма к влиянию изученных бактериоцинов больше по сравнению с клетками *L. bulgaricus* 340.

Таблица 1

Влияние лецитина на относительную антимикробную активность параказеина 8w, энтероцина А5 и рамнозицина 16m

Бактериоцины	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> 340		<i>Listeria innocua</i> CIP 80.11		
	0,1 % лецитина	1,0 % лецитина	0,1 % лецитина	0,5 % лецитина	1,0 % лецитина
Параказеин 8w	0,55*	0	0,41	0,11	0
Энтероцин А5	0,32*	0	0,22	0,05	0
Рамнозицин 16m	0,37*	0	0,24	0,01	0

Примечание: * – относительная активность (активность бактериоцинов в стандартных условиях равна 1, pH 6,5).

Степень угнетения активности изученных бактериоцинов (параказеин 8w, энтероцин А5 и рамнозицин 16m) казеином зависела от видового разнообразия пассивных культур (табл. 2). Если активность бактериоцина против *E. faecalis* ATCC 1.144 была понижена в присутствии 1 г/л казеина на 60 %, то по отношению к *E. coli* ATCC 23355 такой ингибирующий эффект казеина был достигнут концентрацией 10 г/л. Необходимо отметить, что выбор таких концентраций лецитина и казеина не является случайным. Его количество в яичном желтке составляет 6 %, а в состав молока входит около 0,5 % фосфолипидов [2; 8].

Таблица 2

Влияние лецитина на относительную антимикробную активность параказеина 8w, энтероцина А5 и рамнозицина 16m

Бактериоцины	<i>Escherichia coli</i> ATCC 23355			<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 1.144		
	1 г/л казеина	5 г/л казеина	10 г/л казеина	0,1 г/л казеина	1 г/л казеина	10 г/л казеина
Параказеин 8w	0,95*	0,51	0,50	1,00	0,71	0,51
Энтероцин А5	0,98*	0,62	0,55	0,82	0,66	0,65
Рамнозицин 16m	1,00*	0,72	0,72	0,98	0,54	0,50

Примечание: см. табл. 1.

По литературным данным, нейтральные эмульгаторы, такие как монолаурин, моноолеат и Твин-80 стимулируют активность низина [3; 9]. Однако соединения с амфотерными свойствами, например лецитин, даже в низких концентрациях (0,1 %) угнетают его активность [4]. Это обстоятельство объясняется тем, что низин с амфотерной фосфолипидной молекулой образует стабильный комплекс. Результаты влияния лецитина на бактериоцины, представленные в наших опытах, хорошо коррелируют с этими данными.

Защитный эффект казеина к влиянию бактериоцинов в ранних работах не встречается. Причиной наблюдаемого в наших опытах снижения антимикробной активности бактериоцинов в присутствии казеина может служить их взаимодействие с казеином, который является амфифильной молекулой, содержащей отрицательный заряд и гидрофобный домен.

Выводы

Добавление лецитина в концентрации 1 % приводит к полному исчезновению бактериоциновой активности против всех пассивных штаммов. Лецитин в концентра-

ции 0,1 % понижает активность бактериоцина против *Lactobacillus bulgaricus* 340 на 45–63 %, против *Listeria innocua* СІР 80.11 – на 59–76 %.

Степень угнетения казеином активности параказеицина 8w, энтероцина А5 и рамнозицина 16m против *E. faecalis* АТСС 1.144 понижается в присутствии 1 г/л казеина на 60 %. Против *E. coli* АТСС 23355 такой ингибирующий эффект казеина достигнут концентрацией 10 г/л.

Полученные результаты углубляют наши знания о механизме влияния бактериоцинов на пассивные культуры в целом.

Библиографические ссылки

1. **Выделение** и характеристика бактериоциноподобных ингибиторных веществ молочнокислых бактерий, изолированных из азербайджанских сыров / С. Г. Гюльяхмедов, Н. Ф. Абдуллаева, Н. Ф. Гусейнова и др. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – Т. 45, № 3. – С. 297–303.
2. **Abee T.** Bacteriocins: Modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning / T. Abee, L. Krockel, C. Hill // Int. J. Food Microbiol. – 1995. – Vol. 28. – P. 169–185.
3. **Nisin** compositions for use as enhanced, broad range bacteriocins / P. Blackburn, J. Polack, S. Gusik, S. D. Rubino, inventors; Applied Microbiology Inc., assignee. 1989. – International patent application number PCT/US89/02625. – International publication number W089/12399.
4. **Bacteriocins:** Safe, natural antimicrobials for food preservation / J. Cleveland, T. J. Montville, I. F. Nes, M. L. Chikindas // Int. J. Food Microbiol. – 2001. – Vol. 71. – P. 1–20.
5. **De Man J. C.** A medium for the cultivation of lactobacilli / J. C. De Man, M. Rogosa, M. E. Sharpe // J. Appl. Bacteriol. – 1960. – Vol. 23. – P. 130–135.
6. **Characterization** of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) from lactic acid bacteria isolated from traditional Azerbaijani dairy products / S. G. Gulahmadov, B. Batdorj, M. Dalgarrondo et al. // Europ. Food Rec. Technol. – 2006. – Vol. 224. – P. 338–345.
7. **Henning S.** New aspects for the application of nisin to food products based on its mode of action / S. Henning, R. Metz, W. P. Hammes // Int. J. Food Microbiol. – 1986. – Vol. 3. – P. 135–141.
8. **Antimicrobial** activity of bacteriocin-producing cultures in meat products / M. Hugas, B. Neumeyer, F. Pages et al. // Fleischwirtschaft. – 1996. – Vol. 76. – P. 649–652.
9. **Jung D.-S.** Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin in inhibiting *Listeria monocytogenes* in fluid milk / D.-S. Jung, F. W. Bodyfelt, M. A. Daeschel // J. Dairy Sci. – 1992. – Vol. 75. – P. 387–393.
10. **Phenotypic** and genotypic characterization of non-starter lactic acid bacteria from homemade Azerbaijani dairy products / A. Terzic-Vidojevic, S. G. Gulahmadov, M. Vukasinovic et al. // African J. Biotechnol. – 2009. – Vol. 8 (11). – P. 2576–2588.

Надійшла до редакції 31.01.2011

УДК 581.143.6:633.15

К. В. Деркач*, Г. С. Крупська**, О. Є. Абраїмова*, Т. М. Сатарова***

**Інститут сільського господарства степової зони НААН України*

***Дніпропетровський національний університет ім. Олесь Гончара*

****Український державний хіміко-технологічний університет*

ВПЛИВ СКЛАДУ ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА НА РОЗВИТОК ТА ПРОРОСТАННЯ НЕЗРІЛИХ ЗАРОДКІВ КУКУРУДЗИ В КУЛЬТУРІ *IN VITRO*

Досліджено вплив мінеральної основи живильного середовища та абсцизової кислоти на ізольовані незрілі зародки кукурудзи з метою інтенсифікації їх росту та стримування передчасного проростання. Абсцизова кислота (АБК) на фоні середовища MS викликала затримку як розвитку проростків, так і зародка. Застосування АБК на фоні солей N_6 стримувало розвиток органів проростка на користь росту самого зародка. Для дорощування незрілих зародків кукурудзи довжиною 1 мм із наступним отриманням проростків рекомендується їх культивування на модифікованому середовищі N_6 із додаванням 12 мг/л абсцизової кислоти.

К. В. Деркач*, Г. С. Крупская**, О. Е. Абраимова*, Т. Н. Сатарова***

**Інститут сільського господарства степної зони НААН України*

***Дніпропетровський національний університет ім. Олесь Гончара*

****Український державний хіміко-технологічний університет*

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА РАЗВИТИЕ И ПРОРАСТАНИЕ НЕЗРЕЛЫХ ЗАРОДЫШЕЙ КУКУРУЗЫ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Исследовано влияние минеральной основы питательной среды и абсцизовой кислоты на изолированные незрелые зародыши кукурузы с целью интенсификации их роста и сдерживания преждевременного прорастания. Абсцизовая кислота (АБК) на фоне среды MS приводила к задержке как развития проростков, так и зародыша. Использование АБК на фоне солей N_6 сдерживало развитие органов проростка в пользу роста самого зародыша. Для дорастивания незрелых зародышей кукурузы длиной 1 мм с последующим получением проростков рекомендуется их культивирование на модифицированной среде N_6 с добавлением 12 мг/л абсцизовой кислоты.

K. V. Derkach*, G. S. Krupskaya**, O. E. Abramova*, T. M. Satarova***

**Institute of Steppe Zone Agriculture of NAAS of Ukraine*

***Oles' Honchar Dnipropetrovsk National University*

****Ukrainian State University of Chemistry and Technology*

EFFECT OF NUTRIENT MEDIUM COMPOSITION ON THE DEVELOPMENT AND GERMINATION OF MAIZE IMMATURE EMBRYOS IN *IN VITRO* CULTURE

The effect of mineral components of nutrient medium and abscisic acid (ABA) on isolated immature maize embryos is investigated with the aim to intensify their growth and to inhibit their early germination.

Abscisic acid together with MS medium leads to the stasis of the development of both seedlings and embryos. The application of ABA along with N_6 minerals inhibited the development of seedling's organs in favour of embryos growth. For production of seedlings from immature embryos of 1 mm long their cultivation on modified N_6 medium with addition of 12 mg/L of abscisic acid is recommended.

Вступ

У біотехнології рослин існують декілька напрямів, у яких використовується отримання проростків із незрілих зиготичних або соматичних зародків. Зокрема, у кукурудзи при отриманні додаткових генерацій на рік для скорочення селекційного процесу пророщують 20-добові зиготичні зародки довжиною 4-5 мм. Такі зародки не повністю зрілі, але міцні та здатні до формування міцних, добре розвинених проростків, які добре переносять пересадку у ґрунт [4]. Відомо, що при запиленні та заплідненні в культурі *in vitro*, при дорошуванні ізольованих зернівок і запліднених зародкових мішків зиготичні зародки виростають лише до 3 мм і після цього спонтанно починають проростати [9]. Соматичні зародки, які формуються в культурі калусних тканин і в культурі пиляків кукурудзи, часто бувають дуже дрібними за розміром. Такі зародки, досягнувши критичних розмірів 1–3 мм, не розвиваються далі шляхом накопичення маси зародка та збільшення його лінійних розмірів, а починають проростати [3]. Зазначимо, що у кукурудзи зиготичний зародок у зрілому стані має довжину 6–7 мм. Раннє проростання дрібних зародків, на противагу дозріванню, викликає появу слабких проростків, які важко приживлюються у ґрунті.

Мета нашої роботи – розробити склад живильного середовища для затримання передчасного проростання ізольованих незрілих зиготичних зародків кукурудзи, їх росту та можливості подальшого формування проростків із нормально розвиненими пагонами та корінцями. Для досягнення цієї мети дослідили реакцію незрілих зародків на склад мінеральних компонентів живильного середовища ($MS-N_6$) та використовували абсцизову кислоту (АБК), яка відома як регулятор стану спокою у рослин [1; 5].

Матеріал і методи досліджень

У роботі використано гібрид кукурудзи ДК675хУг75, люб'язно наданий відділом селекції Інституту сільського господарства степової зони НААН України. Донорні рослини вирощували в польових умовах за загальноприйнятою методикою польового дослідження [6]. У період викидання волотей і качанів проводили ізоляцію та штучне запилення рослин із використанням паперових ізоляторів. На 12-ту добу після запилення качани видаляли з рослин і переносили до лабораторії. Для проведення експериментів використовували ізольовані незрілі зародки віком 12 діб після запилення. Ізольовані зернівки стерилізували насиченим розчином хлорного вапна та промивали п'ять разів стерильною дистильованою водою. У стерильних умовах ламінар-боксів незрілі зародки видаляли та експлантували на живильні середовища зародковою віссю догори, щитком до середовища. В одному з варіантів дослідження качани на 12-ту добу після запилення витримували перед експлантацією зародків протягом доби за температури +5...+7 °С.

Культивування незрілих зародків проводили на модифікованих живильних середовищах MS та N_6 , до складу яких входили макро- та мікросолі MS за [8] або N_6 за [7], 0,1 мг/л тіаміну, 0,5 мг/л піридоксину, 0,5 мг/л нікотинової кислоти, 2 мг/л 6-бензиламінопурину (6-БАП), 6 % сахарози, 8 г/л агару. Залежно від варіанта дослідження до середовища додавали 12 мг/л АБК (табл. 1). Як бачимо, середовища MS та N_6 розрізняються за вмістом деяких макро- та мікроелементів. Середовище N_6 містить порівняно з MS більше калію та фосфору, менше загального нітрогену (як із нітратних,

так і з амонійних груп), кальцію та магнію. Суттєво різняться ці середовища складом мікроелементів.

Культивування проводили за температури +27 °С, перші 7 діб у темряві, останні – при 16-годинному фотоперіоді за інтенсивності освітлення 5 тис. люкс. Культивування зародків тривало 13 діб. Після закінчення терміну культивування визначали довжину зародка, яку вимірювали по щитку, частку пророслих зародків (%) і частку зародків, що сформували калус (%).

Таблиця 1

Склад живильних середовищ, використаних для культивування ізольованих незрілих зародків кукурудзи

Речовина	Вміст речовини у середовищі, мг/л			
	MS _{мод.}	N _б _{мод.}	MS _{мод.} + 12 мг/л АБК	N _б _{мод.} + 12 мг/л АБК
Калію нітрат	1900,0	2830,0	1900,0	2830,0
Амонію сульфат	–	463,0	–	463,0
Амонію нітрат	1650,0	–	1650,0	–
Кальцію хлорид двоводний	440,0	166,0	440,0	166,0
Калію дигідрофосфат	170,0	400,0	170,0	400,0
Магнію сульфат семиводний	370,0	185,0	370,0	185,0
Марганцю сульфат чотириводний	22,3	4,4	22,3	4,4
Цинку сульфат семиводний	8,6	1,5	8,6	1,5
Борна кислота	6,2	1,6	6,2	1,6
Кобальту хлорид шестиводний	0,025	–	0,025	–
Міді сульфат п'ятиводний	0,025	–	0,025	–
Натрію молібдат двоводний	0,25	–	0,25	–
Калію йодид	0,83	0,80	0,83	0,80
Заліза сульфат семиводний	27,80	27,80	27,80	27,80
Натрій-EDTA	37,30	37,50	37,30	37,50
Тіамін гідрохлорид	0,1	0,1	0,1	0,1
Піридоксин гідрохлорид	0,5	0,5	0,5	0,5
Нікотинова кислота	0,5	0,5	0,5	0,5
6-бензиламінопурін	2	2	2	2
Сахароза	60000	60000	60000	60000
Абсцизова кислота	–	–	12	12
Агар	8000	8000	8000	8000
<i>pH</i>	5,8	5,8	5,8	5,8

Статистична обробка даних проведена за Г. Ф. Лакінім [2]. Дані в таблицях представлені у вигляді $M \pm m$, де M – середнє арифметичне значення показника, m – похибка середнього арифметичного за рівня значущості 0,05.

Результати та їх обговорення

При культивуванні протягом 13 діб спостерігали реакцію незрілих зародків (табл. 2) у вигляді росту, проростання, формування пагона та кореневої системи та, інколи, калусогенезу. Проростання зародків на середовищах MS_{мод.} та N_б_{мод.} починалося на першу добу культивування. Початок проростання зародків у варіантах з АБК відбувався на три доби пізніше, ніж у контрольних варіантах, незалежно від мінеральної основи середовища. Після третьої доби культивування зародки у варіантах з АБК починали повільно проростати.

При культивуванні лінійні розміри зародків, зокрема довжина щитка, зросли від вихідних 0,98 до 1,55–1,79 мм залежно від варіанта живильного середовища. Певна

тенденція до стримування росту щитка проявилася під впливом АБК на фоні неорганічних компонентів MS (див. табл. 2). Проростання зародків відбувалося на рівні 57–93 % залежно від варіанта досліду. Проявилася тенденція до певного зниження проценту пророслих зародків під впливом абсцизової кислоти. Поодинокі випадки калусоутворення відмічені на середовищах, які за мінеральну основу мали солі MS.

Таблиця 2

Вплив складу живильного середовища на ізолювані незрілі зародки кукурудзи

Середовище	Експлантовано зародків, шт.	Довжина зародка, мм	Частка пророслих зародків, %	Частка зародків, що сформували калус, %
На момент експлантації	–	0,98 ± 0,13	0	0
MS _{мод.}	28	1,75 ± 0,16	93	4
N ₆ _{мод.}	24	1,79 ± 0,23	75	0
Середнє	–	1,77 ± 0,08	84,0 ± 10,2	2
MS _{мод.} + 12 мг/л АБК	23	1,55 ± 0,15	87	4
N ₆ _{мод.} + 12 мг/л АБК	23	1,78 ± 0,16	57	0
Середнє	–	1,67 ± 0,06	72,0 ± 13,2	2

Використання солей N₆ замість MS у варіантах без АБК визначає тенденцію до стримування росту пагона та кореневої системи (табл. 3). На фоні дії АБК при використанні солей N₆ порівняно з MS проявилася слабка тенденція до збільшення довжини пагонів і коренів.

Таблиця 3

Вплив складу живильного середовища на морфобіологічні показники проростків з ізолюваних незрілих зародків кукурудзи

Середовище	Експлантовано зародків, шт.	Довжина пагона, мм	Довжина кореневої системи, мм
MS _{мод.}	28	15,5 ± 3,5	6,2 ± 2,8
N ₆ _{мод.}	24	12,4 ± 2,2	4,8 ± 1,5
Середнє	–	14,0 ± 1,2	5,5 ± 0,9
MS _{мод.} + 12 мг/л АБК	23	5,5 ± 1,7	1,8 ± 0,2
N ₆ _{мод.} + 12 мг/л АБК	23	6,1 ± 1,6	2,1 ± 1,1
Середнє	–	5,8 ± 0,7	2,0 ± 0,3

Як зазначалося раніше, додавання 12 мг/л АБК стримувало початок проростання зародків на три доби. На 13-ту добу від експлантації ізолюваних зародків абсцизова кислота на фоні середовища MS викликала різке стримування росту проростків одночасно з тенденцією до затримування росту зародка (див. табл. 2). Застосування АБК на фоні солей N₆ також обмежувало розвиток органів проростка, але не пригнічувало ріст самого зародка (табл. 2). Можна припустити, що при цьому частина пластичних речовин, які надходять із живильного середовища, використовувалася не на розвиток пагонів і коренів, а на дозрівання самого зародка, зокрема на ріст щитка. Після 13-ї доби від експлантації зародків, на яку проводився аналіз, проростки на середовищах з АБК продовжували активно розвиватися і на 21–24-ту добу наближалися до контрольних проростків за довжиною пагона та коренів, були добре розвиненими та готовими до пересадки у ґрунт.

Таким чином, варіантом середовища, на якому відбувається затримування проростання незрілого зародка на користь його росту, є варіант N₆_{мод.} + 12 мг/л АБК.

Як один із варіантів затримування передчасного проростання ізолюваних незрілих зародків задля їх переважного росту та отримання міцніших проростків роз-

глядали витримування качанів протягом однієї доби при температурі +5...+7 °С. Відмічено, що за період такої холодової передобробки довжина зародків збільшилася з 1 до 1,7 мм. Наступне культивування на зазначених середовищах дозволило отримати міцніші зародки та, одночасно, окремі міцні проростки. Однак холодова передобробка різко збільшувала утворення калусів як на зародковій осі, так і на абаксіальній поверхні щитка. У результаті отримані проростки дуже варіювали за розмірами через те, що зародки, на яких утворювалися калуси, формували пригнічені проростки з розміром пагона 1–2 мм, часто без корінців. Із цих причин ми відмовилися від використання у майбутньому холодової передобробки.

Висновки

Реакція незрілих зародків кукурудзи на культивування *in vitro* проявляється у вигляді росту зародка, його проростання та, інколи, калусогенезу. Початок проростання зародків на фоні абсцизової кислоти відбувається на три доби пізніше, ніж у контрольних варіантах, незалежно від мінеральної основи середовища. На середовищах, які мали за мінеральну основу солі MS, відмічено поодинокі випадки калусоутворення. Абсцизова кислота на фоні середовища MS спричинювала різке пригнічення розвитку проростків і тенденцію до стримування росту зародка. Застосування АБК на фоні солей N_6 стримувало розвиток органів проростка, але не пригнічувало ріст самого зародка. Проростки на середовищах з АБК до 21–24-ї доби наближалися до контрольних проростків довжиною пагона та коренів. Холодова передобробка протягом доби різко збільшувала утворення калусів як на зародковій осі, так і на абаксіальній поверхні щитка. Для отримання проростків із незрілих зародків довжиною близько 1 мм в біотехнологічних програмах рекомендується їх культивування та пророщування на модифікованому середовищі N_6 із додаванням 12 мг/л абсцизової кислоти.

Бібліографічні посилання

1. **Калинин Ф. Л.** Биологически активные вещества в растениеводстве. – К. : Наук. думка, 1984. – 388 с.
2. **Лакин Г. Ф.** Биометрия. – М. : Высш. шк., 1990. – 352 с.
3. **Сатарова Т. М.** Андрогенез та ембріокультура у кукурудзи *in vitro*: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук: 03.00.20 – біотехнологія. – К., 2003. – 40 с.
4. **Сатарова Т. Н.** Влияние различных факторов на эмбриокультуру кукурузы // Вісник аграрної науки. – 2002. – № 4. – С. 51–53.
5. **Сатарова Т. Н.** Реакция незрелых зародышей кукурузы в культуре *in vitro* на длительное воздействие холода / Т. Н. Сатарова, Д. Е. Струнин, П. Н. Галушак // Вісник Дніпропетр. ун-ту. Біологія. Екологія. – 2007. – Вип. 15, № 3/1. – С. 150–155.
6. **Филев Д. С.** Методические рекомендации по проведению полевых опытов с кукурузой / Д. С. Филев, В. С. Циков, В. И. Золотов. – 1980. – 54 с.
7. **Establishment** of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on nitrogen sources / C. C. Chu, C. C. Wang, C. S. Sun et al. // Sci. Sinica. – 1975. – N 18. – P. 659–668.
8. **Murashige T.** A revised media for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plant. – 1962. – N 15. – P. 473–497.
9. **Satarova T. N.** The development of isolated maize caryopses *in vitro* / T. N. Satarova, O. V. Lyapustina // Maize Gen. Coop. Newslett. – 2010. – Vol. 48. – P. 15–17.

Надійшла до редколегії 31.01.2011

УДК 577.3+535.33

О. І. Доценко

Донецький національний університет

ОСОБЛИВОСТІ РЕАГУВАННЯ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ НИРОК МИШЕЙ НА ДІЮ НИЗЬКОЧАСТОТНОЇ ВІБРАЦІЇ

Досліджено вплив 14-добової вібрації із частотами 8, 16, 24 і 32 Гц, амплітудою $0,8 \pm 0,12$ мм на активність ферментів СОД-каталаза, ферментів системи глутатіону і вміст відновленого глутатіону в гомогенатах тканин нирок мишей. Показано наявність тканинної гіпоксії та зниження кількості відновленого глутатіону в досліджених органах. Проаналізовано зміни активностей окислювальних процесів і ферментів антиоксидантного захисту, виявлено зниження спроможності організму адекватно відповідати на такий стресовий фактор як низькочастотна вібрація.

О. И. Доценко

Донецкий национальный университет

ОСОБЕННОСТИ РЕАГИРОВАНИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ПОЧЕК МЫШЕЙ НА ДЕЙСТВИЕ НИЗКОЧАСТОТНОЙ ВИБРАЦИИ

Исследовано влияние 14-дневной вибрации с частотами 8, 16, 24 и 32 Гц, амплитудой $0,8 \pm 0,12$ мм на активность ферментов СОД-каталаза, ферментов системы глутатиона и содержание восстановленного глутатиона в гомогенатах тканей почек мышей. Показано наличие тканевой гипоксии и снижение количества восстановленного глутатиона в исследуемых органах. Проведенный анализ изменений активностей окислительных процессов и ферментов антиоксидантной защиты свидетельствует о снижении способности организма адекватно отвечать на такой стрессовый фактор как низкочастотная вибрация.

О. I. Dotsenko

Donetsk National University

FEATURES OF ANTIOXIDANT SYSTEM RESPONSE OF MICE KIDNEYS TO THE EFFECT OF LOW-FREQUENCY VIBRATION

Influence of 14-day vibrations of 8, 16, 24 and 32 Hz frequencies with 0.8 ± 0.12 mm amplitude on the activities of SOD-catalase and the glutathione system and on the content of reduced glutathione in mice kidneys homogenates is studied. The tissues hypoxia and decrease of the reduced glutathione in kidneys are shown. Carried out analysis of changes in the oxidizing processes and antioxidant protection enzymes testifies to decrease in capability of an organism to response adequately to such stressful factor as low-frequency vibration.

Вступ

Сучасні технологічні процеси часто супроводжуються шумом і вібрацією – механічними коливаннями, які, розрізняючись за інтенсивністю, можуть негативно впливати на певні органи або на організм у цілому. Сьогодні очевидно, що вібрація

супроводжує не тільки процеси промислового виробництва, вона виникає в транспорті, є складовою будівельних і сільськогосподарських технологій, побутових апаратів. Систематичний, надмірний вплив вібрації на живу систему спричинює виникнення «вібраційної хвороби», яка у структурі професійних захворювань становить 25,8 %. Тому боротьба з вібрацією та шумом розцінюється як одна з найскладніших проблем сучасного життя [2; 12]. Загальна вібрація, на відміну від ряду інших негативних зовнішніх впливів, належить до тих антропогенних факторів, за дії яких тісно поєднуються ефекти від подразнення екстеро-, пропріо- та інтерорецепторів. Таким чином, вплив вібрації на організм складається із прямої та опосередкованої дії на клітини та тканини [8]. Результати багатьох експериментальних робіт підтверджують поширені в останні роки погляди на вібраційний вплив як на варіант мембранопатологічного процесу, що характеризується пошкодженням морфофункціональних властивостей плазматичних мембран і мембран субклітинних структур, викликає порушення функцій мембранозв'язаних ферментів, внутрішньоклітинних органел, накопичення продуктів окиснення білків і ліпідів, зниження активності антиоксидантної системи, системне порушення мікрогемодинаміки [13; 14]. Ряд дослідників виявляє у крові осіб, що зазнали впливу вібрації, антигени печінки, нирок, серця, м'язової, нервової та сполучної тканин, а також високі титри антитіл до цих антигенів [1].

Нирка людини являє приклад складної високодиференційованої системи, різноманіття функцій якої забезпечується високим рівнем інтеграції внутрішньониркових тканинних і органних структур. У ссавців нирка – основний орган, що забезпечує виведення продуктів обміну речовин, чужорідних сполук, електролітів. Вона виконує ендокринну функцію, їй надають важливої ролі у підтриманні гомеостазу організму та забезпеченні його адаптації до умов навколишнього середовища. На цей час накопичилась велика кількість праць про стан процесів ліпопероксидації та антиоксидантного захисту при ураженні нирок, що свідчить про важливу, а іноді визначальну роль оксидативних процесів у враженні ниркової тканини. Це зрозуміло, оскільки посилення оксидативних процесів – універсальний механізм розвитку таких типових патологічних процесів як гіпоксія, запалення, імунний конфлікт й, отже, всіх пов'язаних із ними захворювань нирок. Моноцити та макрофаги, які мігрують до тканин у відповідь на дію імунних комплексів, здатні продукувати активні форми кисню, які поряд з ініціацією синтезу простагландинів з арахідонової кислоти та активацією лізосомальних протеїназ зумовлюють пошкодження базальної мембрани клубочка нирки [4].

Однак у науковій літературі відсутні відомості про вплив вібрації низьких частот на характер розвитку окисно-відновних процесів у тканинах нирок і функціонування систем антиоксидантного захисту цих органів. У зв'язку з цим мета цієї роботи – оцінити вплив вібрації в частотному інтервалі 8–32 Гц, амплітудою $0,8 \pm 0,12$ мм (інтенсивність вібраційного впливу 78–97 Дб) на функціонування двох антиоксидантних систем захисту клітини (супероксиддисмутаза – каталаза й ферментів системи глутатіону тканин нирок мишей).

Матеріал і методи досліджень

Досліди проведені на безпородних мишах-самцях приблизно одного віку й маси, яких утримували в умовах віварію на звичайному раціоні. Тварини були поділені на 5 груп. Тварини I–IV груп піддавалися щоденній 30-хвилинній вібрації із частотами 8, 16, 24 і 32 Гц із постійною амплітудою $0,8 \pm 0,12$ мм продовж 14 діб. Вібрацію спворю-

вали за допомогою електромеханічного перетворювача, підключеного до генератора сигналів низьких частот. Як генератор сигналів використовували звукову карту комп'ютера. Гармонійний сигнал формували за допомогою програми NCH Tone Generator, що дозволяла задавати необхідні параметри вібрації (частоту, амплітуду та форму сигналу), після чого сигнал подавали на підсилювач, потім – на електромеханічний перетворювач. Шумовий ефект максимально нівелювали посиленою фіксацією контейнера для тварин на майданчику вібратора. П'ята група тварин не піддавалася вібрації й використовувалася як контроль. Після останнього впливу вібрацією тварин декапітували з дотриманням вимог Міжнародних принципів Гельсінської декларації про гуманне ставлення до тварин [16] для екстирпації органів. Активність ферментів антиоксидантної системи визначали в гомогенатах тканин нирок. Гомогенати тканин готували на 0,05 М Трис-буфері з pH 7,4.

Активність каталази (КАТ) [КФ 1.11.16] вимірювали за швидкістю утилізації перекису водню (H_2O_2). Кількість H_2O_2 , що залишилась нерозкладеною, визначали за допомогою FOX-реактиву [15].

Для визначення активності супероксиддисмутази (СОД) [КФ 1.15.11] користувалися методом [5], у нашій модифікації. Дослідження активності СОД проводили спектрофотометрично при 406 нм шляхом запису кінетичної кривої, що відбиває реакцію гальмування автоокиснення кверцетину при pH 10. Активність СОД розраховували в мкмоль/(хв·мг білка) [9].

Загальну активність глутатіонредуктази (ГР) [КФ 1.6.4.2] вивчали шляхом реєстрування швидкості окиснення NADPH за присутності окисненого глутатіону (GSSG) при 340 нм [11]. Одночасно реєстрували швидкість окиснення NADPH за відсутності GSSG, що дозволяло врахувати кількість NADPH, що окиснюється NADPH-оксидазою.

Загальну активність глутатіон-S-трансферази (Г-S-T) [КФ 2.5.1.18] визначали методом, принцип якого полягає у ферментативному зв'язуванні відновленого глутатіону із хлор-2,4-динітробензолом з утворенням S-(2,4-динітрофеніл)-глутатіону, що має максимум світлопоглинання при довжині хвилі 340 нм [3].

Активність глутатіонпероксидази (ГП) [КФ 1.11.19] визначали за швидкістю окиснення відновленого глутатіону (GSH) у присутності H_2O_2 [7]. Кількість GSH після зупинки реакції визначали фотометрично (412 нм), використовуючи кольорову реакцію взаємодії SH-груп з 5,5-дитіобіс(2-нітробензойною) кислотою. Кількість відновленого глутатіону визначали за J. Sedlak та R. H. Lindsey, з 5,5-дитіобіс(2-нітробензойною) кислотою. Вміст білка в гомогенатах тканин визначали методом Лоурі.

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили в програмі Statistica. Вирогідність відмінностей між середньогруповими показниками оцінювали за допомогою непараметричного рангового критерію Уїлкоксона й однофакторного дисперсійного аналізу.

Результати та їх обговорення

Вібрація в усьому досліджуваному інтервалі частот спричинила до зниження активності СОД у тканинах нирок мишей до рівня нижче контрольного (рис. 1а). Найбільше зниження активності СОД зафіксовано у групах мишей, що перебували в умовах дії вібрації з частотами 8 і 24 Гц (48,5 і 63,2 % відповідно). У групах мишей, що зазнали вібрації з частотами 16 і 32 Гц, зниження активності СОД склало 33,8 і 36,8 % відповідно. Така реакція СОД на дію вібрації може бути пов'язана з ушкодженням молекули ферменту активними продуктами перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ).

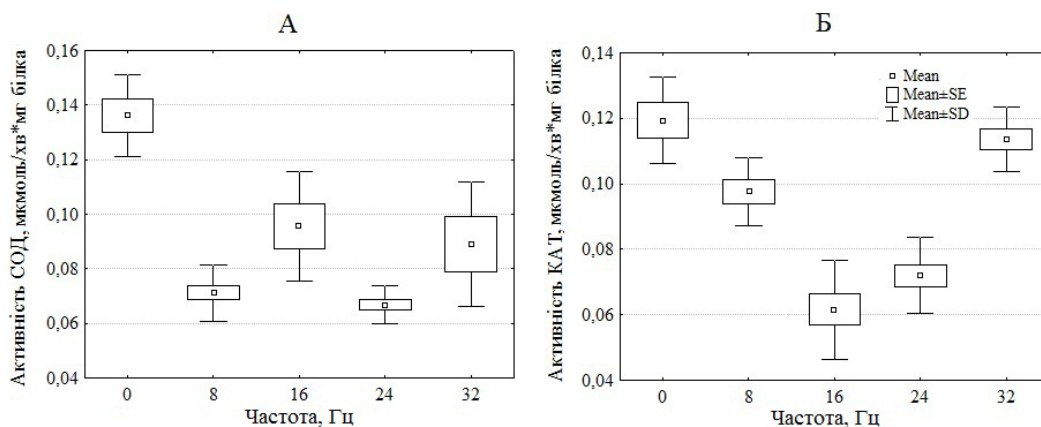


Рис. 1. Зміни активностей СОД (А) та КАТ (Б) у тканинах нирок залежно від частоти вібрації:
 0 – контроль, $\pm SE$ – похибка середнього, $\pm SD$ – середнє квадратичне відхилення

Вібрація з частотою 32 Гц не викликала достовірних змін активності каталази у тканинах нирок (рис. 1б). У той же час, у групах мишей, що зазнали дії вібрації із частотами 8, 16 і 24 Гц, активність каталази в тканинах нирок суттєво знизилася. Зниження активності каталази може бути зумовлене інгібувальною дією вільних радикалів на гемінове залізо активного центру ферменту. З іншого боку, зниження активності каталази може бути пов'язане з недостатньою кількістю субстрату (H_2O_2), що утворюється у супероксидисмутазній реакції, оскільки активність СОД знижується. Це твердження уявляється імовірнішим, оскільки отримані дані свідчать про підвищену активність ГП у тканинах нирок тварин, порівняно з рівнем контролю (рис. 2а). Виняток складає група тварин, що піддавалася дії вібрації з частотою 16 Гц. Для тканин нирок цих тварин активність ГП знижена порівняно з контролем на 33 %. Відомо, що спорідненість ГП до H_2O_2 вища, ніж у каталази, тому ГП ефективніше працює за низьких концентрацій субстрату, тоді як у захисті клітин від окислювального стресу, зумовленого високими концентраціями H_2O_2 , ключову роль відіграє каталаза.

Однак існує думка, що відновлення пероксиду водню може служити додатковим джерелом молекулярного кисню [10]. Каталаза, виконуючи антиоксидантну функцію, компенсаторно підвищує коефіцієнт корисного використання екзогенного кисню в енергетичних цілях унаслідок часткового повернення в метаболічні ланцюги окисного фосфорилування того молекулярного кисню, який відновлюється в організмі одноелектронним шляхом. Розкладання H_2O_2 до O_2 і води в каталазній реакції відбувається з викидом вільної енергії електронів, кінцевим акцептором яких є молекулярний кисень, що використовується в легенях на оксигенацію гемоглобіну або компенсацію гіпоксії у тканинах. Із цього погляду небажаним процесом є перемикання каталазного розкладу H_2O_2 на глутатіонпероксидазне, у ході якого утворюється дві молекули води. У зв'язку із цим зниження активностей каталази та СОД нирок, що відбувається на фоні підвищення активності ГП, свідчить про стан тканинної гіпоксії цих органів.

Зміни активності Г-S-T нирок мишей контрольної та експериментальних груп тварин показано на рисунку 2б. Г-S-T – важливий компонент антиоксидантної ферментної системи, що захищає клітину від несприятливих ефектів переокиснених метаболітів пероксидного стресу. Активність Г-S-T у тканинах нирок після впливу вібрації на всіх досліджуваних частотах вірогідно вища контролю. Суттєве зростання активності цього ферменту (майже удвічі) зафіксовано за дії вібрації з частотою 16 Гц.

Відомо, що Г-S-T індукується токсичними електрофільними метаболітами, тому зростання її активності може свідчити про накопичення останніх у нирках тварин. Оскільки глутатіонтрансфераза при виконанні своїх функцій використовує відновлений глутатіон (GSH) як субстрат, можна чекати зниження вмісту відновленого глутатіону у тканинах нирок мишей. GSH – також субстрат і для ГП, зниження кількості якого може привести до інактивації ферменту. У зв'язку з цим значне підвищення активності Г-S-T у нирках мишей, що піддавалися дії вібрації з частотою 16 Гц, може бути поясненням зниження активності ГП до рівня нижче за контроль.

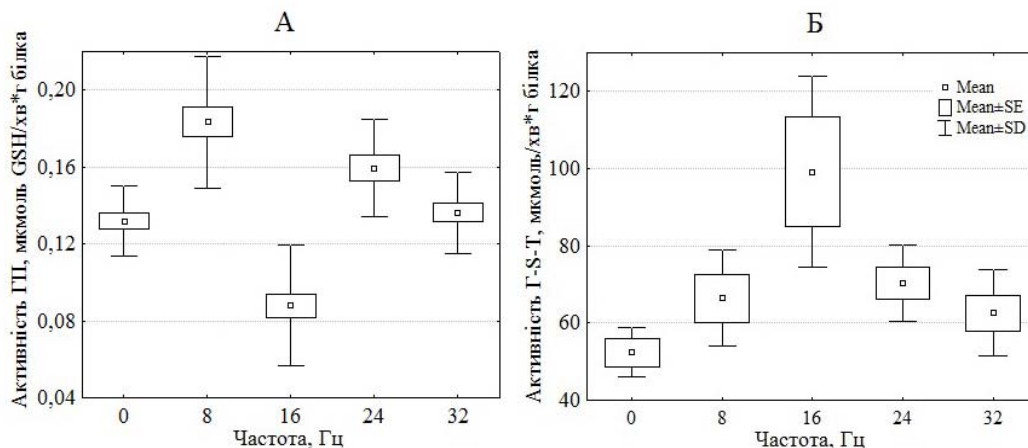


Рис. 2. Зміни активностей ГП (А) та Г-S-T (Б) у тканинах нирок залежно від частоти вібрації: позначення див. рис. 1

Глутатіонредуктаза каталізує оборотне NADPH-залежне відновлення окисненого глутатіону (GSSG). Цей фермент поряд із ГП утворює глутатіонзалежний ферментний ланцюг, що забезпечує руйнування перекисних сполук за механізмом, який не викликає утворення вільних радикалів. Тому для цих ферментів характерна висока позитивна кореляція. Характер змін активності ГР нирок мишей у контрольній та експериментальних групах показано на рисунку 3а.

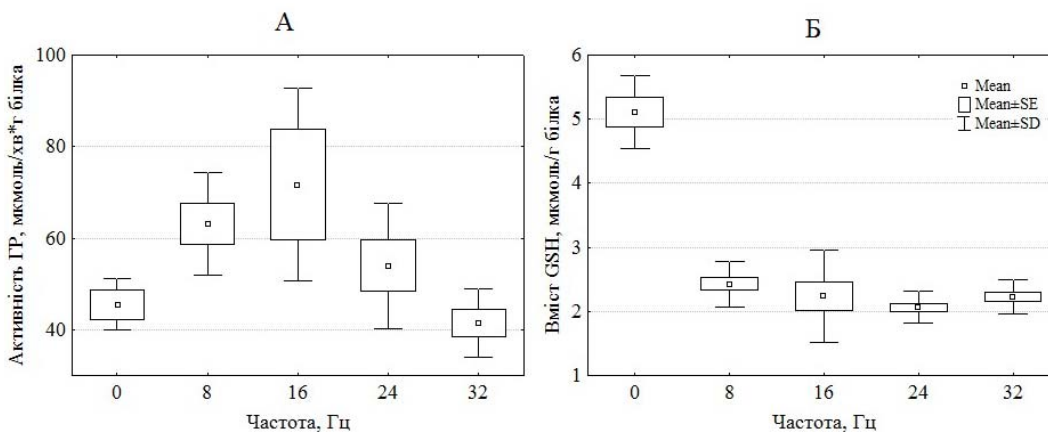


Рис. 3. Зміни активностей ГР (А) та GSH (Б) у тканинах нирок залежно від частоти вібрації: позначення див. рис. 1

Активність цього ферменту у тканинах нирок після впливу вібрації з частотами 8, 16, 24 Гц достовірно вища за контроль, а після впливу з частотою 32 Гц достовірно не відрізняється від контролю. Наведені дані корелюють з активністю ГП. Посилення активності ГП викликає зростання рівня окисненого глутатіону, який відновлюється ГР. Виняток складають дані, отримані для групи тварин, що піддавалися вібрації з частотою 16 Гц. Підвищення активності ГР на 58 % пов'язане зі зниженням активності ГП у нирках цієї групи мишей.

Видно, що вібрація на усіх досліджуваних частотах викликала достовірне зниження відновленого глутатіону у тканинах нирок (рис. 3б). В експериментальних групах вміст GSH знизився від 52,0 % (частота 8 Гц) до 59,7 % (частота 24 Гц). У середньому зниження GSH у нирках мишей склало 55,0 % від рівня контролю. Виявлене нами зниження кількості GSH може бути пов'язане з інтенсивним використанням відновленого глутатіону у метаболічних процесах, зокрема при підвищенні активностей ферментів антиоксидантного захисту (глутатіонпероксидази та глутатіонтрансферази), що відповідає отриманим експериментальним даним. Незважаючи на підвищення активностей ГР і Г-S-T у нирках тварин, що піддавалися дії вібрації з частотою 16 Гц, та зниження активності ГП, виникає дефіцит вмісту GSH. Це дає право припустити, що низькочастотна вібрація впливає на синтез глутатіону, за рахунок чого фіксується значне зниження цього метаболіту у тканинах нирок мишей.

Треба також ураховувати, що GSH – основний компонент редокс-буфера клітини, що стійко підтримує характерне для неї відновлювальне середовище [6]. Зниження вмісту GSH може також свідчити про зниження кількості NADPH, основного відновлювача у клітинах і коферменту багатьох ферментів.

Отримані дані свідчать про порушення здатності організму адекватно відповідати на такий стресовий фактор як вібрація. Про це свідчать різноспрямовані зміни активностей окислювальних процесів і ферментів антиоксидантного захисту тканин при вібраційному впливі різних частот.

Висновки

1. Вібрація із частотами 8–24 Гц викликає зниження активностей СОД і каталази на фоні зростання активностей глутатіонпероксидази та глутатіонтрансферази у тканинах нирок. Наслідок подібної зміни активностей ферментів – зниження кількості екзогенного кисню (тканинна гіпоксія).

2. Певний дисбаланс активностей ферментів системи глутатіону, зокрема за дії вібрації з частотою 16 Гц, дозволяє припустити негативний вплив низькочастотної вібрації на систему синтезу глутатіону у клітинах.

3. Ферменти антиоксидантної системи можуть використовуватися як маркери наслідків оксидантного стресу, викликаного вібрацією.

Бібліографічні посилання

1. **Бобров С. В.** Функциональная морфология и ультраструктурные изменения тимуса при воздействии вибрации и их коррекция с использованием эссенциальных фосфолипидов / С. В. Бобров, А. В. Ефремов, Г. М. Вакулин // Бюлл. СО РАМН. – 2002. – Т. 104, № 2. – С. 129–137.
2. **Итоги** и перспективы научных исследований по проблеме формирования сенсорного конфликта при воздействии шума и вибрации в условиях производства / В. С. Руковишников, В. А. Панков, М. В. Кулешова и др. // Медицина труда и промышленная экология. – 2009. – № 1. – С. 1–5.

3. **Карпищенко А. И.** Глутатионзависимая антиоксидантная система в некоторых тканях крыс в условиях острого отравления дихлорэтаном / А. И. Карпищенко, С. И. Глушков, В. В. Смирнов // Токсикологический вестник. – 1997. – № 3. – С. 17–23.
4. **Король Л. В.** Особливості реагування антиоксидантної системи організму на розвиток захворювань нирок різної етіології / Л. В. Король, Г. Г. Нікуліна, О. В. Стребкова // Український журнал нефрології та діалізу. – 2004. – № 1. – С. 28–30.
5. **Костюк В. А.** Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина / В. А. Костюк, А. И. Потапович, Ж. В. Ковалева // Вопр. мед. химии. – 1990. – № 2. – С. 88–91.
6. **Мартинович Г. Г.** Редокс-гомеостаз клеток / Г. Г. Мартинович, С. И. Черенкевич // Успехи физиологических наук. – 2008. – Т. 39, № 3. – С. 29–44.
7. **Разыграев А. В.** Определение глутатионпероксидазной активности в сыворотке крови человека с использованием пероксида водорода и 5,5-дитиобис(2-нитробензойной) кислоты / А. В. Разыграев, А. В. Арутюнян // Клинич. лаб. диагностика. – 2006. – № 6. – С. 13–16.
8. **Современные лабораторные маркеры ранних стадий вибрационной патологии** / В. А. Кирьяков, Н. А. Павловская, А. В. Сухова, Л. И. Антошина // Вестник РАМН. – 2005. – № 3. – С. 27–30.
9. **Соотношение между величинами активности ферментов антиоксидантной системы в различных тканях интактных крыс** / О. В. Левадная, Г. В. Донченко, В. М. Валущина и др. // Укр. биохим. журн. – 1998. – Т. 70, № 6. – С. 53–58.
10. **Сторожук П. Г.** Ферменты прямой и косвенной антирадикальной защиты эритроцитов и их роль в инициации процессов оксигенации гемоглобина, антибактериальной защите и делении клеток // Вестник интенсивной терапии. – 2003. – № 3. – С. 8–13; № 4. – С. 39–43.
11. **Юсупова Л. Б.** О повышении точности определения активности глутатионредуктазы эритроцитов // Лаб. дело. – 1989. – № 4. – С. 19–21.
12. **Bovenzi M.** A longitudinal study of low back pain and daily vibration exposure in professional drivers // Industrial Health. – 2010. – Vol. 48. – P. 584–595.
13. **Damijan Z.** The effects of low-frequency vibrations on hepatic profile of blood // Eur. Phys. J., Special Topics. – 2008. – Vol. 154. – P. 45–49.
14. **Effects of vibration and resistance training on neuromuscular and hormonal measures** / T. Kvorning, M. Bagger, P. Caserotti, K. Madsen // Eur. J. Appl. Physiol. – 2006. – Vol. 96, N 5. – P. 615–625.
15. **Ou P.** Erythrocyte catalase inactivation (H_2O_2 production) by ascorbic acid and glucose in presence of aminotriazole: Role of transition metals and relevance to diabetes / P. Ou, S. P. Wolf // Biochem. J. – 1994. – Vol. 303. – P. 935–940.
16. **World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects.** – UMS, 2002. – P. 42–46.

Надійшла до редколегії 14.12.2010

УДК 616.89-008.1:615.86

А. Л. Дроздов, Е. М. Демченко, А. Эйяд, О. П. Неруш

Днепропетровская государственная медицинская академия

ВЛИЯНИЕ ПСИХОТРОПНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ НА СПОНТАННУЮ ПОВЕДЕНЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ БЕЛЫХ КРЫС

Установлено, что использование нейролептиков в условиях экспериментального психоза сопровождалось более выраженным, чем у интактных животных, понижением подвижности, опытнического поведения, эмоциональности. В отличие от этого, действие атипичного нейролептика сульпирида характеризовалось угнетением тревожности при повышении подвижности. Ноотропные препараты приводили к усилению подвижности и эмоциональной активности. Установлены фармакологические эффекты нейролептиков, антидепрессантов и ноотропных препаратов, которые могут применяться в клинической практике для оптимизации лечения больных с психическими расстройствами, в частности шизофренией.

О. Л. Дроздов, О. М. Демченко, А. Ейяд, О. П. Неруш

Дніпропетровська державна медична академія

ВПЛИВ ПСИХОТРОПНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ НА СПОНТАННУ ПОВЕДІНКОВУ АКТИВНІСТЬ БІЛИХ ЩУРІВ

Установлено, що використання нейролептиків в умовах експериментального психозу супроводжувалося більше вираженням, ніж у інтактних тварин, зниженням рухливості, дослідницької поведінки, емоційності. На відміну від цього, дія атипичного нейролептика сульпіриду характеризувалась пригніченням тривожності при підвищенні рухливості. Ноотропні препарати викликали посилення рухової та емоційної активності. Встановлено фармакологічні ефекти нейролептиків, антидепресантів і ноотропних препаратів, які можуть застосовуватись у клінічній практиці для оптимізації лікування хворих із психічними розладами, зокрема шизофренією.

A. L. Drozdov, E. M. Demchenko, A. Ejyad, O. P. Nerush

Dnipropetrovsk State Medical Academy

INFLUENCE OF PSYCHOTROPIC DRUGS ON SPONTANEOUS BEHAVIORAL ACTIVITY OF ALBINO RATS

Data obtained showed that using of neuroleptics in conditions of experimental psychosis was accompanied by the decreasing of mobility, investigative behavior and emotionality in experimental animals more than in intact ones. As opposed to that, the action of atypical antipsychotic drug – sulphiride was characterized by the anxiety decreasing but the mobility increasing. The nootropic agents resulted in increasing of motor and emotional activity. The established pharmacological effects of neuroleptics, antidepressants and nootropic agents may use in clinical practice for treatment optimization of the patients with mental disability including schizophrenia.

Введение

Оптимизация фармакотерапевтического лечения больных с психопатологическими расстройствами чаще всего достигается путем назначения различных психо-

тропных препаратов [4]. К числу наиболее мощных лекарственных средств (ЛС), используемых для лечения психозов, относятся нейролептики [9; 13]. Общеизвестно, что основным фармакологическим эффектом нейролептиков является антипсихотическое действие [9; 13]. Эти изменения связываются с воздействием нейролептиков на различные субпопуляции дофаминовых рецепторов [2]. В последнее время при лечении некоторых форм шизофрении, деменций и псевдодементных состояний в качестве препаратов с антипсихотическим действием используют антидепрессанты. Данные ЛС могут также, как и нейролептики, влиять на когнитивные реакции в процессе формирования психотического состояния. Такой эффект рассматривается как результат непосредственного воздействия препаратов на дофаминовые и серотониновые рецепторы.

Одной из сравнительно поздно появившихся групп психотропных ЛС являются ноотропные препараты, которые избирательно стимулируют познавательную деятельность и мнестические процессы [10]. Среди ксенобиотиков с данным типом биологической активности наиболее широко в клинической практике используются пирацетам и его аналоги, а сам пирацетам играет роль эталонного (для данной группы) препарата [10]. Одной из перспективных групп ноотропных ЛС являются вещества пептидной природы, например, производные вазопрессина [7]. Известно, что данные препараты улучшают процессы обучения и памяти, когнитивные способности, увеличивают сохранность энграмм долговременной памяти при использовании условных эмоционально-отрицательных подкрепляющих стимулов у животных [3; 7].

В экспериментальной практике выраженность антипсихотического эффекта ЛС оценивается по степени блокирования поведенческих расстройств, вызванных использованием дофаминергических средств различного типа действия [5]. В связи с этим, цель наших исследований – оценить особенности поведенческой активности интактных животных при действии психотропных препаратов (нейролептиков, антидепрессантов и ноотропных средств) для коррекции экспериментального сиднокарбового психоза, представленного нами в виде альтернативной модели «психотического эквивалента».

Материал и методы исследований

Изменения показателей поведения крыс определяли в установке «открытое поле» размером 100 × 100 см, разбитой на 16 квадратов и 9 отверстий – «норок» [1]. Животное помещали в центр поля и наблюдали за ним 3 минуты. Подсчитывали количество пересеченных горизонтальных квадратов (горизонтальная подвижность), стоек на задних лапках (вертикальная подвижность), число обследованных «норок» (исследовательская активность), продолжительность груминга и количество болюсов дефекаций (эмоциональность).

Эксперименты проводились на белых крысах линии Wistar массой 210–230 г. Экспериментальный психоз создавали путем внутрижелудочного введения сиднокарба в дозе 5 мг/кг 2 раза в день в течение 14 дней. Статистическую обработку результатов проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента [6].

Для изучения фармакологической активности психотропных средств использовали следующие препараты: аминазин – 5 мг/кг, галоперидол, дроперидол – по 0,25 мг/кг, сульпирид – 100 мг/кг, мелипрамин и амитриптилин – по 2,5 мг/кг, пирацетам – 500 мг/кг, аргинин-вазопрессин (АВП) – 1 мкг/кг, 2-глицин-дезглицинамид-аргинин-вазопрессин (2Г-ДГА-АВП) – 20 мкг/кг. Исследуемые лекарственные средства (аминазин, галоперидол, дроперидол, мелипрамин, амитриптилин, пирацетам, АВП и 2Г-ДГА-АВП) вводили внутривентрикулярно, а сульпирид – внутривентрикулярно через 15–20 минут после последнего применения сиднокарба. Животным контрольной группы

вводили изотонический раствор хлористого натрия (1 мл/кг массы). Регистрируемые поведенческие показатели определяли через 30–40 минут после применения ЛС.

Результаты и их обсуждение

Все используемые в наблюдении группы нейротропных средств (нейролептики, антидепрессанты, ноотропные вещества) и отдельные препараты вызывали у интактных животных сходные изменения изучаемых показателей поведения. Эти сдвиги характеризовались уменьшением горизонтальной и вертикальной двигательной активности, количества болюсов дефекаций и, в меньшей степени, продолжительности грумминга и числа обследованных норок.

Сопоставление эффектов, наблюдавшихся на фоне предварительного введения животным нейротропных средств (табл. 1), показало, что они выражены в разной степени. Применение аминазина приводило к резкому угнетению горизонтальной (на 77,5 %) и вертикальной (на 88,0 %) двигательной активности, не оказывая существенного воздействия на другие исследуемые показатели. Введение галоперидола существенно уменьшало горизонтальную двигательную активность и количество болюсов дефекаций, на 61,0 и 97,3 % соответственно. Инъекции дроперидола вызывали существенное угнетение горизонтальной (на 82,7 %) и вертикальной (на 94,4 %) двигательной активности, исчезновение болюсов дефекации и грумминга. Таким образом, дроперидол проявлял наиболее выраженное угнетающее воздействие на показатели поведения белых крыс.

Таблица 1

Влияние нейротропных средств на показатели поведения ($M \pm m$) интактных животных

Серии исследований	Горизонтальная двигательная активность	Вертикальная двигательная активность	Продолжительность грумминга, с	Количество болюсов дефекаций	Количество обследованных норок
Контроль	22,14 ± 1,85	4,17 ± 0,47	7,50 ± 1,53	2,71 ± 0,36	1,98 ± 0,31
Аминазин	5,00* ± 2,03	0,50* ± 0,25	6,83 ± 3,58	1,83 ± 0,96	2,17 ± 1,30
Галоперидол	13,50* ± 3,16	3,50 ± 1,10	11,17 ± 4,18	0,17* ± 0,15	2,33 ± 0,84
Дроперидол	3,83* ± 1,64	0,33* ± 0,19	0*	0*	1,33 ± 0,56
Сульпирид	4,33* ± 0,84	0,83* ± 0,50	7,83 ± 3,15	0*	0,67* ± 0,19
Мелипрамин	18,00 ± 3,70	5,33 ± 1,10	3,67 ± 1,77	0*	2,50 ± 0,66
Амитриптилин	4,33* ± 0,84	1,33* ± 0,19	6,33 ± 3,66	0*	1,83

Примечание: * $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Атипичный нейролептик сульпирид также существенно изменял поведение интактных животных в тесте «открытое поле». Введение данного фармакопрепарата сопровождалось уменьшением количества пересеченных квадратов (на 80,5 %), подъемов на задние лапы (на 66,2 %), обследованных ложных норок (на 66,2 %), а также отсутствием болюсов дефекаций, что свидетельствует об уменьшении тревожности крыс [8; 11; 14].

Несколько иные эффекты наблюдались на фоне применения изучаемых антидепрессантов (табл. 2). После применения мелипрамина отмечалось только существенное снижение числа болюсов дефекаций, тогда как использование amitriptilina приводило также к снижению числа пересеченных квадратов (на 80,5 %; $p < 0,05$) и «вертикальных стоек» (на 68,1 %; $p < 0,05$) у животных.

Сходные изменения наблюдались на фоне использования веществ, стимулирующих процессы памяти (табл. 2). Пирацетам приводил к уменьшению горизонтальной (на 53,3 %; $p < 0,05$) и вертикальной (на 56,1 %; $p < 0,05$) двигательной активности, а также снижению количества болюсов дефекаций. В то же время этот фармакопрепарат

проявлял тенденцию к увеличению (на 26,3 %) числа обследованных норок. Предварительное введение аргинин-вазопрессина вызывало угнетение всех компонентов поведенческой активности. Однако порог статистической значимости был превышен по показателям количества обследованных «норок» (на 65,2 %), грумминга и болюсов дефекаций. Меньшее воздействие на показатели поведения оказывал близкий аналог антидиуретического гормона 2Г-ДГА-АВП, который существенно уменьшал лишь эмоциональность животных.

Таблица 2

Влияние веществ с ноотропной активностью на поведение интактных крыс ($M \pm m$)

Серии исследований	Горизонтальная двигательная активность	Вертикальная двигательная активность	Продолжительность грумминга, с	Количество болюсов дефекаций	Количество обследованных норок
Контроль	22,14 ± 1,85	4,17 ± 0,47	7,50 ± 1,53	2,71 ± 0,36	1,98 ± 0,31
Пирацетам	10,33* ± 2,89	1,83* ± 0,64	6,33 ± 4,93	0*	2,50 ± 1,02
АВП	12,33 ± 4,49	2,17 ± 0,96	0*	0*	0,67* ± 0,30
2Г-ДГА-АВП	16,33 ± 4,33	3,33 ± 1,05	11,66 ± 6,77	0*	4,33 ± 1,50

Примечание: см. табл. 1.

Таким образом, характерными чертами влияния всех исследуемых препаратов у интактных животных являлось уменьшение подвижности, подавление реакции тревоги и эмоционального напряжения, а также исследовательской активности (за исключением аргинин-вазопрессина и его аналога 2Г-ДГА-АВП).

Использование изучаемых нейротропных средств на фоне экспериментального «психотического эквивалента» изменяло характер влияния данных препаратов на спонтанную поведенческую активность крыс (табл. 3).

Таблица 3

Влияние нейротропных средств на поведение животных в условиях сформированного экспериментального психоза ($M \pm m$)

Серии исследований	Горизонтальная двигательная активность	Вертикальная двигательная активность	Продолжительность грумминга, с	Количество болюсов дефекаций	Количество обследованных норок
Контроль	18,25 ± 1,32	1,93 ± 0,31	1,91 ± 1,35	2,96 ± 0,27	2,55 ± 0,26
Экспериментальный психоз	84,55* ± 8,17	3,33 ± 0,67	8,76 ± 3,34	1,58* ± 0,26	4,55 ± 1,48
Аминазин	20,14** ± 0,89	0***	4,43* ± 1,52	0***	1,57 ± 1,01
Галоперидол	16,47** ± 5,16	0***	5,12* ± 1,67	0,5*** ± 0,25	1,60 ± 0,74
Дроперидол	14,63** ± 4,64	0,63** ± 0,58	6,00 ± 2,97	1,00 ± 0,81	1,50 ± 0,79
Сульпирид	96,43* ± 15,33	2,57 ± 1,34	6,57 ± 3,26	0***	1,43 ± 0,85
Мелипрамин	127,66* ± 23,55	5,75 ± 2,72	33,75 ± 18,53	0***	10,38 ± 4,83
Амитриптилин	38,88*** ± 7,63	0,63** ± 0,58	3,88* ± 2,21	1,0* ± 0,59	2,86 ± 1,13

Примечание: см. табл. 1.

Введение аминазина приводило к достоверному уменьшению (на 76,2 %) горизонтальной двигательной активности животных по сравнению с группой «экспериментальный психоз». При сравнении с исходными величинами сдвиги данного показателя имели некоторую (на 10,4 %) тенденцию к увеличению. Этот изучаемый типичный нейрорептик существенно, по сравнению с исходным фоном, снижал (на 62,8 %) продолжительность грумминга, а также подавлял дефекацию и вертикальную двигательную активность у крыс. Это, вероятно, может свидетельствовать о том, что аминазин в наших условиях проявляет способность подавлять исследовательскую активность и

тревожность животных. Галоперидол и дроперидол оказывали сходное с аминазином воздействие на показатели поведения крыс. Аминазин и галоперидол резко тормозили эмоциональный компонент поведения. Еще одной особенностью эффектов дроперидола в условиях сформированного психотического эквивалента является то, что, в отличие от галоперидола, он не уменьшает длительность грумминга и количество болюсов дефекации. Возможно, подобные изменения, наблюдающиеся в условиях психопатологии, объясняют тот факт, что данный нейролептик находит преимущественное применение в анестезиологической практике [12; 15]. Отличием между ними являлось несколько более выраженное угнетение ГДА в условиях применения нейролептиков бутирофенонового ряда.

Существенно отличалось поведение крыс со сформированным экспериментальным психозом на фоне предварительного введения атипичного нейролептика сульпирида. В этих условиях достоверное увеличение подвижности крыс по сравнению с исходным фоном достигало 428,4 %, что несколько превышало значение показателя, установленного после завершающего введения сиднокарба. Вместе с тем, данный нейролептик подавлял дефекацию у крыс, что, очевидно, отражает снижение тревожности. Остальные регистрируемые параметры спонтанной поведенческой активности крыс под влиянием сульпирида существенно не изменялись.

Различное воздействие на изучаемые показатели поведения оказывало введение антидепрессантов мелипрамина и amitриптилина. Мелипрамин, в данных условиях наблюдения, вызывал резкое увеличение числа пересеченных квадратов, которое практически в 6 раз превосходило исходные показатели. Тенденцию к увеличению имели вертикальная двигательная активность, продолжительность грумминга и количество обследованных ложных норок. Вместе с тем, данный препарат подавлял дефекацию у крыс. Таким образом, действие этого антидепрессанта в условиях экспериментального психоза проявлялось в увеличении всех показателей поведения животных, связанных с двигательной активностью, при одновременном угнетении тревожности. Другие сдвиги установлены после использования amitриптилина, который существенно уменьшал горизонтальную (на 54,0 %) и вертикальную (на 81,1 %) двигательную активность крыс по сравнению с группой «экспериментальный психоз», хотя первый параметр существенно превышал исходные величины (на 113,0 %). Продолжительность грумминга и количество болюсов дефекаций также существенно снижались по сравнению с исходным фоном.

Принципиальное отличие воздействия на поведение животных в условиях смоделированных психопатологических расстройств выявили ноотропные препараты (табл. 4). Использование пирacetama приводило к резкому увеличению горизонтальной двигательной активности, которая в 7,9 раза превосходила исходные показатели. Аналогичные сдвиги наблюдались при исследовании количества стоек – ВДА увеличивалась в 4,3 раза ($p < 0,05$). Длительность грумминга в этих условиях наблюдений статистически значимо увеличивалась как по сравнению с исходными (на 168,7 %), так и с показателями (на 265,3 %), установленными в условиях сформированного экспериментального психоза. Применение данного ноотропного средства практически полностью подавляло как процессы дефекации у крыс, так и обследование «ложных» норок.

Аргинин-вазопрессин, подобно пирacetаму, стимулировал горизонтальную и вертикальную подвижность животных по сравнению с исходным фоном, а также прекращал выделение болюсов дефекаций. Однако, в отличие от родоначальника группы ноотропных средств, введение данного ЛС сопровождалось уменьшением (на 83,2 %)

продолжительности грумминга и увеличением в 2,5 раза количества заглядываний в норки, по сравнению с исходными показателями ($p < 0,05$).

Таблица 4

Влияние ноотропных средств на поведение животных в условиях сформированного экспериментального психоза ($M \pm m$)

Серии исследований	Горизонтальная двигательная активность	Вертикальная двигательная активность	Продолжительность грумминга, с	Количество болюсов дефекаций	Количество обследованных норок
Контроль	18,25 ± 1,32	1,93 ± 0,31	11,91 ± 1,35	2,96 ± 0,27	2,55 ± 0,26
Экспериментальный психоз	84,55* ± 8,17	3,33 ± 0,67	8,76 ± 3,34	1,58* ± 0,26	4,55 ± 1,48
Пирацетам	163,00* ± 39,01	8,33* ± 3,01	32,00*** ± 6,74	0,33*** ± 0,14	0***
АВП	139,00* ± 36,15	9,33* ± 3,11	2,00* ± 0,82	0,33*** ± 0,14	6,67* ± 1,53
2Г-ДГА-АВП	97,75* ± 23,41	5,25 ± 2,27	4,00* ± 1,73	0,25*** ± 0,11	0***

Примечание: см. табл. 1.

Близкий аналог АВП-2Г-ДГА-АВП сохранил подвижность крыс на уровне показателей группы «экспериментальный психоз». Использование данного пептида приводило к уменьшению длительности грумминга (на 66,4 % по сравнению с исходной величиной), а также к подавлению как норкового рефлекса, так и процессов дефекации у крыс.

Таким образом, ноотропные препараты в условиях экспериментального психоза еще в большей степени, чем у интактных особей, усиливают горизонтальную и вертикальную двигательную активность, ослабляя при этом эмоциональность животных, по разному влияют на продолжительность грумминга и исследовательскую деятельность животных.

Выводы

Использование нейролептиков (аминазина и галоперидола) в условиях экспериментального психоза мозга не только сохраняет, но и увеличивает выраженность специфической активности, что проявляется в подавлении подвижности, агрессивности, исследовательского поведения и тревожности крыс. В отличие от этого, действие сульпирида характеризовалось снижением эмоциональности при увеличении подвижности и агрессивности крыс. Ноотропные препараты (в первую очередь пирацетам) приводили к увеличению как подвижности, так и тревожности у белых крыс.

Библиографические ссылки

1. Буреш Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Д. Хьюстон. – М. : Высшая школа, 1991. – 342 с.
2. Громов Л. А. Функциональная роль нейроспецифического белка S-100 в процессах памяти / Л. А. Громов, Л. П. Сыроватская // Журн. высшей нервн. деятельности им. И. П. Павлова. – 1991. – Т. 41, № 1. – С. 60–65.
3. Коваль Г. В. Ноотропные средства. – Волгоград : Нижн.-Волж. кн. изд-во, 1990. – 368 с.
4. Козловский В. Л. Экспериментальное изучение действия цитолопрама, оланзапина и их комбинации в тестах, отражающих «антипсихотическую», «антидепрессивную» и «анксиолитическую» активность / В. Л. Козловский, О. Г. Кенунен, А. В. Храброва // Эксперим. и клинич. фармакол. и токсикол. – 2008. – Т. 71, № 3. – С. 6–10.
5. Кудрин В. С. Влияние амитриптилина, флуоксетина и тиопентина на соединения моноаминов и их метаболизм в структурах мозга крыс / В. С. Кудрин, В. М. Мосин, П. М. Клодт // Эксперим. и клинич. фармакол. и токсикол. – 2010. – Т. 73, № 3. – С. 7–10.
6. Лакин Г. В. Биометрия. – М. : Высшая школа, 1990. – 352 с.

7. **Молодавкин Г. М.** Вещество с широким спектром действия для лечения комплексных нервно-психических расстройств / Г. М. Молодавкин, Ж. Алдармаа // Эксперим. и клинич. фармакол. и токсикол. – 2010. – Т. 73, № 3. – С. 11–14.
8. **Нейрометаболическая** фармакотерапия / Под ред. Е. М. Бурцева, О. А. Громова. – М. : Лань, 2000. – 224 с.
9. **Островская Р. У.** Ослабление дефицита предстимульного торможения дипептиновым аналогом нейротензина / Р. У. Островская, Н. А. Крупина, Т. А. Гудашева // Эксперим. и клинич. фармакол. и токсикол. – 2009. – Т. 72, № 5. – С. 3–7.
10. **Фирстова Ю. Ю.** Влияние ноотропных препаратов на уровень BDNF в гиппокампе и коре мозга мышей с различной эффективностью исследовательского поведения / Ю. Ю. Фирстова, О. В. Долотов, Е. А. Кондрахин // Эксперим. и клинич. фармакол. и токсикол. – 2009. – Т. 72, № 3. – С. 3–6.
11. **Ярош А. К.** Современные ноотропные средства и особенности их клинической фармакологии // Клінічна фармакологія. – 2002. – № 12. – С. 7–18.
12. **Angel I.** Glucostatic regulation of (+) - [³H] amphetamine binding in the hypothalamus: Correlation with Na⁺-K⁺-ATPase activity / I. Angel, R. L. Hauger // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2003. – Vol. 101, N 32. – P. 1230–1233.
13. **Berardeli A.** Behavioral and EEG effects induced by amphetamine like in rats / A. Berardeli, L. Caposaccia // Pharmacol. Res. Commun. – 2001. – Vol. 15. – P. 1011–1012.
14. **Flood J. F.** The pharmacology of post-trial memory in septum / J. F. Flood, S. A. Farr, K. Neru // Europ. J. of Pharmacology. – 1998. – Vol. 350, N 1. – P. 31–38.
15. **Kalpana M.** Effects of amphetamine analogs on neurotensin concentrations in rat brain / M. Kalpana, A. Anita, M. Johnson // Pharmacol. – 2003. – Vol. 151, N 8. – P. 201–205.

Надійшла до редколегії 02.04.2011

УДК 614.2+669.013

Т. В. Єрошкіна, С. С. Борисенко, Г. В. Даниленко, Н. Г. Положай

Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара

РОЛЬ КОМІСІЙ ПІДПРИЄМСТВ З АТЕСТАЦІЇ РОБОЧИХ МІСЦЬ У ПРОФЕСІЙНІЙ РЕАБІЛІТАЦІЇ ОСІБ З ОБМЕЖЕНИМИ МОЖЛИВОСТЯМИ

Оцінено адекватність працевлаштування осіб з обмеженими можливостями на підприємствах залежно від стану їх здоров'я та умов виробничого середовища. На робочих місцях, атестованих за умовами праці, число випадків захворювань серед робітників менше утричі, ніж на не атестованих, а днів непрацездатності – у 2,6 раза. Розроблено концепцію вдосконалення атестації робочих місць, зайнятих інвалідами, з метою підвищення ефективності їх професійної реабілітації.

Т. В. Ерошкина, С. С. Борисенко, Г. В. Даниленко, Н. Г. Положай

Днепропетровский национальный университет им. Олеся Гончара

РОЛЬ КОМИССИЙ ПРЕДПРИЯТИЙ ПО АТТЕСТАЦИИ РАБОЧИХ МЕСТ В ПРОФЕССИОНАЛЬНОЙ РЕАБИЛИТАЦИИ ЛИЦ С ОГРАНИЧЕННЫМИ ВОЗМОЖНОСТЯМИ

Оценена адекватность трудоустройства лиц с ограниченными возможностями на предприятиях в зависимости от состояния их здоровья и условий производственной среды. На рабочих местах, аттестованных по условиям труда, заболеваемость работающих меньше в три раза, чем на не аттестованных, а дней нетрудоспособности – в 2,6 раза. Разработана концепция совершенствования аттестации рабочих мест, занятых инвалидами, с целью повышения их профессиональной реабилитации.

T. V. Yerochkina, S. S. Borisenko, G. V. Danilenko, N. G. Pologaj

Oles' Honchar Dnipropetrovsk National University

ROLE OF ENTERPRISE'S WORKPLACE CERTIFICATION COMMITTEES IN THE VOCATIONAL REHABILITATION OF PERSONS WITH DISABILITIES

The adequacy of physically challenged persons' employment in companies depending on their health status and working environment was assessed. The sickness rate of workers on certified workplaces with safety labor conditions is three times less than on not certified ones, and the average disability days – 2.6 times less. The concept of improving the certification of workplaces of the disabled persons for the purpose of advance of their vocational rehabilitation is developed.

Вступ

За класифікацією Всесвітньої організації охорони здоров'я реабілітація населення поділяється на медичну, соціальну та професійну [8]. Найскладнішою та недостатньо розробленою проблемою є професійна реабілітація. Це – комплекс державних і

суспільних заходів, спрямованих на відновлення працездатності осіб з обмеженими можливостями (хворих та інвалідів), повернення їх до суспільно корисної праці у доступних за станом здоров'я умовах [6].

Реалізація соціальної політики держави передбачена в міжгалузевій комплексній програмі «Здоров'я нації» на 2002–2011 роки, затвердженій постановою Кабінету Міністрів України № 14 від 10.01.2002 р. Важливе місце в ній займають заходи щодо зниження інвалідизації населення, забезпечення інвалідам можливості жити повноцінним життям [4].

Останніми роками видано ряд нових урядових постанов і доповнень до Закону «Про основи соціальної захищеності інвалідів в Україні», якими встановлено нормативи бронювання робочих місць для працевлаштування інвалідів – не менше 4 % від загальної чисельності робочих місць, а також розроблено механізм штрафних санкцій у разі їх невиконання [1; 2].

Незважаючи на численні наукові дослідження, державні та наукові програми щодо питань зайнятості осіб зі зниженою працездатністю та інвалідів, проблема їх професійної реабілітації, соціальної та трудової адаптації залишається надзвичайно актуальною. Здебільшого професійна реабілітація закінчується сприянням у працевлаштуванні, але залишається безконтрольним особливо значущий етап – адаптація інвалідів до праці, унаслідок чого вони не можуть тривалий час пристосуватися до нової роботи, мають виражене погіршення стану здоров'я і часто звільнюються [5; 9].

Частину цих недоліків призначена усунути атестація робочих місць (АРМ) на підприємствах, але в доступній літературі результати її майже не висвітлюються. Особливо великого значення набуває проблема АРМ для інвалідів як захід профілактики обтяження інвалідності, розширення можливостей для працевлаштування та успішної соціально-трудової та професійної реабілітації осіб зі зниженою працездатністю [6]. Тому мета цієї роботи – опрацювати методичні підходи до удосконалення діяльності комісій з АРМ і визначення їх ролі у системі професійної реабілітації осіб зі зниженою працездатністю.

Матеріал і методи досліджень

Для визначення ефективності діяльності комісій з АРМ вивчено результати їх роботи на п'яти підприємствах різних галузей промисловості: металургійної, машинобудівної, хімічної. Використано такі методи дослідження: безпосереднього спостереження, аналітичний, вкопювання даних з офіційних документів промислово-санітарних лабораторій, проведення контрольних вимірювань, статистичний.

На кожне робоче місце у цехах із найвищим рівнем захворюваності розроблено та узагальнено спеціальні карти. У них відбивалися об'єктивні дані, що характеризують умови праці (коефіцієнт K_2), результати атестації робочих місць, пропозиції комісій з АРМ. Усього на п'яти підприємствах охоплено дослідженням 1958 РМ, на яких працювали у три зміни понад 5 тисяч осіб.

Об'єктом дослідження стали також робочі місця на підприємствах енергопостачальної промисловості, на яких працевлаштовані інваліди (182 особи), їх стан здоров'я. Складено списки інвалідів із поділом їх за окремими видами професійної діяльності та шкідливими виробничими чинниками. Дослідження та атестація робочих місць проведені суцільним методом. Усі робочі місця, на яких зайняті інваліди, вивчені щодо їх санітарно-гігієнічних умов та адекватності працевлаштування згідно з рекомендаціями медико-соціальної експертної комісії (МСЕК). При проведенні АРМ використано мето-

дичні розробки А. В. Іпатова зі співавторами [7], А. М. Шевченка, О. П. Яворівського [2] та ряд директивних документів вищих виконавчих органів.

Шкідливі виробничі чинники на робочих місцях інвалідів визначались за допомогою загальноприйнятих методик. Досліджено метеорологічні фактори (температура на сухому та вологому термометрах, відносна вологість повітря, атмосферний тиск), визначено концентрації пилу та ряду шкідливих речовин, проведено виміри електромагнітного випромінювання, шумового навантаження тощо. До виконання лабораторно-інструментальних вимірів залучено незалежних компетентних працівників міської санітарно-епідеміологічної станції з використанням приладів сертифікованої згідно з Держстандартом лабораторії.

Клініко-функціональні дослідження проведені також суцільним методом. Кожному інвалідові проведено електрокардіографію в динаміці, електроенцефалографію, ультразвукове дослідження внутрішніх органів, щитовидної залози, ехоенцефалографію тощо.

Стан захворюваності інвалідів (особистий облік) за останні два роки вивчено методом ретроспективного аналізу. Проведено також соціологічне дослідження – всі інваліди опитані на предмет самооцінки стану їх здоров'я.

Необхідні дані занесено у спеціально розроблені первинні документи: карту умов праці за результатами атестації робочих місць, карту вивчення причин інвалідності та якості працевлаштування, анкету самооцінки інвалідом адаптації до виробничої діяльності, атестаційний паспорт робочого місця, зайнятого інвалідом.

Для розробки концепції та технологічної схеми оптимізації діяльності комісій з АРМ на підприємствах використано логічний метод побудови інтегрованих моделей.

Результати та їх обговорення

Дослідженням встановлено, що комісіями з АРМ на п'яти підприємствах інвентаризовано 100 % робочих місць, атестовано в середньому $56,8 \pm 11,7$ із кожних ста перевірених (28,7–87,9 %), що сприяло поліпшенню умов праці. Атестовані робочі місця не завжди відповідали нормативам за санітарно-гігієнічними умовами праці (табл.).

Таблиця

**Частота відхилень від діючих нормативів умов праці
у цехах промислових підприємств (на 100 атестованих робочих місць)**

Номер підприємства (галузь)	Всього атестовано	Із них мають відхилення від ГДК, ГДР				
		шум	температура	пил	інфрачервоне випромінювання	комплекс факторів
1 (машинобудівна)	37,6	27,1	5,3	3,8	1,3	18,6
2 (металургійна)	49,3	31,0	13,2	2,4	3,8	26,5
3 (металургійна)	28,7	4,2	2,9	26,8	6,9	13,4
4 (металургійна)	87,9	23,1	7,3	4,2	2,1	9,7
5 (хімічна)	80,7	20,3	2,4	1,8	–	11,3
<i>M ± m</i>	$56,8 \pm 11,7$	$21,2 \pm 4,6$	$6,2 \pm 1,95$	$7,8 \pm 4,7$	$2,8 \pm 0,76$	$15,9 \pm 1,59$

На атестованих робочих місцях, що мали відхилення за шумом, в 11 % випадків перевищення граничнодопустимих рівнів (ГДР) було більшим, ніж на 10 ДБА. На тих робочих місцях, що підлягали раціоналізації, перевищення склало 17 %, на неатестованих – 71 %. На атестованих робочих місцях, що мали відхилення від гранично допустимих концентрацій (ГДК) за пилом, у 39,6 % це перевищення було меншим, ніж удвічі, на 57,2 % – у 2–5 разів, на 32 % – більшим ніж у п'ятеро. На 70,7 % робочих

місце, що тимчасово не були атестовані та підлягали раціоналізації, концентрації пилу перевищували ГДК у 2,5 рази. На не атестованих робочих місцях запиленість у більшості випадків (79,4 %) перевищувала ГДК більше ніж у п'ятеро.

Важка праця на атестованих робочих місцях була відсутня. На тих із них, що підлягали раціоналізації, вона мала місце у 9,7 %, на не атестованих – у 35,7 % випадків. З інших шкідливих чинників такої чіткої залежності між величиною відхилень санітарно-гігієнічних умов праці від ГДР (ГДК) та результатами АРМ не спостерігалося.

За результатами вивчення ефективності роботи комісій з АРМ виявлено, що на атестованих робочих місцях (за наявності відхилень від санітарно-гігієнічних нормативів) у 62,4 % випадків відсутні зауваження та пропозиції комісій. Щодо частково атестованих робочих місць (тих, що підлягають раціоналізації), пропозиції відсутні у 10,2 % випадків. Багато наданих пропозицій мають не конкретний характер. 82,3 % не атестованих робочих місць продовжували функціонувати без радикального поліпшення умов праці. Більше того, на цих робочих місцях подекуди працювали хворі та інваліди. У цілому на п'яти підприємствах на атестованих робочих місцях працювало 57,2 % хворих, які належать до диспансерної групи, з них 2,8 % – інваліди. На робочих місцях, що підлягали раціоналізації, працювало 35,6 % хворих диспансерної групи, на не атестованих – 7,2 %.

Показники захворюваності з тимчасовою непрацездатністю у хворих, які належать до диспансерної групи та зайняті на робочих місцях із різними характеристиками умов праці, суттєво відрізняються. Кількість випадків захворювань серед тих, хто працює на атестованих робочих місцях, утричі менша, ніж на не атестованих, кількість днів непрацездатності – менша у 2,6 рази. Різниця статично достовірна ($p < 0,05$).

Вивчення нами результатів АРМ в енергопостачальній галузі показало, що на більшості робочих місць умови праці відповідають клініко-функціональним показникам і компенсаторно-адаптаційним характеристикам організму інвалідів. На окремих робочих місцях умови мікроклімату не завжди відповідали ДСН 3.3.6.042-99. Виявлено шкідливі виробничі чинники на деяких робочих місцях (електромонтерів, водіїв), хоча здебільшого вони не перевищують гранично допустимі концентрації та рівні. Однак їх робочі місця не атестовано, комісією з АРМ було запропоновано реальний комплекс заходів із раціоналізації цих робочих місць [3].

У процесі атестації робочих місць створено умови раціонального працевлаштування інвалідів, у тому числі і на ділянках реабілітації. Виконання цих умов на підприємствах енергопостачальної промисловості сприяло раціональному працевлаштуванню інвалідів. Тепер робота, що виконується інвалідами, адекватна стану їх здоров'я і не викликає значного зниження рівня їх кваліфікації та заробітної плати.

Нами запропоновано комплексну концепцію роботи АРМ. Основними функціями комісій з АРМ рекомендовано вважати інвентаризацію робочих місць, визначення їх придатності до експлуатації та проведення атестації. На стадіях розробки рекомендацій із раціоналізації робочих місць, контролю за виконанням пропозицій комісій з АРМ необхідно взаємодіяти з іншими формами (службами) оздоровчої роботи на підприємствах, зокрема інженерно-лікарськими бригадами, цехами та центрами реабілітації тощо.

Висновки

Атестація робочих місць проведена на всіх досліджуваних підприємствах і мала певний позитивний вплив на умови праці робітників, знизила їх захворюваність. Ате-

тація робочих місць, зайнятих інвалідами, – важливий інструмент впливу на реабілітаційний процес і рівень компенсаторно-адаптаційних характеристик осіб зі зниженою працездатністю в умовах виробничої зайнятості.

Разом із тим потенційні можливості комісій з АРМ використовуються не повною мірою, переважно через відсутність комплексності в роботі. Новою концепцією оптимізації атестації робочих місць рекомендовано діяльність комісій з АРМ проводити у системному зв'язку з інженерно-лікарською бригадою, лікарями медико-санітарної частини, поліклінік, МСЕК і санітарно-епідеміологічної станції, районною комісією з АРМ для працевлаштування інвалідів, центром реабілітації інвалідів тощо. Для уніфікації цієї концепції необхідна її подальше випробування на підприємствах різних галузей.

Бібліографічні посилання

1. **Закон України** „Про основи соціальної захищеності інвалідів в Україні” від 21.03.1991 р. № 875-ХІІ // Відомості Верховної Ради України. – 1991. – № 21. – С. 252.
2. **Гігієна** праці. Методи досліджень та санепідгляд / За ред. А. М. Шевченка, О. П. Яворівського. – Вінниця : Нова книга, 2005. – 522 с.
3. **Концепція** вдосконалення професійної реабілітації інвалідів на підприємствах енергопостачальної промисловості / Т. В. Єрошкіна, О. О. Харченко, С. О. Кріпак, Л. І. Шантир // Вісник Дніпропетр. ун-ту. Медицина і охорона здоров'я. – 2008. – Вип. 6. – С. 57–61.
4. **Міжгалузєва** комплексна програма «Здоров'я нації» на 2002–2011 роки. – К. : Здоров'я, 2002. – 88 с.
5. **Модель** державної системи професійної реабілітації інвалідів в Україні / А. В. Іпатов, О. В. Сергієні, В. П. Топка та ін. – Д. : Пороги, 2002. – 32 с.
6. **Професійна** реабілітація інвалідів / За ред. В. В. Маруніча. – Д. : Пороги, 2005. – 227 с.
7. **Участь** лікарів МСЕК в атестації робочих місць для інвалідів та в роботі інженерно-лікарських бригад / А. В. Іпатов, О. В. Сергієні, Т. В. Єрошкіна та ін. – Д. : Пороги, 2003. – 178 с.
8. **Handbook** on monitoring and evaluation of human resources for health. With special applications in low- and middle-income countries. – Geneva : WHO Press, 2009. – 196 p.
9. **«Health. Watch»**: the Australian petroleum industry health study surveillance programme / D. Christic, K. Robinson, J. Gordon et al. // Med. J. Australic. – 2004. – N 6. – P. 331–334.

Надійшла до редколегії 14.11.2010

УДК 546.719:616-018

Г. С. Кононова, С. В. Антонюк, Н. І. Штеменко

*Дніпропетровський національний університет ім. Олесь Гончара
Міський онкологічний центр м. Дніпропетровськ*

ВПЛИВ РЕНІЙ-ПЛАТИНОВОЇ СИСТЕМИ У ВИГЛЯДІ НАНОЛІПОСОМ НА ПРОЛІФЕРАТИВНУ АКТИВНІСТЬ РАКОВИХ КЛІТИН

Показано, що реній-платинова система у вигляді наноліпосом за різних умов введення знижувала проліферативну активність ракових клітин карциноми Герена. Уведення сполук ренію та цисплатину змінювало морфологічні показники пухлинної тканини. Індекс патологічних мітозів знизився в 3,0–3,6 рази порівняно з контрольною групою. Кількість PCNA-позитивних клітин під дією лише цисплатину становила близько 90 %, а за умов введення ренієвих сполук знизилась до 82,5–84,5 %. Використання реній-платинової системи спричиняло переважання індексу апоптозу над індексом некрозу. Найефективнішою виявилась сполука ренію з цисадамантильним лігандом *cis-Re₂(C₁₀H₁₅COO)₂Cl₄·2DMSO* при одноразовому введенні цисплатину.

А. С. Кононова, С. В. Антонюк, Н. І. Штеменко

*Днепропетровский национальный университет им. Олесь Гончара
Городской онкологический центр г. Днепропетровск*

ВЛИЯНИЕ РЕНИЙ-ПЛАТИНОВОЙ СИСТЕМЫ В ВИДЕ НАНОЛИПОСОМ НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ РАКОВЫХ КЛЕТОК

Показано, что реній-платиновая система в виде наноліпосом при разных условиях введения снижала пролиферативную активность раковых клеток карциномы Герена. Введение соединений рения и цисплатина изменяло морфологические показатели опухолевой ткани. Индекс патологических митозов снизился в 3,0–3,6 раза по сравнению с контрольной группой. Количество PCNA-положительных клеток под действием только цисплатина составляло около 90 %, а при условии введения рениевых соединений снизилось до 82,5–84,5 %. Использование реній-платиновой системы вызывало преобладание апоптического пути гибели клеток над некротическим. Наиболее эффективным оказалось соединение рения с цисадамантильным лигандом *cis-Re₂(C₁₀H₁₅COO)₂Cl₄·2DMSO* при одноразовом введении цисплатина.

G. S. Kononova, S. V. Antonuk, N. I. Shtemenko

*Oles' Honchar Dnipropetrovsk National University
Dnipropetrovsk Center of Oncology*

INFLUENCE OF THE RHENIUM-PLATINUM SYSTEM AS NANOLYPOSOMES ON THE PROLIFERATIVE ACTIVITY OF CANCER CELLS

Decrease of proliferative activity of the cells of Guerin's carcinoma T8 in the different conditions of administration of the Rhenium-Platinum anti-tumour system as nanolyposomes is shown. The Rhenium-

Platinum anti-tumour system influenced on the morphological indices of tumour tissue. The cluster rhenium compounds reduced the indices of pathological mitoses 3.0–3.6 times in comparison with a control group. The amount of PCNA-positive cells under the Rhenium-Platinum system treatment went down by 82.5–84.5 %. The anti-tumour system led to the predominance of apoptotic cell death over the necrotic one. The most effective agent was the compound with cis-adamantan organic ligand *cis-Re₂(C₁₀H₁₅COO)₂Cl₄·2DMSO* introduced on the 9th day.

Вступ

Із моменту відкриття цитотоксичної активності цисплатину *cis-[PtCl₂(NH₃)₂]* (сРt) зусилля науковців спрямовані на з'ясування молекулярного механізму його дії та синтез нових сполук платини з поліпшеною протипухлинною активністю [2] і зниженими побічними ефектами. На сьогодні існує вже велика бібліотека металорганічних сполук [17], найперспективніші з яких – диядерні карбоксилати ренію [12]. Окреме їх використання як неплатинових протипухлинних агентів показало, що вони мають значно меншу токсичність, ніж платиніди, але їх антиканцерогенний ефект не перевищує такий цисплатину [12]. Вживання їх у комплексах із сРt на моделі карциноми Герена (Т8) зумовлює гальмування росту новоутворень і нормалізацію багатьох показників червоної крові [20; 21]. Тому створення різноманітних комплексів сполук металів – актуальне завдання, яке потребує глибшого їх вивчення.

На базі Дніпропетровського національного університету ім. Олеся Гончара у співпраці з кафедрою неорганічної хімії Українського державного хіміко-технологічного університету проводяться дослідження у вказаному напрямі, вивчаються комплексні сполуки ренію та платини на моделі карциноми Герена. Попередні дослідження реній-платинової системи показали її здатність пригнічувати ріст пухлини у 2–13 разів порівняно з групою щурів-пухлиноносців [18; 21]. Поряд з антиканцерогенним ефектом показано здатність ренієвих комплексів підвищувати дію платини та одночасно знижувати її токсичність. Карцинома Т8 – зручна модель для проведення таких досліджень [3; 18].

Отже, мета роботи – оцінити морфологічні показники пухлинної тканини за умов уведення ренієвих сполук і цисплатину, дослідити зміни індексів проліферації пухлинних клітин, визначити ступені постлікувального патоморфозу тканин.

Матеріал і методи досліджень

У ході експерименту вивчали кластерну сполуку ренію з адамантильним лігандом *cis-Re₂(C₁₀H₁₅COO)₂Cl₄·2DMSO* (Re2d), синтезовану на кафедрі неорганічної хімії Українського державного хіміко-технологічного університету [19].

Експеримент проводили на білих щурах лінії Вістар віком 2–3 місяці, вагою 150–180 г, яким було трансплантовано карциному Герена, штам отриманий у НДІ онкології ім. Р. Е. Кавецького. Клітини карциноми Т8, суспендовані у стерильному фізіологічному розчині (20 % розчин суспензії), перещеплювали підшкірно у ліве стегно тварини.

Уведення комплексів ренію проводили внутрішньочеревинно за схемою антиоксидантної терапії десятиразово, починаючи з третьої доби після інокуляції пухлини, з інтервалом одну добу, у кількості 7 $\mu\text{M}/\text{kg}$ ваги щура кожне уведення. Тварин поділили на 7 груп, по 7 тварин у кожній: I група – контрольні тварини; тваринам II–VII груп перещепили карциному Герена; III групі тварин вводили сРt одноразово на дев'яту добу; IV групі вводили [Re2d] у вигляді наноліпосом та одноразово сРt; V групі щурів вводили [Re2d] у вигляді розчину та сРt на дев'яту добу. Тваринам VI та VII груп вводили адамантанову сполуку [Re2d] та сРt у вигляді наноліпосом, співвідношення компонентів системи реній-платина у яких було 4 : 1 та 4 : 2, відповідно. Протягом курсу лікування та в момент закінчення дослідження пухлини вимірювали за трьома показниками.

Використовуючи формулу Шрека ($V = \pi/6 \cdot (a \cdot b \cdot c)$, де a – довжина, b – ширина, c – висота), обчислювали середній об'єм пухлини [8]. При проведенні досліджень дотримувалися рекомендацій Європейської конвенції з питань етики по захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та наукових цілей [13].

Тварин декапітували на 21-шу добу під легким ефірним наркозом. Після декапітації шурів пухлини видаляли за допомогою скальпеля та хірургічних ножиць, зважували. Далі з різних частин пухлини вирізались шматочки розміром 6×6 мм (2–3 шматочки – якщо вага пухлини понад 30 г, 1–2 – якщо вага пухлини 5–30 г; за умови ваги пухлини менше за 5 г її брали повністю). Після вилучення шматочки поміщали спочатку в 10 % розчин формаліну на одну добу у співвідношенні 1 (пухлина) : 10 (формалін), а потім проводили по спиртах: 10 % розчин ізопропілового спирту на 1 годину чотириразово. Шматочки заливали у парафін і робили гістологічні зрізи. Поряд із фарбуванням зрізів гематоксилін-еозином проводили імуногістохімічне вивчення зразків за допомогою антитіл до Anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA; Dako). Визначали морфологічні показники пухлинної тканини: кількість некрозів, апоптозів, патологічних мітозів, полів ослизнення, ступінь постлікувального патоморфозу пухлинної тканини [1; 4]. Статистичний аналіз отриманих даних проводили з використанням t -критерію Стьюдента, з оцінкою вірогідності отриманих результатів на рівні значимості не менше 95 % ($p < 0,05$). Дані виражали у вигляді $M \pm m$. Достовірно відмінними вважали результати при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Ефективність платинових похідних при ракових пухлинах пов'язана з пошкодженням ДНК пухлинної клітини [11], у результаті чого формуються цисплатин-ДНК-аддукти, які, у свою чергу, блокують реплікацію, транскрипцію і, як наслідок, клітинну проліферацію. Першочергово протягом експерименту вимірювали середні об'єми пухлини (рис. 1).

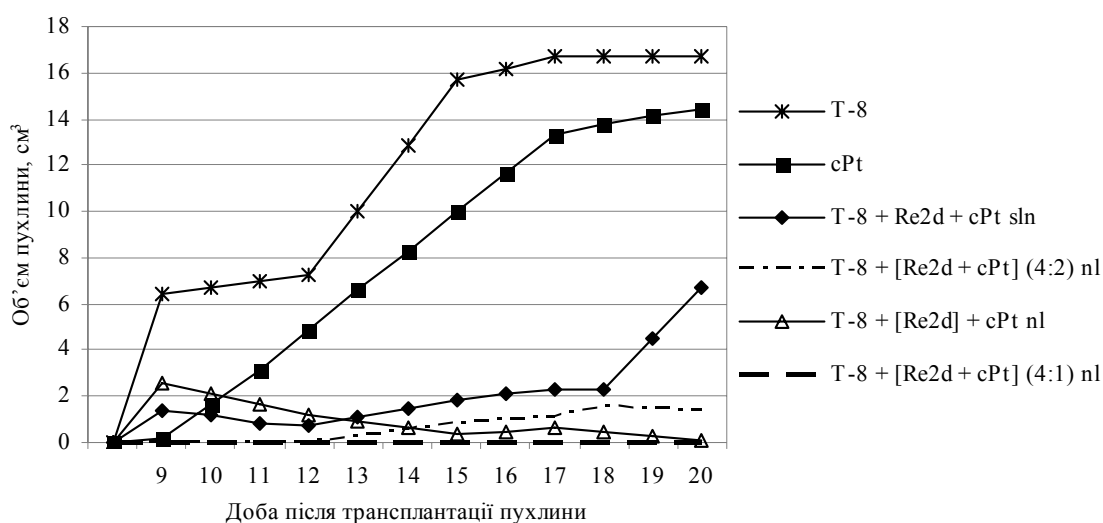


Рис. 1. Динаміка росту пухлин у піддослідних тварин

Розмір карциноми T8 на 20-ту добу досліді у 2,5 раза більший, ніж об'єм пухлини при введенні найменш ефективного комплексу Re2d + cPt sln. Введення лише cPt знижу-

вало темпи росту новоутворення, але збільшення об'ємів пухлини відбувалося прогресивно. Подібна ситуація спостерігалася у випадках T8 + Re2d + cPt sln та T8 + [Re2d + cPt] (4 : 2) nl. Уведення інших трьох комплексів ренію з органічними лігандами та цисплатином приводило до регресії пухлинного росту починаючи з 9-ї доби експерименту. Цікавий той факт, що окреме введення cPt пригнічувало ріст карциноми лише на 13,5 %.

Дані динаміки пухлинного росту підтверджують результати зважування пухлин після декапітації тварин (табл. 1). Вони вказують на високу гальмівну дію адамантанових комплексів ренію відносно проліферації в умовах внутрішньочеревинного введення.

Таблиця 1

Вага пухлин (г) підослідних тварин

№ групи	Назва групи	Вага пухлин
II	T-8	45,37 ± 2,27
III	T-8 + cPt	17,72 ± 0,87*
IV	T-8 + [Re2d] + cPt nl	0,11 ± 0,01*
V	T-8 + Re2d + cPt sln	2,43 ± 0,12*
VI	T-8 + [Re2d + cPt] (4:1) nl	0,14 ± 0,01*
VII	T-8 + [Re2d + cPt] (4:2) nl	0,54 ± 0,03*

Примітка: * – достовірна різниця порівняно з групою T8, $p < 0,05$.

Згідно отриманих даних середня вага карциноми Герена на 21-шу добу становила 45,37 г. Введення cPt привело до зменшення ваги карциноми до 17,72 г (табл. 1).

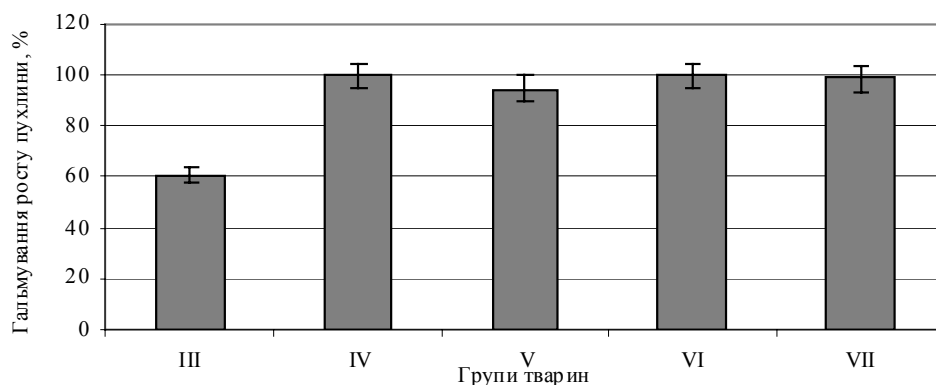


Рис. 2. Гальмування росту пухлини під дією препаратів ренію та цисплатину:

III – T8 + cPt, IV – T8 + [Re2d] + cPt nl, V – T8 + Re2d + cPt sln, VI – T8 + [Re2d + cPt] (4 : 1) nl, VII – T8 + [Re2d + cPt] (4 : 2) nl

Уведення адамантанових сполук разом із cPt викликало редукцію пухлини на 94–99 %. При цьому найефективнішими виявилися наноліпосомні форми кластерних сполук порівняно з дією розчину Re2d + cPt sln. Отже, можемо зробити висновок, що найвдаліші для доставки реній-платинових препаратів наноліпосомні форми, які і у попередніх дослідженнях виявили більшу пригнічувальну дію на проліферативну активність пухлинних клітин порівняно з розчинами [18; 19]. Висока ефективність ліпосомних форм препаратів, їх низька токсичність і подолання ними хіміорезистентності злоякісних новоутворень пояснюється їх будовою. Сполуки ренію та цисплатину, інкапсульовані у наноліпосоми, подібні своєю структурою до фосфоліпідів клітинної мембрани. Вони легко доставляються до цитоплазми пухлинних клітин шляхом ендозитозу, уникаючи безпосередньої взаємодії з P-глікопротеїновим транспортером, що міститься у плазматичній мембрані та є найчастішим чинником клітинної резистентності [3].

Вивчення гістологічних препаратів направлене на визначення темпів проліферації пухлинного росту. Відсоток проліферації вимірювали шляхом підрахунку у депарафінізованих зразках пухлин, пофарбованих гематоксилін-еозином, чотирьох індексів. Індекс патологічних мітозів (ПМ) виражали у відсотках патологічних мітотичних клітин до ста клітин у полі зору [6]. Кількісну оцінку апоптичних клітин проводили за показниками апоптичного індексу (ІА) у вигляді відсоткового відношення апоптичних клітин до ста досліджених клітин у полі зору (табл. 2). Подібним чином визначали індекс некротичних клітин (ІН) та індекс проліферації PCNA-позитивних клітин (ІП PCNA) [6].

Таблиця 2

Індекси проліферації (%) пухлинних тканин

№ групи	Назва групи	ПМ	ІА	ІН	ІП PCNA
II	T8	4,50 ± 0,23	0	59,80 ± 2,99	94,22 ± 4,71
III	T8 + cPt	3,35 ± 0,17	3,61 ± 0,18*	40,01 ± 2,00*	90,00 ± 4,50
IV	T8 + [Re2d] + cPt nl	1,25 ± 0,06*	1,14 ± 0,05*	0,80 ± 0,04*	82,53 ± 4,13*
VI	T8 + [Re2d + cPt] (4 : 1) nl	1,61 ± 0,08*	2,01 ± 0,10*	1,87 ± 0,09*	84,46 ± 4,22*

Примітки: ПМ – індекс патологічних мітозів, ІА – індекс апоптозу, ІН – індекс некрозу, ІП PCNA – індекс проліферації PCNA-позитивних клітин; * – достовірна різниця порівняно з групою T8, $p < 0,05$.

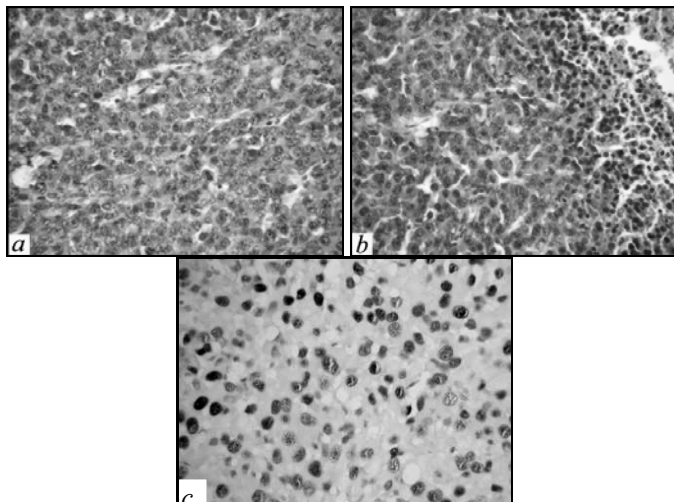


Рис. 3. Карцинома Герена:

фарбування гематоксиліном і еозином (a, b), × 200; фарбування антитілами до PCNA (c), × 400

При гістологічному дослідженні у препаратах пухлина Герена (рис. 3a, c) представлена поліморфними гіперхромними пухлинними клітинами зі зміщеними ядрами та базофільною цитоплазмою. Ядра світлі з грубодисперсним хроматином. У частині з них визначається ядерце. Спостерігаються широкі поля некрозів, які місцями досягають до 60 % пухлинної тканини, спостерігаються вогнища міксоматозу. ПМ становить $4,50 \pm 0,23$ %, апоптичні клітини не зустрічаються. При проведенні імуногістохімічних досліджень до 95 % пухлинних клітин експресують PCNA (рис. 3c). Проліферативна активність – один із ключових механізмів, які визначають як злоякісну трансформацію клітин, так і біологічну поведінку вже виниклих пухлин [7]. Використання сучасних імунологічних методів, зокрема застосування антитіл до нормальних ядерних білків-регуляторів життєвого циклу клітини, дозволяє визначити інтенсивність темпів клітинного зростання для оцінки перебігу та прогнозу захворювання. Серед маркерів про-

проліферації перспективне дослідження антигену ядер проліферувальних клітин PCNA, що експресується практично в усіх фазах мітотичного циклу та відображає величину проліферативного пулу [7; 9]. Індекс мічення PCNA використовується для прогнозування відповіді на терапію, що проводиться. Високий проліферативний індекс карциноми T8 характеризує її як активно проліферувальну, агресивну пухлину.

Уведення тваринам цисплатину викликає значні зміни пухлинної тканини, які вказують на виражений токсичний вплив сполуки (рис. 4a–c). Відмічається септальний фіброз із осередками пухлинних клітин посеред сполучної тканини, міксоматоз, осередки некрозу близько 40 %. ІА складає $3,61 \pm 0,18$ %, тобто цисплатин викликає загибель клітин двома шляхами: апоптичним і некротичним. Багаторазове перевищення загибелі клітин шляхом некрозу порівняно з апоптозом сигналізує про пошкодження ДНК та, як наслідок, про порушення механізмів запуску апоптозу, що є досить поширеним у трансформованих клітинах (клітини гинуть шляхом програмованого некрозу). Фізіологічне значення некрозу в такій ситуації має подвійний сенс. З одного боку, програмована загибель клітин шляхом некрозу за відсутності апоптозу все-таки знижує ризик передачі дочірнім клітинам мутацій. З іншого боку, розпад клітин при некрозі може сприяти активації імунної відповіді багатоклітинного організму [5]. Індекс PCNA-позитивних клітин незначно знижується, подібну картину спостерігаємо у тенденції ПМ. Пухлина зберігає активність проліферації, гальмування її розвитку порівняно з T8 незначне.

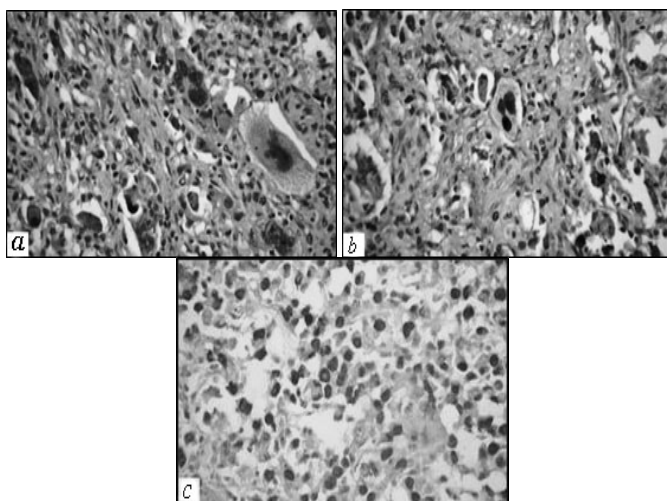


Рис. 4. Карцинома Герена під дією цисплатину:

фарбування гематоксиліном і еозином (a, b), $\times 400$; фарбування антитілами до PCNA (c), $\times 400$

При вивченні препаратів VI групи тварин, яким вводили адамантанний комплекс ренію та цисплатину (4 : 1) у вигляді наноліпосом, внутрішньочеревинно (рис. 5a–c), спостерігаються виражені ознаки лікувального патоморфозу пухлини: дифузний фіброз, осередкова лімфоїдно-клітинна інфільтрація. Одиначні пухлинні клітини, що знаходяться серед фіброзної тканини, мають потворну форму, гіперхромні, частина з них із дистрофічними змінами. Індеси апоптозу та некрозу клітин невеликі, близько 2 %, тобто їх загибель відбувається двома шляхами. Значно знизився порівняно з попередніми групами ПМ – $1,61 \pm 0,08$ % та ІП PCNA – $84,46 \pm 4,22$ %. Таким чином, пухлина не має активного прогресивного росту. Структура даних тканин відповідає третьому ступеню постлікувального патоморфозу [4].

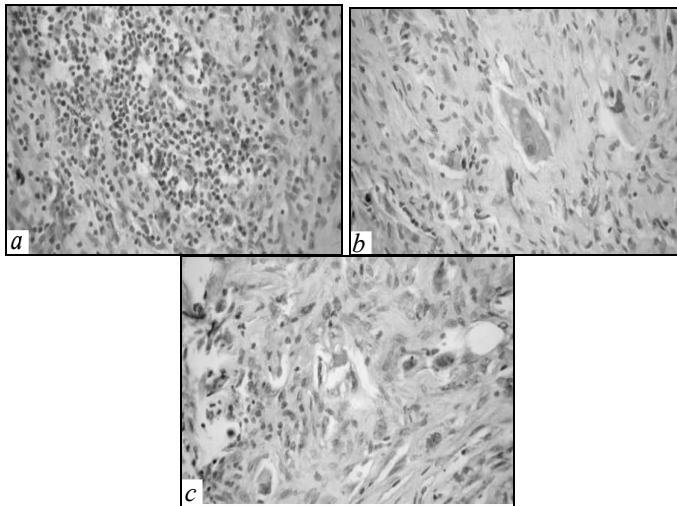


Рис. 5. Карцинома Герена під дією [Re2d + cPt] (4 : 1) nl:
фарбування гематоксилином і еозином, $\times 200$ (a), $\times 400$ (b, c)

У мікропрепаратах IV групи піддослідних тварин (рис. 6a–c), яким вводили адамантатний комплекс ренію у вигляді наноліпосом і цисплатину одноразово внутрішньочеревинно, спостерігаються морфологічні ознаки вираженого лікувального патоморфозу пухлини, що виявляються заміщенням фіброзною тканиною, серед якої зустрічаються одиничні поліморфні, переважно потворні пухлинні клітини. Виявлено осередкову лімфоїдно-клітинну інфільтрацію, поля світлих пінявих ксантомних клітин як результат лізису пухлинних клітин, що може бути наслідком їх некротичної загибелі. Індекс апоптозу становить $1,14 \pm 0,05$ %, що за умов ІН $0,80 \pm 0,04$ % говорить про майже рівноцінні шляхи клітинної загибелі. ІПМ найнижчий серед досліджуваних груп – $1,25 \pm 0,06$ %, майже повністю відсутнє запалення. Все це вказує на найефективнішу протипухлинну дію препарату [Re2d] + cPt nl. Структура даних тканин відповідає четвертому, найвищому ступеню постлікувального патоморфозу [4].

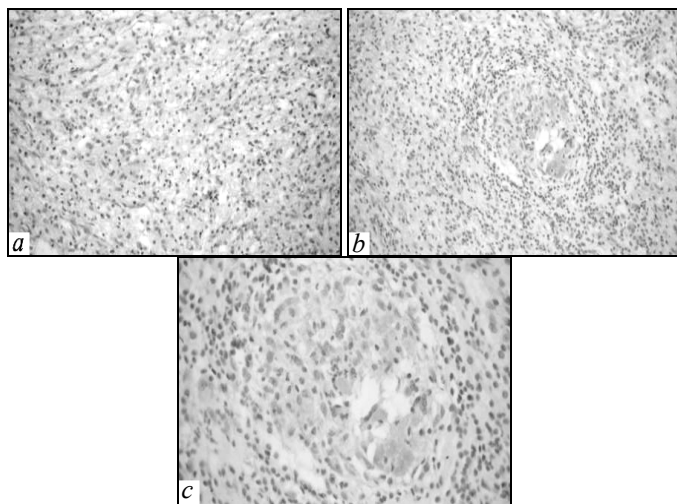


Рис. 6. Карцинома Герена під дією [Re2d] + cPt nl:
фарбування гематоксилином і еозином, $\times 200$ (a, b), $\times 400$ (c)

Терапія цисплатином викликала утворення у пухлинній тканині гігантських клітин (4–6 у кожному полі зору). Їх кількість у випадках уведення системи реній–платина знижувалася (до 1–3 у полі зору). Цікавим є той факт, що більшість із них PCNA-позитивні, тобто готові чи готуються до поділу. Ще донедавна вважалося, що гігантські клітини не мають можливості поділу, тобто вони не мають майбутнього, тому їх уважали «кінцевими». Показано, що окремі гігантські клітини можуть перебувати у такому стані тижні, місяці та роки. Справді, більшість із них рано чи пізно руйнуються, але іноді вони піддаються мейотичноподібному поділу. Такий поділ здобув назву «неозис», у результаті нього час від часу утворюються невеликі пухлинні клітини, здатні до нормальної проліферації [16]. Таким чином, якщо в результаті лікування у пухлинних тканинах виявлено гігантські поліплоїдні клітини, навіть за умов відсутності факторів, що вказують на можливість поновлення проліферативної активності, не виключається таке відновлення, що може бути спричинене поділом гігантських клітин.

Висновки

На моделі карциноми Герена Т8 у щурів встановлено, що використання системи Re–Pt викликає регресію росту, призводить до деструкції пухлинної тканини, змінює її морфологічні показники, знижує проліферувальний пул клітин, спричинює переважання індексу апоптозу над індексом некрозу, знижує показник патологічних мітозів і кількість PCNA позитивних клітин. У сукупності ці показники вказують на виражені ознаки лікувального патоморфозу карциноми, що підтверджується гістологічними дослідженнями Т8 в умовах дії ренію та цисплатину. Виявлено проліферувальну фракцію гігантських пухлинних клітин. Аналізуючи групи за морфологічними характеристиками, з'ясували, що найбільшу антипроліферативну активність виявив комплекс *cis-Re₂(C₁₀H₁₅COO)₂Cl₄·2DMSO* з одноразовим уведенням *cis-[PtCl₂(NH₃)₂]* на 9-ту добу у вигляді наноліпосом.

Бібліографічні посилання

1. Аруин Л. И. Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника / Л. И. Аруин, Л. Л. Капуллер, В. А. Исаков. – М. : Трианда-Х, 1998. – С. 13–26.
2. Жаврид Э. А. Гипертермия и гипергликемия в онкологии / Э. А. Жаврид, С. П. Осинский, С. З. Фрадкин. – К. : Наук. думка, 1987. – С. 45–58.
3. Липосомальные препараты: путь к преодолению лекарственной устойчивости к цисплатину / Г. И. Кулик, В. М. Пивнюк, М. М. Носко и др. // Онкология. – 2009. – Т. 11, № 1. – С. 76–80.
4. Лушников Е. Гибель клетки (апоптоз) / Е. Лушников, А. Ю. Абросимов. – М. : Медицина, 2001. – 192 с.
5. Онищенко Г. Е. Варианты программированной гибели клеток. – М. : МГУ им. М. В. Ломоносова, 2004. – 15 с.
6. Пушкарь С. Н. Возможность использования толерантных доз химиопрепаратов как радиомодификаторов, которые активируют церамидный путь апоптоза / С. Н. Пушкарь, Н. В. Белозор // Проблемы сучасної медичної науки та освіти. – 2009. – С. 54–57.
7. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека / Под ред. С. В. Петрова, Н. Т. Райхлина. – Казань : Титул, 2004. – 456 с.
8. Тимофеевский А. Д. Модели и методы экспериментальной онкологии. – М. : Медгиз, 1960. – 268 с.
9. Хариет Э. Р. Иммуноцитохимия: электронная микроскопия / Э. Р. Хариет, К. С. Гаттер // Молекулярная клиническая диагностика. Методы / Под ред. С. Херрингтона, Д. Макги. – М. : Мир, 1999. – 558 с.

10. **Beresford M. J.** Measuring proliferation in breast cancer: practicalities and applications / M. J. Beresford, G. D. Wilson, A. Makris // *Breast Cancer Research*. – 2006. – Vol. 34. – P. 14–18.
11. **Electron** microscopy analysis of early localization of cisplatin in ovarian carcinoma cells / G. L. Beretta, S. C. Righetti, L. Lombardi et al. // *Ultrastruct Pathol*. – 2002. – Vol. 26. – P. 331–334.
12. **Chifotides H. T.** Interactions of metal-metal-bonded antitumor active complexes with DNA fragments and DNA / H. T. Chifotides, K. R. Dunbar // *Acc. Chem. Res*. – 2005. – Vol. 38. – P. 146–156.
13. **European** convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (ETS N 123). – Strasbourg. – 18.03.1986.
14. **Platinum** complexes with imino ethers or cyclic ligands mimicking imino ethers: Synthesis, *in vitro* antitumor activity, and DNA interaction properties / F. P. Intini, A. Boccarelli, V. C. Francia et al. // *J. Biol. Inorg. Chem*. – 2004. – Vol. 9. – P. 768–780.
15. **Activation** of trans geometry in bifunctional mononuclear platinum complexes by a piperidine ligand – Mechanistic studies on antitumor action / J. Kasparkova, O. Novakova, V. Marini et al. // *J. Biol. Chem*. – 2003. – Vol. 278. – P. 47516–47525.
16. **Stem** cells, senescence, neosis and self-renewal in cancer / R. Rajaraman, D. L. Guernsey, M. Rajaraman, S. R. Rajaraman // *Cancer Cell International*. – 2006. – Vol. 4. – P. 67–72.
17. **Rosenberg B.** Platinum complexes for the treatment of cancer: Why the search goes on in cisplatin. Chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug / B. Rosenberg, B. Lippert // *Wiley-VCH*. – 1999. – Vol. 8. – P. 3–27.
18. **Synthesis**, characterization, *in vivo* antitumor properties of the cluster rhenium compound with GABA ligands and its synergism with cisplatin / A. Shtemenko, P. Collery, N. Shtemenko et al. // *Dalton Trans*. – 2009. – P. 5132–5136.
19. **Shtemenko A. V.** Chemistry of binuclear rhenium clusters in rhenium and rhenium alloys / A. V. Shtemenko, B. A. Bovykin // *TMS Publication, Pensilvania*. – 1997. – P. 189–197.
20. **Shtemenko N. I.** Dichlorotetra-*m*-isobutiratodirhenium (*III*): Enhancement of cisplatin action and RBC-stabilizing properties / N. I. Shtemenko, P. Collery, A. V. Shtemenko // *Anticancer Research*. – 2007. – Vol. 27, N 4. – P. 2487–2492.
21. **Shtemenko N.** The novel rhenium and platinum antitumor system / N. Shtemenko, P. Collery, A. Shtemenko // *Journal of Biological Inorganic Chemistry. 13th International Conference on Biological Inorganic Chemistry*. – Vienna, Austria, 2007. – Vol. 12. – P. 22.
22. **Wong E.** Current status of platinum-based antitumor drugs / E. Wong, C. M. Giandomenico // *Chem. Rev*. – 1999. – Vol. 99. – P. 2451–2466.

Надійшла до редакції 30.03.2011

УДК 577.18:577.23

О. Б. Кучменко, Д. М. Петухов, І. Н. Євстратова, Л. С. Мхітарян, Г. В. Донченко

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України
ННЦ Інститут кардіології ім. М. Д. Стражеска АМН України*

ЭФФЕКТ ПОПЕРЕДНИКІВ І МОДУЛЯТОРІВ БІОСИНТЕЗУ УБІХІНОНУ НА ВМІСТ І ФУНКЦІОНУВАННЯ УБІХІНОНУ ТА ОКСИДАТИВНИЙ СТАТУС У СЕРЦІ ПРИ ВВЕДЕННІ АДРЕНАЛІНУ

Застосування комплексів попередників і модюляторів біосинтезу убіхінону за адреналін-індукованої ішемії у щурів як профілактичного та терапевтичного засобу приводить до зниження інтенсивності вільнорадикального окислення ліпідів і білків, збільшення СОД-активності та покращення показників активності комплексів ланцюга транспорту електронів у мітохондріях серця. Комплекси ЕПМ і ЕПМД можна розглядати як ефективні антигіпоксичні засоби, що сприяють нормалізації енергетичного обміну в ішемізованому серці.

Е. Б. Кучменко, Д. Н. Петухов, І. Н. Евстратова, Л. С. Мхитарян, Г. В. Донченко

*Інститут біохімії ім. А. В. Палладіна НАН України
ННЦ Інститут кардіології ім. М. Д. Стражеска АМН України*

ВЛИЯНИЕ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ И МОДУЛЯТОРОВ БИОСИНТЕЗА УБИХИНОНА НА СОДЕРЖАНИЕ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ УБИХИНОНА И ОКСИДАТИВНЫЙ СТАТУС В СЕРДЦЕ ПРИ ВВЕДЕНИИ АДРЕНАЛИНА

Использование комплексов предшественников и модуляторов биосинтеза убихинона при адреналин-индуцированной ишемии у крыс в качестве профилактического и терапевтического средства приводит к снижению интенсивности свободнорадикального окисления липидов и белков, увеличению СОД-активности и улучшению показателей активности комплексов цепи транспорта электронов в митохондриях сердца. Комплексы ЕПМ и ЕПМД можно рассматривать как эффективные антигипоксические средства, способствующие нормализации энергетического обмена в ишемизированном сердце.

О. В. Kuchmenko, D. M. Petukhov, I. N. Yevstratova, L. S. Mkhitaryan, G. V. Donchenko

*O. V. Palladin Institute of Biochemistry NAS Ukraine
M. D. Strazheska NSC Institute of Cardiology AMS Ukraine*

EFFECT OF UBIQUINONE BIOSYNTHESIS PRECURSORS AND MODULATORS ON CONTENT AND FUNCTIONING OF UBIQUINONE AND OXIDATIVE STATUS OF HEART UNDER ADRENALINE TREATMENT

Preventive and/or subsequent application of precursors and modulators complexes of ubiquinone biosynthesis under the adrenaline treatment reduces free-radical lipid and protein peroxidation intensity, but increases superoxide dismutase activity and improves activities of the mitochondrial electron-transport

chain complexes. EPM and EPMD complexes can be effective anti-hypoxic remedies that promote normalization of the energy metabolism in ischemic heart.

Вступ

Одна з ключових подій розвитку ішемії – порушення енергетичного обміну, що супроводжується зменшенням інтенсивності тканинного дихання, вмісту в клітинах АТФ і креатинфосфату [2; 19]. Важливий механізм розвитку ішемії – окисний стрес, тобто порушення балансу між функціонуванням про- та антиоксидантних систем у бік переважання перших [11; 15]. При цьому перекисне окислення ліпідів (ПОЛ) – один із механізмів пошкоджувального впливу дефіциту кисню, яке може активуватися на певних стадіях гіпоксії та ішемії та призводити до пошкодження мембран [2].

За ішемії зменшується вміст одного з важливих компонентів ланцюга транспорту електронів у мітохондріях – убіхінону (коферменту Q, CoQ), який також проявляє антиоксидантні властивості [2; 5].

Пошук біологічно активних сполук, які будуть сприяти зростанню енергетичних можливостей і проявляти антиоксидантні властивості – одна із центральних проблем терапії та профілактики багатьох патологічних станів, у першу чергу серцево-судинної системи. На сьогодні не викликає жодних сумнівів ефективність використання препаратів убіхінону як антигіпоксичних і протиішемічних засобів [24]. Але застосування лікарських препаратів, що містять CoQ, має ряд недоліків: призводить до пригнічення ендогенного синтезу CoQ, є економічно не вигідним для пацієнтів через їх високу вартість. Таким чином, пошук підходів до активації ендогенного синтезу CoQ є актуальним.

У наших попередніх роботах показано, що при введенні вітаміну E різним видам тварин спостерігається значне прискорення біосинтезу, накопичення та функціонування CoQ [5]. Один із проміжних продуктів біосинтезу CoQ – 4-гідроксибензойна кислота (ПБК) – на рівні з вітаміном E попереджає розвиток м'язевої дистрофії та викликає аналогічні за спрямованістю зміни активності CoQ-залежних ферментних систем мітохондрій [13]. Також встановлено, що метіонін – важливий донор металевих груп при синтезі поліізопреноїдного бічного ланцюга CoQ [5].

Мета даної роботи – оцінити дію комплексів попередників і модуляторів біосинтезу CoQ на вміст і функціонування убіхінону та окислативний статус у тканинах серця щурів при введенні ним адреналіну.

Матеріал і методи досліджень

Досліди проведені на білих безпородних щурах-самцях, масою 300–350 г. Щурів утримували на стандартному раціоні віварію. Тваринам вводили внутрішньом'язево 0,5 мл 0,1 % розчину адреналіну гідрохлориду [10]. Комплекси біологічно активних сполук – попередників і модуляторів біосинтезу CoQ (комплекс ЕПМ складається з α -токоферолацетату, ПБК і метіоніну; комплекс ЕПМД – з α -токоферолацетату, ПБК, метіоніну та диметилсульфоксиду) вводили до і після введення адреналіну (відповідно профілактичний і терапевтичний вплив). Кількості введених сполук приведені в патенті [14]. У випадку профілактичного введення комплекси ЕПМ і ЕПМД вводили перорально протягом 7 діб. Після цього тваринам вводили адреналін. На третю добу тварин декапітували та брали органи для досліджень [2; 10]. У випадку терапевтичного введення спочатку тварини отримували адреналін, а потім протягом 15 діб їм вводили комплекси ЕПМ і ЕПМД перорально. Органи на дослідження брали на шіснадцять добу після введення адреналіну. Контрольні групи в усіх випадках отримували розчинники – оливкову олію та воду [2; 10]. Тварин декапітували з урахуванням

вимог Міжнародної конвенції щодо гуманного поводження з тваринами. Серця промивали охолодженим 0,9 % розчином *KCl*. Методом диференціального центрифугування виділяли фракцію мітохондрій [8], про чистоту та повноту виділення яких робили висновки за активністю сукцинатдегідрогенази та даними електронномікроскопічних досліджень. CoQ і вітамін *E* розділяли за допомогою тонкошарової хроматографії. Вміст CoQ та вітаміну *E* визначали спектрофотометрично [4]. NQR (NADH-CoQ-оксидоредуктазу) активність визначали спектрофотометрично за ступенем окислення NADH при довжині хвилі 340 нм [18]. SQR (сукцинат-CoQ-оксидоредуктазу) активність визначали спектрофотометрично за ступенем відновлення 2,6-дихлорфеноліндофенолу відновленим CoQ при довжині хвилі 600 нм [25]. Цитохромоксидазу активність визначали спектрофотометрично за ступенем окислення цитохрому *C* при довжині хвилі 550 нм [3].

Інтенсивність процесів вільнорадикального окислення оцінювали за вмістом дієнових кон'югатів (ДК), продуктів, що реагують із ТБК, і продуктів окислення білків. Вміст ДК визначали спектрофотометрично за появою нового максимуму у спектрі поглинання за довжини хвилі 233 нм [16]. Вміст ТБК-позитивних продуктів визначали за реакцією з 2-тіобарбітуровою кислотою з утворенням триметинового комплексу спектрофотометрично з максимумом поглинання за довжини хвилі 532 нм [17]. Вміст продуктів вільнорадикального окислення білків визначали спектрофотометрично за реакцією взаємодії окислених амінокислотних залишків білків із 2,4-динітрофенілгідразином з утворенням похідних 2,4-динітрофенілгідрозона [12]. Каталазу активність визначали спектрофотометрично за здатністю H_2O_2 утворювати стійкий забарвлений комплекс із солями молібдену [6]. Супероксиддисмутазу активність (СОД-активність) визначали за зниженням інтенсивності аутоокислення адреналіну на адренохром, вміст якого оцінювали методом [21]. Вміст білку визначали методом Лоурі [23].

Отримані результати опрацьовані методами варіаційної статистики з використанням програми MS Excel. Достовірність різниці двох середніх величин оцінювали за *t*-критерієм Стьюдента.

Результати та їх обговорення

При введенні адреналіну спостерігається зниження вмісту CoQ у тканинах серця в 1,5–2,5 рази порівняно з контролем. Курсове профілактичне та терапевтичне застосування комплексів ЕПМ і ЕПМД приводило до достовірного (відносно тварин, яким вводили тільки адреналін) зростання його вмісту в серці (табл. 1).

Таблиця 1

Вміст CoQ і вітаміну *E* в мітохондріях серця тварин при введенні адреналіну, профілактичному та терапевтичному введенні комплексів попередників і модуляторів біосинтезу CoQ, ($M \pm m$, $n = 6$)

Групи	Профілактичне введення		Терапевтичне введення	
	CoQ, мкг/г білку	вітамін <i>E</i> , мг/г білку	CoQ, мкг/г білку	вітамін <i>E</i> , мг/г білку
Контроль	1446,7 ± 164,9	10,10 ± 1,15	1139,2 ± 126,6	6,02 ± 0,46
Адреналін	586,5 ± 66,9 *	1,90 ± 0,22 *	748,0 ± 11,5 *	3,19 ± 0,18 *
Адреналін + ЕМП	861,1 ± 98,2 *	5,99 ± 0,68 **	1181,0 ± 252,0	7,22 ± 0,41 #
Адреналін + ЕМПД	745,7 ± 85,0 *	4,57 ± 0,52 **	1102,8 ± 33,9 #	6,60 ± 0,20 #

Примітки: * – $p < 0,05$ порівняно з контролем, # – $p < 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили адреналін.

При адреналін-індукованій ішемії в мітохондріях серця відбувалось достовірне зниження активності комплексів I, II та IV ланцюга транспорту електронів відносно

контролю. Профілактичне та терапевтичне ведення комплексів ЕПМ і ЕПМД приводило до нормалізації величин цих показників (табл. 2), що вказує на поліпшення роботи дихального ланцюга мітохондрій серця.

Таблиця 2

NADH-CoQ-оксидоредуктазна, сукцинат-CoQ-оксидоредуктазна та цитохромоксидазна активності мітохондрій серця тварин при введенні адреналіну, профілактичному та терапевтичному введенні комплексів попередників і модуляторів біосинтезу CoQ ($M \pm m, n = 6$)

Групи	Профілактичне введення			Терапевтичне введення		
	NQR, млімоль окисленого NADH · хв./мг білку	SQR, млімоль окисленого сукцинату · хв./мг білку	цитохром-оксидазна активність, мкмоль окисленого цитохрому <i>c</i> · год./мг білку	NQR, млімоль окисленого NADH · хв./мг білку	SQR, млімоль окисленого сукцинату · хв./мг білку	цитохром-оксидазна активність, мкмоль окисленого цитохрому <i>c</i> · год./мг білку
Контроль	11,76 ± 1,39	38,10 ± 4,53	3,09 ± 0,17	10,13 ± 0,31	21,70 ± 2,11	1,51 ± 0,17
Адреналін	5,48 ± 0,65 *	23,55 ± 2,80 *	1,96 ± 0,23 *	7,17 ± 0,50 *	14,33 ± 1,21 *	0,62 ± 0,07 *
Адреналін + ЕМПІ	18,73 ± 2,22 *#	34,18 ± 4,07	3,90 ± 0,90	8,33 ± 0,36 *	16,50 ± 3,39	1,60 ± 0,18 #
Адреналін + ЕПМД	16,88 ± 2,01 *#	41,03 ± 4,88 #	2,94 ± 0,07 #	8,37 ± 0,68	21,16 ± 1,63 #	1,59 ± 0,18 #

Примітки: див. табл. 1.

Відомо, що один із механізмів порушення функції серця за ішемії – накопичення в цитоплазмі кардіоміоцитів нерозщеплених ацил-CoA з наступним інгібування АТР-синтетичної функції мітохондрій [22]. Цьому процесу сприяє зростаючий за цих умов дефіцит переносників електронів – цитохрому *c* і убіхінону, пов'язаний із виходом їх із мітохондрій і гальмуванням синтезу убіхінону [9; 20]. Тому позитивні ефекти, отримані при введенні за цих умов комплексів ЕПМ і ЕПМД, можна пояснити зростанням рівня CoQ та його прямим корегувальним впливом на електрон-транспортну функцію дихального ланцюга мітохондрій серця.

Згідно з даними літератури адреналове пошкодження серця супроводжується зростанням інтенсивності вільнорадикальних процесів окислення та розвитком окисного стресу [11; 15]. Зростання рівня ПОЛ може призводити до порушення структури мембран (їх лабілізації та зростання протонної провідності), пригнічення мембранопов'язаних процесів, один з яких – окисне фосфорилування. Оскільки за ішемії спостерігається дефіцит CoQ, то це може сприяти інтенсифікації ПОЛ і деструкції мембранних структур, у тому числі й мітохондрій. У наших дослідженнях показано, що рівень первинних продуктів окислення ліпідів – ДК у тканинах серця при введенні адреналіну достовірно зростає порівняно з контролем в 2,5–5,0 раза (табл. 3). Вміст вторинних продуктів ПОЛ – ТБК-позитивних продуктів – також достовірно зростає в 2,0–2,5 раза (див. табл. 3). Введення комплексів ЕПМ і ЕПМД приводить до зниження вмісту ДК і ТБК-позитивних продуктів порівняно з тваринами, яким вводили тільки адреналін. Вміст карбонільних продуктів окислення білків – надійний маркер для оцінки стану процесів окислення в клітині. При введенні адреналіну рівень карбонільних продуктів достовірно зростає порівняно з контролем в 1,7–2,5 раза (див. табл. 3). Профілактичне та терапевтичне введення комплексів ЕПМ і ЕПМД приводило до достовірного зниження їх вмісту.

Підтримка оптимального редокс-стану клітин потребує адекватного функціонування систем антиоксидантного захисту [11]. Існують дані як про активацію антиоксидантного захисту клітин за умов накопичення продуктів ПОЛ, так і про різке

незворотне інгібування активності антиоксидантних ферментів [1; 8; 11]. Результати дослідження показали, що при введенні адреналіну відбуваються зміни активності ферментів антиоксидантного захисту. СОД-активність достовірно зменшується (табл. 4). Профілактичне та терапевтичне введення комплексів ЕМП і ЕМПД призводить до зростання цього показника. При цьому каталазна активність достовірно не змінюється в усіх досліджуваних групах.

Таблиця 3

Вміст продуктів вільнорадикального окислення ліпідів і білків у тканинах серця тварин при введенні адреналіну, профілактичному та терапевтичному введенні комплексів попередників і модуляторів біосинтезу CoQ ($M \pm m, n = 6$)

Групи	Профілактичне введення			Терапевтичне введення		
	диєнові кон'югати, ум. од./мг білку	ТБК-позитивні продукти, ум. од./мг білку	продукти окислення білків, ум. од./мг білку	диєнові кон'югати, ум. од./мг білку	ТБК-позитивні продукти, ум. од./мг білку	продукти окислення білків, ум. од./мг білку
Контроль	0,12 ± 0,04	2,91 ± 1,20	0,58 ± 0,06	0,11 ± 0,03	2,63 ± 0,92	0,91 ± 0,07
Адреналін	0,27 ± 0,06 *	7,76 ± 0,33 *	1,51 ± 0,03 *	0,59 ± 0,01 *	5,61 ± 0,85 *	1,54 ± 0,06*
Адреналін + ЕМП	0,13 ± 0,01	4,61 ± 0,40#	0,71 ± 0,04 #	0,24 ± 0,06 #	3,14 ± 0,13 #	1,08 ± 0,26
Адреналін + ЕМПД	0,07 ± 0,01 #	2,23 ± 0,22 #	0,60 ± 0,05 #	0,32 ± 0,01 **	3,78 ± 0,17	0,73 ± 0,13 #

Примітки: див. табл. 1.

Таблиця 4

Каталазна та супероксиддисмутазна активності у тканинах серця тварин при введенні адреналіну, профілактичному та терапевтичному введенні комплексів попередників і модуляторів біосинтезу CoQ ($M \pm m, n = 6$)

Групи	Профілактичне введення		Терапевтичне введення	
	каталазна активність, мкат/г білку · год.	СОД-активність, од./мг білку · хв.	каталазна активність, мкат/г білку · год.	СОД-активність, од./мг білку · хв.
Контроль	37,92 ± 9,31	546 ± 64	31,76 ± 5,74	1766 ± 506
Адреналін	26,98 ± 3,83	323 ± 9 *	34,67 ± 3,71	876 ± 149
Адреналін + ЕМП	30,27 ± 1,29	472 ± 72	31,97 ± 0,17	1191 ± 69
Адреналін + ЕМПД	25,24 ± 3,21	403 ± 32 #	30,12 ± 1,53	1283 ± 86 #

Примітки: див. табл. 1.

Під дією великих доз адреналіну активуються гіпоксичні, кальцієві та вільнорадикальні механізми пошкодження клітин і відповідні захисно-компенсаторні реакції з боку клітин (перебудови енергетичного обміну, транспортних систем, що видаляють надлишки Ca^{2+} із цитоплазми, збільшення активності антиоксидантних систем). Обов'язкова умова ефективної діяльності антиоксидантних систем – їх достатнє енергетичне та пластичне забезпечення, що, у свою чергу, залежить від загального вихідного рівня енергетичного обміну клітини, можливостей максимального та стійкого збільшення його потужності за умов уведення адреналіну.

Висновки

Застосування комплексів попередників і модуляторів біосинтезу убихінону за адреналін-індукованої ішемії у щурів як профілактичного та терапевтичного засобу дозволило суттєво знизити інтенсивність вільнорадикального окислення ліпідів і білків, збільшити СОД-активність і покращити показники активності комплексів ланцюга транспорту електронів у мітохондріях серця. Отримані дані свідчать про здатність даних комплексів справляти корегувальну дію на компоненти дихального ланцюга

мітохондрій серця за умов гіпоксії. Комплекси ЕПМ і ЕПМД, як і препарати екзогенного убіхінону, можна розглядати як ефективні антигіпоксичні засоби, що сприяють нормалізації енергетичного обміну в ішемізованому серці.

Бібліографічні посилання

1. **Барабой В. А.** Окислительно-антиоксидантный гомеостаз в норме и патологии / В. А. Барабой, Д. А. Сутковой. – К. : Чернобыль-интеринформ, 1997. – Ч. 2. – 220 с.
2. **Влияние** убихинона-10 на энергетический обмен и ПОЛ в миокарде крыс при ишемии / В. Н. Крылов, Л. Д. Лукьянова, А. С. Корягин, Е. В. Ястребова // Бюлл. экспер. биол. и мед. – 2000. – Т. 130, № 7. – С. 35–38.
3. **Гулидова Г. П.** Некоторые условия спектрофотометрического определения активности сукцинатдегидрогеназы и цитохромоксидазы в митохондриях мозга / Г. П. Гулидова, И. Н. Сорокина // Бюлл. эксп. биол. и мед. – 1967. – Т. 63, № 1. – С. 41–44.
4. **Действие** производных токоферола на содержание природных хинонов в тканях витамин Е-недостаточных крыс / Г. В. Донченко, В. Н. Коваленко, Е. Н. Забарная и др. // Биохимия. – 1979. – Т. 44, № 5. – С. 923–930.
5. **Донченко Г. В.** Биохимия убихинона. – К. : Наук. думка, 1988. – 240 с.
6. **Королюк М. А.** Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, М. И. Иванова // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–18.
7. **Костерин С. А.** Роль сарколеммы и митохондрий в обеспечении кальциевого контроля расслабления миомерия / С. А. Костерин, Н. Ф. Браткова, М. Д. Курский // Биохимия. – 1985. – Т. 50, вып. 8. – С. 1350–1361.
8. **Ланкин В. З.** Свободнорадикальные процессы при заболеваниях сердечно-сосудистой системы / В. З. Ланкин, А. К. Тихазе, Ю. Н. Беленков // Кардиология. – 2000. – Т. 40, № 7. – С. 48–61.
9. **Лукьянова Л. Д.** Биоэнергетическая гипоксия: понятие, механизмы и способы коррекции // Бюлл. экспер. биол. и мед. – 1997. – Т. 124, № 9. – С. 244–254.
10. **Моделирование** заболеваний / Под ред. С. В. Андреева. – М., 1973. – С. 198–223.
11. **Мхітарян Л. С.** Окисловальний стрес: механізми розвитку і роль в патології / Л. С. Мхітарян, О. Б. Кучменко. – К., 2004. – 223 с.
12. **Окислительная** модификация белков крови человека: метод определения / Е. Е. Дубинина, С. О. Бурмистров, Д. А. Ходов и др. // Вопросы мед. химии. – 1995. – Т. 41, № 1. – С. 24–26.
13. **Патент** 73433 Україна 7 А61К31/192, 31/355, А61Р3/00 Спосіб відновлення та активації ендогенних систем біосинтезу та функціонування убіхінону в організмі / Г. В. Донченко, І. В. Кузьменко, Д. М. Петухов, К. П. Кліменко – Заявл. 14.01.2004 р., опубл. 15.07.2005 р. – Бюл. № 7.
14. **Патент** 82639, Україна, А61К31/355 Комплексний препарат для підвищення внутрішньоклітинного енергетичного обміну в організмі / Г. В. Донченко, І. В. Кузьменко, О. Б. Кучменко, Д. М. Петухов. – Заявл. 26.09.2006 р., опубл. 25.04.2008 р. – Бюл. № 8.
15. **Свободнорадикальное** окисление и старение / В. Х. Хавинсон, В. А. Баринов, А. В. Арутюнян, В. В. Малинин. – СПб : Наука, 2003. – 327 с.
16. **Стальная И. Д.** Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных жирных кислот // Современные методы в биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича. – М. : Медицина, 1977. – С. 63–64.
17. **Стальная И. Д.** Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили // Современные методы в биологии / Под ред. В. Н. Ореховича. – М., 1977. – С. 44–46.
18. **Hatefi Y.** Preparation and properties of DPNH-coenzyme Q reductase (Complex I of the Respiratory Chain) / Y. Hatefi, J. S. Rieske // Methods in Enzymology. – 1967. – Vol. 10. – P. 235–239.
19. **Huss J. M.** Mitochondrial energy metabolism in heart failure: A question of balance / J. M. Huss, D. P. Kelly // J. Clin. Investig. – 2005. – Vol. 115, N 3. – P. 547–555.
20. **Inhibition** of ubiquinone synthesis in isolated rat heart under an ischemic condition / H. Sugawara, T. Yamamoto, S. Shimizu, K. Momose // Int. Biochem. – 1990. – Vol. 25, N 5. – P. 477–480.

21. **Misra H. P.** Role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine. A simple assay for superoxide dismutase / H. P. Misra, I. Fridovich // *J. Biol. Chem.* – 1972. – Vol. 247, N 10. – P. 3170–3175.
22. **Paulson D. J.** Inhibition of the adenine nucleotide translocator by matrix-localized palmitoyl-CoA in rat heart mitochondria / D. J. Paulson, A. L. Shug // *Biochem. Biophys. Acta.* – 1984. – Vol. 766, N 1. – P. 70–76.
23. **Protein** measurement the folin phenol reagent / O. H. Lowry, H. J. Rosenbrough, A. L. Parr, R. J. Randall // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193, N 1. – P. 265–275.
24. **Sarter B.** Coenzyme Q_{10} and cardiovascular disease: A review // *J. Cardiovasc. Nurs.* – 2002. – Vol. 16, N 4. – P. 9–20.
25. **Ziegler D.** Preparation and properties of succinate dehydrogenase-coenzyme Q reductase (complex II) / D. Ziegler, K. A. Doeg // *Methods in Enzymology.* – 1967. – Vol. 10. – P. 231–235.

Надійшла до редколегії 17.06.2011

УДК 597.2/.5 + 591.044

Р. О. Новіцький, О. О. Христов, В. М. Кочет

Дніпропетровський національний університет ім. Олесь Гончара

ІХТІОПАТОЛОГІЧНІ НАСЛІДКИ УРАЖЕННЯ ПРІСНОВОДНИХ РИБ ЕЛЕКТРОСТРУМОМ

Наводяться дані про іхтіопатологічне обстеження двох видів статевозрілих риб із двох родин (щука, лящ) Дніпровського водосховища, вилучених під час природоохоронного рейду у громадянина, який застосовував саморобний електричний пристрій («електровудку») для ураження риб. Усі досліджені особини ляща звичайного мали ураження рогівки очей і внутрішніх органів різного ступеня. Із внутрішніх органів найбільші ураження відмічені для тканин нирок, знайдені крововиливи у черевну порожнину, нирки та головний мозок. У щуки звичайної відмічені ураження геніпор (отворів гіомандибулярного каналу) у вигляді крововиливів. Описані іхтіопатологічні наслідки ураження риб можуть використовуватися природоохоронними органами для чіткої діагностики летального впливу електроструму на гідробіонтів.

Р. А. Новицкий, О. А. Христов, В. Н. Кочет

Днепропетровский национальный университет им. Олесь Гончара

ИХТИОПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОСЛЕДСТВИЯ ПОРАЖЕНИЯ ПРЭСНОВОДНЫХ РЫБ ЭЛЕКТРОТОКОМ

Приводятся данные об ихтиопатологическом обследовании двух видов половозрелых рыб из двух семейств (щука, лещ) Днепровского водохранилища, изъятых во время природоохранного рейда у гражданина, который применял самодельный электрический прибор («электроудочку») для поражения рыб. Все исследованные экземпляры леща обыкновенного имели поражения роговицы глаз и внутренних органов разной степени. Из внутренних органов наиболее значимые поражения отмечены для тканей почек, найдены кровоизлияния в брюшную полость, почки и головной мозг. У щуки обыкновенной отмечены поражения геніпор (отверстий гиомандибулярного канала) в виде кровоизлияний. Описанные ихтиопатологические последствия поражения рыб могут использоваться природоохранными органами для четкой диагностики летального воздействия электрического тока на гидробионтов.

R. A. Novitsky, O. A. Khristov, V. N. Kochet

Oles' Honchar Dnipropetrovsk National University

ICHTHYOPATHOLOGICAL EFFECTS OF FRESHWATER FISH LESIONS BY ELECTRIC SHOCK

Data on ichthyopathological examinations of mature fish (pike, bream) from Dniprovsk'ke reservoir are presented. That fish were confiscated from a person used the illegal homemade electric instrument ("electrical fishing rod"). All explored specimens of breams had keratopathy and visceral injury of different level. The most significant injuries were noted for kidney tissues. There was found the hemoperitoneum as well as nephremorrhagia and cerebral hemorrhage. In pikes it was noted the hemorrhages of hyomandibular canal. Determined ichthyopathological effects can be used for clear diagnostics of electric current lethal impact on fish.

Вступ

Незаконний вилов водних живих ресурсів за допомогою електроловильних пристроїв («електровудка») набув суттєвого поширення в СНД та Україні протягом останніх 20 років [6; 9–11; 14]. «Електровудки» являють собою саморобні електричні пристрої, основними елементами яких є акумулятор, перетворювач струму та підсака, до якої підводиться електрострум. «Електровудки» спрямовані на використання електричного струму високої напруги (1–2 кВ) для вилову риби, яка вражається електрошоком [7; 16].

Цей вид незаконного вилову за ступенем негативного впливу на рибу і гідроекосистеми найбільш загрозливий. Застосування електроловильних пристроїв завдає, окрім прямого збитку (загибель риби, інших гідробіонтів), також опосередкованого (травми, каліцтва, порушення функціонування внутрішніх органів, порушення відтворювальної здатності протягом тривалого часу, загибель інших груп гідробіонтів у зоні дії електричного поля, у тому числі й кормових організмів тощо) [7; 15].

Основні строки застосування «електровудки» – весняний період, коли відбувається нерест риби, тому застосування цього незаконного знаряддя під час нерестових міграцій риби і на нерестовищах несе пряму загрозу існуванню популяцій у водосховищах, річках і озерах України. Весною відбувається розмноження й інших груп гідробіонтів (безхребетних), які теж піддаються негативному впливу «електровудки».

На сьогодні застосування незаконних електроловильних знарядь заборонене чинним законодавством України [5; 8; 12; 13], але й дотепер в Україні не існує єдиної методологічної та методичної бази діагностування уражень риби електрострумом, що ускладнює доказову базу для природоохоронців при затриманні правопорушників, які застосовували саморобні електричні пристрої («електровудку») для ураження гідробіонтів [10]. При затриманні правопорушників «на гарячому» розмір збитків розраховується виходячи з кількості виловленої (здобутої) риби, без урахування всього комплексу негативної дії не тільки на іхтіофауну, а й на інші види гідробіонтів, особливо кормові організми.

Мета цієї роботи – охарактеризувати анатомо-морфологічні ураження прісноводних риби електричним струмом від саморобних електричних пристроїв («електровудки»).

Матеріал і методи досліджень

Матеріалом дослідження послужили 7 екземплярів риби, вилучених під час природоохоронного рейду на Дніпровському (Запорізькому) водосховищі у громадянина, який застосовував саморобний електричний пристрій («електровудку») для ураження риби. Матеріал для лабораторних патологоанатомічних досліджень наданий 05.05.2010 р. лінійним відділенням МВС України в річковому порту «Дніпропетровськ».

Аналіз ураженої саморобним електричним пристроєм риби відбувався в лабораторії біомоніторингу НДІ біології Дніпропетровського національного університету ім. Олесея Гончара. Досліджували 2 особини щуки звичайної (*Esox lucius*) та 5 – ляща звичайного (*Abramis brama*). Патологоанатомічний аналіз проводили на свіжій рибі відповідно до загальноновизнаних методичних вказівок [1–4].

Результати та їх обговорення

Отримані екземпляри риби були свіжими, в доброму стані, без слідів тривалого зберігання. Запах несвіжості або розкладання відсутній, слиз на лусці прозорий. Жоден екземпляр риби не мав зовнішніх (травматичних) пошкоджень на голові, тілі, плавцях і

порушень пігментації лускового покриву. Зябра мали яскраво-червоний колір, без слідів ослизнення та порушення країв зябрових пелюсток.

Стан і цілісність лускового покриву та ротової порожнини свідчить, що подані для аналізу екземпляри риб не були піймані на любительські знаряддя лову (усі типи гачкових знарядь лову), а також на сіткові знаряддя (ставні, плавні сітки, у тому числі поріжні). Крім того, відсутність характерних ушкоджень тіла виключає ймовірність вилову цих риб неводом (волокушею), ятерами або добування їх колючими знаряддя-ми лову (вилами, остроги тощо) (рис. 1).



Рис. 1. Зовнішній вигляд риб, поданих на патологоанатомічний аналіз

Не викликає сумніву факт, що подані для дослідження екземпляри риб (щуки та лящі) вилучені з водного середовища миттєво. Про це свідчить загальний вигляд риб, стан забарвлення зябрових пелюсток і наповненість відділів кишківника.

Усі особини лящів-самців знаходилися на переднерестових стадіях (IV–V), причому початок нересту мав би відбутися максимум за 1–3 доби. Одна самка ляща була з ікром на стадії IV–V, що теж свідчить про фактичний початок нересту. Щуки, що досліджувалися, нещодавно віднерестували, стадія зрілості статевих продуктів – II–III.

Усі досліджені риби мали помітні ураження різних органів (табл.). У результаті дослідження відмічені відмінності за характером пошкоджень риб із різних родин (таксономічні відмінності). У представників родини Щукові (Esoxidae) зареєстровані чітко помітні ураження геніпор (отворів гіомандибулярного каналу) у вигляді крововиливів. Ураження представників родини Коропові (Cyprinidae) більш значимі. У досліджених лящів найбільші ураження відмічені для тканин нирок, знайдені крововиливи у черевну порожнину (рис. 2), нирки та головний мозок. Усі досліджені екземпляри коропових риб мали ураження роگیрки очей. Незважаючи на таксономічну приналежність і особливості ураження, вплив на риб мав невідворотний летальний характер, який, на нашу думку, був спровокований саме дією електричного струму.

Проведений іхтіопатологічний аналіз свідчить, що досліджені екземпляри риб були піддані значному рівню негативного впливу миттєвої дії, що призвів до летальних наслідків (смерті) у дуже короткий час. Цей вплив не може бути викликаний наслідками асфіксії, хвороб, скиду шкідливих речовин або забруднення водойми, ви-

лову любительськими чи промисловими знаряддями лову. Загальний відгук організму на негативний вплив спостерігається у вигляді уражень і деструкції внутрішніх органів (лящі) та судинної системи (лящі та щуки). Це свідчить про високу ймовірність загибелі риб від застосування електроструму (потужного електромагнітного поля).

Таблиця

Результати іхтіопатологічного обстеження прісноводних риб, уражених електрострумом

Вид риби	№ екземпляра: стать, довжина (см) і маса риби (кг)	Зовнішній огляд	Внутрішній огляд
		В усіх досліджених риб на лусковому покриві, голові, плавцях травматичних та інших пошкоджень не знайдено. Зябра не пошкоджені, яскраво-червоного кольору. Ротова порожнина без травматичних пошкоджень і проколів	
Щука	Екз. № 1: ♀ II–III, $l = 360$ мм, $m = 0,40$ кг	Наявні крововиливи в геніпо-рах (отвори гіомандибулярно-го каналу) на нижній щелепі	Шлунок порожній, кишківник практично порожній, у задній частині є залишки кормових об'єктів
	Екз. № 2: ♀ II–III, $l = 345$ мм, $m = 0,33$ кг	Наявні крововиливи в геніпо-рах на нижній щелепі	Кишківник заповнений, шлунок заповнений (знайдено 1 екз. риби), у задній частині кишківника є залишки кормових об'єктів
Лящі	Екз. № 3: ♂ IV–V, $l = 380$ мм, $m = 1,08$ кг	Наявні крововиливи в рогівку обох очей	Ступінь наповнення кишківника середній, в усіх його відділах є кормові об'єкти природного походження. Нирки мають ураження у вигляді деструкції й розрідження тканини
	Екз. № 4: ♂ V, $l = 310$ мм, $m = 0,60$ кг	Наявні крововиливи у рогівку обох очей	Ступінь наповнення кишківника середній, в усіх його відділах є кормові об'єкти природного походження. Наявні крововиливи в черевній порожнині та згустки крові поблизу сім'яників. Зафіксовані ураження нирок у вигляді деструкції й розрідження тканини, крововиливи в нирках
	Екз. № 5: ♂ V, $l = 320$ мм, $m = 0,71$ кг	Наявний крововилив у рогівку правого ока	Ступінь наповнення кишківника середній, в усіх його відділах є кормові об'єкти природного походження. Передня частина плавального міхура ушкоджена
	Екз. № 6: ♀ IV–V, $l = 390$ мм, $m = 1,46$ кг	Наявні крововиливи у рогівку обох очей	Ступінь наповнення кишківника середній, в усіх його відділах є кормові об'єкти природного походження. Наявні суттєві крововиливи в черевній порожнині поблизу нирок. Зафіксовані ураження нирок у вигляді деструкції і значного розрідження тканини. Відмічено локальні крововиливи в головному мозку. Спостерігаються розриви оболонки яєчників (обох гонад), ікра міститься в черевній порожнині
	Екз. № 7: ♂ V, $l = 320$ мм, $m = 0,72$ кг	Наявні незначні крововиливи в рогівку обох очей	Ступінь наповнення кишківника середній, в усіх його відділах є кормові об'єкти природного походження. Наявні крововиливи в черевній порожнині. Зафіксовані ураження нирок у вигляді деструкції та розрідження тканини

Вилучення риби із природних і штучних водних екосистем за допомогою «електровудок» визнане найзагрозливішим браконьєрським засобом вилову, що призводить до масового винищення риби та інших водних організмів, супроводжується суттєвими прямими й тривалими негативними екологічними наслідками [7; 10–11]. Однак на сьогодні збитки, заподіяні від застосування незаконних електроловильних пристроїв, прирівнюються до інших, менших за масштабами негативного впливу, видів незаконного вилову. При цьому не враховується повний обсяг заподіяної біоті шкоди

від застосування даних пристроїв, який значно перевищує безпосередню шкоду від незаконно добутої риби.

Ступінь відповідальності за цей вид порушення природоохоронного законодавства України не відповідає в повному обсязі завданім збиткам водним екосистемам та їх біотичним компонентам [8]. На сьогодні правова відповідальність за використання незаконних електроловильних пристроїв досить ліберальна і не дозволяє припинити або суттєво обмежити застосування цих небезпечних для водних екосистем знарядь лову. Необхідне впровадження суворішої відповідальності за цей вид злочинної діяльності відповідно рівню заподіяної шкоди природному середовищу. Застосування «електровудки» повинно відповідати рівню скоєння особливо тяжкого злочину.



Рис. 2. Крововилив у черевну порожнину ляща

Висновки

Усі досліджені риби мали помітні ураження різних органів. Коропові (лящі) мали ураження рогівки очей. Із внутрішніх органів найбільші ураження відмічені для тканин нирок, знайдені крововиливи у черевну порожнину, нирки та головний мозок. У щук чітко помітні ураження геніпор (отворів гіомандибулярного каналу) у вигляді крововиливів. З огляду на стан і характер ушкоджень риб, поданих для аналізу, найвірогідніша причина морфоанатомічних уражень риб – застосування саморобного електричного пристрою типу «електровудка».

Вищенаведене свідчить про нагальну необхідність проведення ретельної оцінки впливу незаконних електроловильних пристроїв («електровудок») на організм риб та інших гідробіонтів, їх популяційні параметри та загальний стан іхтіоценозу. Необхідно розробити «Методику розрахунку збитків, заподіяних водним живим ресурсам унаслідок застосування незаконних електроловильних пристроїв», яка повинна у повному обсязі визначити реальну шкоду, заподіяну біоті водних екосистем при застосуванні незаконного способу видобутку гідробіонтів – «електровудки».

Бібліографічні посилання

1. **Абрамов А. В.** Посібник по діагностиці хвороб водних тварин. – Ч. 1. Хвороби риб / А. В. Абрамов, А. І. Мірошніченко, О. П. Литвинов та ін. – К. : АртЕК, 2005. – 180 с.

2. **Бауэр О. Н.** Ихтиопатология / О. Н. Бауэр, В. А. Мусселиус, В. М. Николаева. – М. : Пищ. пром-сть, 1977. – 417 с.
3. **Давыдов О. Н.** Болезни пресноводных рыб / О. Н. Давыдов, Ю. Д. Темниханов. – К. : Ветинформ, 2004. – 542 с.
4. **Давыдов О. Н.** Ихтиопатологическая энциклопедия / О. Н. Давыдов, Н. М. Исаева, Л. Я. Куровская. – К., 2000. – 164 с.
5. **Закон України** «Про тваринний світ» // Відомості Верховної Ради. – 2002. – № 14. – С. 97.
6. **Извеков И. П.** Экологическая безопасность электролова рыбы и эффективность промысла во внутренних водоемах / И. П. Извеков, Г. А. Асланов // ВНИЭРХ, ОИ. – 2000. – № 2. – 68 с.
7. **Карпов Н. А.** О влиянии электроудочки на фауну водоемов / Н. А. Карпов, С. Н. Бойков // Актуальные проблемы управления заповедниками в Европейской части России. Матер. юбилейн. научн.-практ. конф. – Воронеж : ВГУ, 2004. – С. 38–41.
8. **Кодекс України** про адміністративні правопорушення // Відомості Верховної Ради Української РСР. – 1984. – Дод. до № 51. – С. 1122, зі змінами 2004–2006 рр.
9. **Кочет В. Н.** Реакции рыб на воздействие промышленных электрических орудий лова в замкнутых водоемах Днепропетровской области (Украина) / В. Н. Кочет, О. А. Христов // Поведение рыб. Матер. докл. IV Всерос. конф. с междунар. участ. – М. : АКВАРОС, 2010. – С. 166–172.
10. **Новицкий Р. А.** Незаконное ресурсопользование на днепровских водохранилищах // Актуальные проблемы водохранилищ. Тез. Всерос. конф. (Борок, 29 октября – 3 ноября 2002 г. – Борок, ИВБН РАН, 2002. – С. 224–226.
11. **Новицкий Р. А.** В одной лодке с электробраконьером // Рыболов. Украина. – 2007. – № 5. – С. 106–108.
12. **Правила** любительського і спортивного рибальства. Затверджені Постановою КМУ від 18 липня 1998 р. № 1126.
13. **Правила** промислового рибальства в рибогосподарських водоймах України // Наказ Державного комітету рибного господарства України № 33 від 18.03.1999.
14. **Стернин В. Г.** Электролов. Основы теории и практика / В. Г. Стернин, И. В. Никоноров, Ю. К. Бумейстер. – М. : Пищ. пром-сть, 1972. – 223 с.
15. **Snyder D. E.** Effects of electrofishing on fish embryos, larvae, and early juveniles // American Fisheries Society Early Life History Section Newsletter. – 1994. – Vol. 15, N 1. – P. 10–13.
16. **Snyder D. E.** Impacts of electrofishing on fish // Fisheries. – 1995. – Vol. 20, N 1. – P. 26–27.

Надійшла до редакції 20.11.2010

УДК 612.616:544.726+591. 46

Г. В. Максим'юк, З. Д. Воробець

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького

ДЕЯКІ АСПЕКТИ ВЗАЄМОЗВ'ЯЗКУ КОНЦЕНТРАЦІЇ СПЕРМАТОЗОЇДІВ В ЕЯКУЛЯТАХ ІЗ КОНЦЕНТРАЦІЄЮ Ca^{2+} , K^+ та Na^+ У ТКАНИНАХ СТАТЕВИХ ОРГАНІВ І СПЕРМИ

Функціональний стан сперматозоїдо- та плазмогенних тканин органів статевої системи бугая формує неоднакові рівні концентрації та співвідношень Ca^{2+} , K^+ та Na^+ в еякулятах. Припустили, що зумовлена роботою іонних pomp розбіжність концентрації іонів сперми та тканин статевих органів забезпечує пасивний або активний транспорт сперматозоїдів і секретів спермальної плазми з калитки в ампулу сім'япроводу.

А. В. Максимюк, З. Д. Воробець

Львовский национальный медицинский университет им. Даниила Галицкого

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ВЗАИМОСВЯЗИ КОНЦЕНТРАЦИИ СПЕРМАТОЗОИДОВ В ЭЯКУЛЯТАХ С КОНЦЕНТРАЦИЕЙ Ca^{2+} , K^+ , Na^+ В ТКАНЯХ ПОЛОВЫХ ОРГАНОВ И СПЕРМЕ

Функциональное состояние сперматозоидо- и плазмогенных тканей органов половой системы быка формирует различные уровни концентрации и соотношений Ca^{2+} , K^+ и Na^+ в эякулятах. Предположили, что обусловленное работой ионных насосов несовпадение концентрации ионов спермы и тканей половых органов обеспечивает пассивный или активный транспорт сперматозоидов и секретов спермальной плазмы из мошонки в ампулу семяпровода.

Н. V. Maksymjuk, Z. D. Vorobets

Danylo Halytsky Lviv National Medical University

SOME ASPECTS OF DEPENDENCY BETWEEN CONCENTRATION OF SPERMATOOA IN THE EJACULATE AND Ca^{2+} , K^+ , Na^+ CONCENTRATIONS IN GENITAL TISSUES AND SPERM

The functional state of tissues that produce spermatozoa and sperm plasma in the bulls reproductive system forms different concentration levels and ratios of Ca^{2+} , K^+ and Na^+ in the ejaculate. We assumed that due to the work of ion pumps the mismatch of ion concentration in the sperm and genital tissues provides a passive or active transportation of spermatozoa and secretion of seminal plasma from the scrotum to ampulla of ductus deferens.

Вступ

Потоком інформації про функціональний стан ізольованих і неізольованих клітин організму тварин і людей керує градієнт концентрації неорганічних іонів, який регулює інтенсивність перебігу реакцій їх руху та пристосування до дії екзо- та ендогенних чинників впливу, ініціює перехід (перетворення) одного виду акумульованої енер-

гії в інший, забезпечує постачання поживних речовин у клітини та органи [5; 8–11]. Результат діяльності наведених фізико-хімічних процесів скерований зокрема на координацію функцій сперматозоїдів. Однак доцільність і суть різнобічного впливу іонів на життєздатність клітин можуть бути зрозумілими лише після детального вивчення зв'язку концентрації Ca^{2+} , K^+ та Na^+ з особливостями збереження повноцінності їх структури та функцій у нативній та кріоконсервованій спермі [1–4].

Оскільки розбіжність рівнів концентрації та співвідношень іонів у спермальній плазмі, сперматозоїдах і секреторних тканинах генеративних органів зумовлена інтенсивністю перебігу сперматозоїдо- та плазмогенних процесів, що визначають первинну рухливість і запліднювальну здатність статевих клітин свіжоотриманої сперми, мета цієї роботи – оцінити зв'язки концентрацій Ca^{2+} , K^+ та Na^+ з гіпо-, нормо- та гіперфункцією органів статевої системи бугая.

Матеріал і методи досліджень

Еякуляти отримували на штучну вагіну. Функціональний стан і концентрацію сперматозоїдів в еякулятах і концентрацію та співвідношення іонів лужних металів у спермальній плазмі та сперматозоїдах оцінювали за методиками [6]. Рівень концентрації іонів у спермі виразили сумою показників спермальної плазми та сперматозоїдів.

Дослідних бугаїв годували та утримували відповідно до встановлених норм. Досліджували сперму 45 фізіологічно здорових бугаїв чорно-рябої місцевої, чорно-рябої британо-фризької, червоної данської, симентальської, лімузин і абердин-ангуської порід, а також чорно- та червоно-рябих голштинських помісей у віці 2–9 років. Отримали та оцінили 744 еякуляти. Залежно від інтенсивності (гіпо-, нормо-, гіпер-) сперматозоїдогенної функції паренхіми яєчка, дослідні еякуляти ділили на три окремі групи. Середній показник концентрації сперматозоїдів (M) та його ліміти (lim) в еякулятах першої групи (I, гіпо-) відповідно становив 0,35 і 0,16–0,50, другої (II, нормо-) – 1,00 і 0,55–1,50, третьої (III, гіпер-) – 1,75 і 1,54–1,99 млрд/см³ сперми. Причетність гомеостазу Ca^{2+} , K^+ та Na^+ до сперматозоїдогенної та секреторної функцій паренхіми яєчка та секреторної придатка та додаткових статевих залоз оцінювали визначеними у спермальній плазмі та сперматозоїдах еякулятів дослідних груп I ($n = 122$), II ($n = 537$), III ($n = 85$) показниками концентрації (мМ) та її співвідношень (ч. в.).

Зразки тканин сім'яного канатика, білкової оболонки, яєчка, головки та хвоста придатка, сім'япроводу, ампули сім'япроводу, міхурцевої та передміхурової залоз відбирали одразу ж після забою бугаїв 12–18-місячного віку чорно-рябої голштинської породи ($n = 5$). Для досліджень брали 5,0 г тканин. Відібрані зразки висушували у термостаті за температури +105 °С. Від висушеної маси відбирали 0,5 г сухого залишку. Спалювали його в муфельній печі за температури +450 °С. Отриману золу переводили у розчин і методом полуменевої фотометрії за методикою [7] визначали концентрацію та співвідношення Ca^{2+} , K^+ та Na^+ . Числові вирази (ч. в.) співвідношень вмісту іонів у спермальній плазмі та сперматозоїдах визначили поділом показників високої концентрації K^+ та Na^+ на низьку Ca^{2+} та високої Na^+ на низьку K^+ . Співвідношення одно- ($Na^+ : Na^+$, $K^+ : K^+$, $Ca^{2+} : Ca^{2+}$) та різноіменних ($Na^+ : Ca^{2+}$, $K^+ : Ca^{2+}$, $Na^+ : K^+$) пар іонів між спермальною плазмою та сперматозоїдами отримали поділом показників високої концентрації Ca^{2+} , K^+ та Na^+ у спермальній плазмі на їх низьку у сперматозоїдах.

Результати досліджень представлені середньоарифметичною величиною (M), межами відхилень (lim) її мінімальних (min) та максимальних (max) значень, коефіцієнтом варіації (Cv) і ймовірністю різниці (p) показників концентрації спермато-

зоїдів у спермі (млрд/см³) та концентрації Ca²⁺, K⁺ та Na⁺ у спермальній плазмі, сперматозоїдах, спермі та тканинах статевих органів бугая (мМ).

Результати та їх обговорення

Визначені для спермальної плазми та сперматозоїдів параметри концентрації Ca²⁺ вказують на те, що, незалежно від функціонального стану генеративної тканини яєчка, гіпо-, нормо- та гіперфункція якого виражена відповідно концентрацією 0,35, 1,00 і 1,75 млрд. утворених сперматозоїдів на виділений об'єм (см³) секретів спермальної плазми, середня величина концентрації Ca²⁺ у спермальній плазмі майже однакова: 6,6–7,2 мМ (табл. 1).

При цьому ймовірність різниці між концентрацією іонів дослідних груп еякулятів не виходить за межу < 0,2 і > 0,05. Однак різниця між показниками концентрації Ca²⁺ у сперматозоїдах дещо інша. Для еякулятів першої та другої, другої та третьої груп менша за 0,02, а для третьої та першої більша за 0,01. Тому з цього приводу, очевидно, слід говорити про наявність прямого зв'язку між інтенсивністю сперматозоїдогенної функції тканин яєчка та концентрацією Ca²⁺ у сперматозоїдах, оскільки зниження інтенсивності їх функції пов'язане зі зменшенням концентрації Ca²⁺ у сперматозоїдах (1,34 проти 1,82 мМ), а підвищення – зі збільшенням (2,23 проти 1,82 мМ).

Таблиця 1

Концентрації сперматозоїдів (млрд/см³) та іонів у спермі (мМ)

Групи	Стат. показник	Конц. сперматозоїдів	Ca ²⁺			K ⁺			Na ⁺		
			сп. пл.*	кл.*	сп.*	сп. пл.*	кл.*	сп.*	сп. пл.*	кл.*	сп.*
I	<i>M</i>	0,35	6,55	1,34	7,89	43,61	13,05	56,66	93,01	19,27	112,28
	<i>m</i>	± 0,06	± 0,43	± 0,12	± 0,55	± 2,24	± 1,67	± 3,63	± 3,30	± 0,27	± 3,14
	<i>lim</i>	0,16–0,50	4,8–7,1	0,9–1,6	5,8–8,7	35–47	8–17	43–62	83–101	18–20	103–121
	<i>C_v</i>	40,51	14,83	20,70	15,60	11,50	28,70	14,33	7,93	3,15	6,25
	<i>P_{I/II}</i>	< 0,001	< 0,2	< 0,02	< 0,1	< 0,01	< 0,05	< 0,01	> 0,02	< 0,05	> 0,02
II	<i>M</i>	1,00	7,19	1,82	9,01	55,90	18,93	74,83	80,36	20,87	101,23
	<i>m</i>	± 0,10	± 0,14	± 0,07	± 0,15	± 1,31	± 1,01	± 2,10	± 1,00	± 0,53	± 1,42
	<i>lim</i>	0,55–1,50	6,6–8,0	1,6–2,2	8,4–9,7	50–62	13–23	65–83	75–86	17–23	92–108
	<i>C_v</i>	31,42	6,14	11,89	5,29	7,43	16,82	8,85	3,95	7,92	4,43
	<i>P_{II/III}</i>	< 0,001	> 0,05	< 0,02	> 0,5	> 0,001	< 0,5	> 0,01	> 0,001	< 0,05	> 0,01
III	<i>M</i>	1,75	6,61	2,23	8,84	45,39	19,31	64,70	69,02	25,02	94,04
	<i>m</i>	± 0,08	± 0,18	± 0,11	± 0,19	± 1,36	± 0,91	± 2,23	± 1,28	± 1,59	± 1,12
	<i>lim</i>	1,54–1,99	6,2–7,0	2,0–2,5	8,3–9,4	43–50	18–22	59–72	65–72	22–31	90–96
	<i>C_v</i>	9,82	5,98	10,93	4,76	6,72	10,57	7,71	4,13	14,19	2,67
	<i>P_{III/I}</i>	> 0,001	> 0,5	> 0,01	> 0,1	> 0,5	> 0,02	> 0,1	< 0,001	> 0,02	< 0,001

Примітки: сп. пл. – спермальна плазма, кл. – сперматозоїди, сп. – сперма.

За нормального функціонального стану генеративної тканини яєчка, який забезпечує формування середнього (1,00 млрд/см³) рівня концентрації сперматозоїдів в еякулятах, показник концентрації K⁺ у спермальній плазмі становить 56, а у сперматозоїдах – 19 мМ. Зменшення інтенсивності сперматозоїдогенної функції тканин до рівня 0,35 млрд./см³ сперми зменшує концентрацію K⁺ у спермальній плазмі до 44, а у сперматозоїдах – до 13 мМ. За гіперфункції (1,75 млрд./см³) генеративних процесів його середня величина у спермальній плазмі становить 45, але у сперматозоїдах залишається на рівні 19 мМ. При цьому найвищий коефіцієнт варіації показника концентрації K⁺ (C_v = 12–29 %) визначили в еякулятах першої дослідної групи. За гіпофункції сперматозоїдогенних процесів концентрація Na⁺ у спермальній плазмі – найвища

(93 мМ), а у сперматозоїдах – найменша (19 мМ). Слід також зазначити, що збільшення інтенсивності перебігу генеративних процесів до рівня нормо- та гіперфункції зменшує концентрацію Na^+ у спермальній плазмі відповідно до 80 і 69, а у сперматозоїдах збільшує до 21 і 25 мМ. Однак коефіцієнт варіації даного показника у спермальній плазмі становить лише 4–8 %, а у сперматозоїдах – 3–14 %.

Наведені результати свідчать, що еякулятам сперми бугаїв із неоднаковою концентрацією сперматозоїдів властивий константно відтворювальний несиметричний розподіл концентрації Ca^{2+} , K^+ та Na^+ : високі показники концентрації іонів у спермальній плазмі супроводжують її еквівалентно низькі показники у сперматозоїдах. За неоднакової інтенсивності сперматозоїдогенної функції тканин яєчка несиметричність розподілу концентрації іонів у спермі зберігається. Однак їх гіпофункція не призводить до суттєвих змін концентрації Ca^{2+} у спермальній плазмі, але зменшує її у сперматозоїдах. Гіперфункція генеративних тканин яєчка виражена вірогідним ($p < 0,01$) збільшенням концентрації Ca^{2+} у сперматозоїдах.

Зв'язок концентрації іонів лужних металів у спермі, залежно від інтенсивності генеративної функції паренхіми яєчка, дещо під іншим кутом зору ілюструє показники співвідношень різно- та одноіменних пар іонів у спермальній плазмі, сперматозоїдах і між ними (табл. 2).

За визначеної для спермальної плазми та сперматозоїдів різниці концентрацій Ca^{2+} , K^+ та Na^+ числові вирази співвідношень різноіменних пар іонів в еякулятах першої, другої та третьої дослідних груп майже однакові. Ліміт співвідношень $Na^+ : Ca^{2+}$ становить 10–14 : 1, $K^+ : Ca^{2+}$ – 7–10 : 1, а $Na^+ : K^+$ – 1–2 : 1. Проте, якщо за гіперфункціонального стану тканин співвідношення $Na^+ : Ca^{2+}$ у спермальній плазмі вищі, ніж у сперматозоїдах, лише на одну частину вмісту Na^+ , то співвідношення $K^+ : Ca^{2+}$ у сперматозоїдах еякулятів другої та третьої груп більші на дві частини вмісту K^+ , а у першій – на три. При цьому однакові середні значення показника співвідношень $Na^+ : K^+$ властиві сперматозоїдам еякулятів усіх трьох дослідних груп (1 : 1), але у спермальній плазмі за гіпо- та гіперфункції на одну частину вмісту Na^+ більші. До наведеного слід додати, що визначені за сумою концентрацій співвідношення різноіменних пар іонів у спермі збігаються з показниками спермальної плазми: середні значення $Na^+ : Ca^{2+}$ не виходять за межу 11–14 : 1, $K^+ : Ca^{2+}$ – за 7–8 : 1, $Na^+ : K^+$ – за 1–2 : 1.

Для співвідношень різно- та одноіменних пар іонів між спермальною плазмою та сперматозоїдами визначено суттєву різницю значень їх числових виразів. Якщо величина співвідношень різноіменних пар $Na^+ : Ca^{2+}$, $K^+ : Ca^{2+}$ та $Na^+ : K^+$ за нормофункції генеративної тканини яєчка становить 44 : 1, 31 : 1 та 4 : 1, то за гіпофункції – 69 : 1, 33 : 1 та 7 : 1, що відповідно на 25, 2 і 3 частини більше. За гіперфункціонального стану тканин співвідношення вмісту $Na^+ : Ca^{2+}$, $K^+ : Ca^{2+}$ – найменші (31 : 1, 20 : 1), але $Na^+ : K^+$ збігаються з показниками, визначеними за нормальної функціональної діяльності тканин (4 : 1). Їх величина на 3 частини вмісту менша, ніж за гіпофункції (7 : 1). Визначена різниця значень між показниками, що характеризують нормо- та гіперфункцію тканин яєчка, для співвідношень $Na^+ : Ca^{2+}$ становить 13 частин вмісту Na^+ , а для $K^+ : Ca^{2+}$ – 11 частин вмісту K^+ . Тобто вектор змін величини співвідношень вмісту $Na^+ : Ca^{2+}$, $K^+ : Ca^{2+}$ та $Na^+ : K^+$ за гіпофункціонального стану тканин спрямований у бік їх збільшення відносно норми, а $Na^+ : Ca^{2+}$ і $K^+ : Ca^{2+}$ за гіперфункції – у бік зменшення.

Найважливішою та стійкою рівновагою вмісту іонів для свіжоотриманої нативної сперми, очевидно, слід уважати співвідношення одноіменних пар $Ca^{2+} : Ca^{2+}$, $K^+ : K^+$ та $Na^+ : Na^+$. Різниця між визначеними показниками не виходить за межу ± 1 частина

вмісту: за гіпофункції тканин середня величина їх співвідношень (5 : 1, 4 : 1, 5 : 1) більша, ніж за нормофункції (4 : 1, 3 : 1, 4 : 1), але за гіперфункції (3 : 1, 2 : 1, 3 : 1) – менша.

Таблиця 2

Співвідношення іонів у спермі (ч. в.)

Об'єкт	Групи, станфункції	Статистичний показник	Різномірні та одноіменні пари іонів					
			$Na^+ : Ca^{2+}$	$K^+ : Ca^{2+}$	$Na^+ : K^+$	$Ca^{2+} : Ca^{2+}$	$K^+ : K^+$	$Na^+ : Na^+$
Спермальна плазма (сп. пл. *)	I гіпо-	<i>M</i>	14 : 1	7 : 1	2 : 1	–	–	–
		<i>lim</i>	14–17 : 1	7–7 : 1	2–2 : 1	–	–	–
	II нормо-	<i>M</i>	11 : 1	8 : 1	1 : 1	–	–	–
		<i>lim</i>	11–11 : 1	8–8 : 1	1–2 : 1	–	–	–
	III гіпер-	<i>M</i>	10 : 1	7 : 1	2 : 1	–	–	–
		<i>lim</i>	10–10 : 1	7–7 : 1	1–2 : 1	–	–	–
Сперматозоїди (кл. *)	I гіпо-	<i>M</i>	14 : 1	10 : 1	1 : 1	–	–	–
		<i>lim</i>	13–20 : 1	9–11 : 1	1–2 : 1	–	–	–
	II нормо-	<i>M</i>	11 : 1	10 : 1	1 : 1	–	–	–
		<i>lim</i>	10–11 : 1	8–10 : 1	1–1 : 1	–	–	–
	III гіпер-	<i>M</i>	11 : 1	9 : 1	1 : 1	–	–	–
		<i>lim</i>	11–12 : 1	9–9 : 1	1–2 : 1	–	–	–
Сперма (сп. пл. + кл. *)	I гіпо-	<i>M</i>	14 : 1	7 : 1	2 : 1	–	–	–
		<i>lim</i>	14–18 : 1	7–7 : 1	2–2 : 1	–	–	–
	II нормо-	<i>M</i>	11 : 1	8 : 1	1 : 1	–	–	–
		<i>lim</i>	11–11 : 1	8–9 : 1	1–1 : 1	–	–	–
	III гіпер-	<i>M</i>	11 : 1	7 : 1	1 : 1	–	–	–
		<i>lim</i>	10–11 : 1	7–8 : 1	1–2 : 1	–	–	–
Спермальна плазма : сперматозоїди	I гіпо-	<i>M</i>	69 : 1	33 : 1	7 : 1	5 : 1	4 : 1	5 : 1
		<i>lim</i>	63–92 : 1	29–39 : 1	6–10 : 1	4–5 : 1	3–4 : 1	5–5 : 1
	II нормо-	<i>M</i>	44 : 1	31 : 1	4 : 1	4 : 1	3 : 1	4 : 1
		<i>lim</i>	39–47 : 1	28–31 : 1	4–6 : 1	4–4 : 1	3–4 : 1	4–4 : 1
	III гіпер-	<i>M</i>	31 : 1	20 : 1	4 : 1	3 : 1	2 : 1	3 : 1
		<i>lim</i>	29–33 : 1	20–21 : 1	3–5 : 1	3–3 : 1	2–2 : 1	2–3 : 1

Проведений аналіз отриманих співвідношень вмісту іонів вказує на те, що гіпо- та гіперфункцію паренхіми яєчка не можна вважати чинником, який суттєво змінює гомеостаз різномірних пар $Na^+ : Ca^{2+}$, $K^+ : Ca^{2+}$ та $Na^+ : K^+$ у спермальній плазмі, сперматозоїдах і спермі. Однак зміна концентрацій між спермальною плазмою та сперматозоїдами суттєво впливає на рівновагу іонів у системі «клітина – середовище». Якщо гіпофункція тканин яєчка викликає збільшення величини співвідношень, то їх гіперфункція – зменшення. Проте співвідношення одноіменних пар $Ca^{2+} : Ca^{2+}$, $K^+ : K^+$ та $Na^+ : Na^+$ між спермальною плазмою та сперматозоїдами не зазнають суттєвих змін. Визначені для них незначні (± 1 частина вмісту) параметри змін пов'язані з гіпо- та гіперфункцією секреторних тканин статевих органів.

Із викладеного випливає, що розбіжність (контроверзність) параметрів концентрації та співвідношень Ca^{2+} , K^+ та Na^+ у спермальній плазмі, сперматозоїдах і між ними слід розглядати як результат діяльності генеративних біохімічних і біофізичних процесів, інтенсивність перебігу яких формує низьку або високу біологічну повноцінність сперматозоїдів, створює умови їх активного або пасивного транспорту потоками, сім'япроводами та каналами репродуктивних органів. Тому другий етап досліджень скерований на вивчення особливостей гомеостазу іонів у тканинах яєчка, головки та хвоста придатка, сім'япроводу та його ампули, міхурцевої та передміхурової залоз (табл. 3, 4). Якщо виходити з наведеної вище тези, то визначені у тканинах статевих органів бугая параметри концентрації Ca^{2+} , K^+ та Na^+ свідчать, що

інтенсивність транспорту сперми каналом сім'япроводу до його ампули забезпечує співвідношення високої концентрації K^+ (181 мМ) та середньої Ca^{2+} (8,9 мМ) і Na^+ (235 мМ) сперматозоїдогенних тканин яєчка та плазмогенних тканин головки та хвоста придатка. Співвідношення $Na^+ : Ca^{2+}$, $K^+ : Ca^{2+}$ та $Na^+ : K^+$ у них відповідно становить 26 : 1, 20 : 1 та 1 : 1. Процес виділення тканинами головки придатка у сім'япровід секретів плазми забезпечує дуже висока концентрація Na^+ (278 мМ) і Ca^{2+} (10,1 мМ) та середня – K^+ (81 мМ) у тканинах головки придатка. Однак за збережених майже однакових із тканинами головки рівнів концентрації K^+ (77 мМ) і Na^+ (249 мМ) рівень концентрації Ca^{2+} (6,8 мМ) у хвості придатка низький. Тобто визначена контроверзність рівнів концентрацій приводить до того, що показники співвідношень $Na^+ : Ca^{2+}$ та $K^+ : Ca^{2+}$ (26 : 1 та 8 : 1 проти 37 : 1 та 11 : 1) у них суттєво різні, але $Na^+ : K^+$ (3 : 1 та 3 : 1) – однакові.

Таблиця 3

Концентрація іонів у тканинах статевих органів (мМ)

Генеративні органи	Статистичний показник	Ca^{2+}	K^+	Na^+
Яєчко	$M \pm m$	$8,90 \pm 0,20$	$181,11 \pm 6,44$	$235,00 \pm 9,29$
	lim	8,6–9,3	174–194	220–252
Головка придатка	$M \pm m$	$10,05 \pm 0,09$	$80,92 \pm 0,48$	$278,10 \pm 4,31$
	lim	9,9–10,2	80–82	275–288
Хвіст придатка	$M \pm m$	$6,76 \pm 0,17$	$76,88 \pm 1,11$	$249,44 \pm 1,21$
	lim	6,4–7,0	75–79	247–251
Сім'япровід	$M \pm m$	$5,07 \pm 0,19$	$41,69 \pm 1,29$	$171,51 \pm 6,43$
	lim	4,9–5,4	40–44	165–184
Ампула сім'япроводу	$M \pm m$	$7,75 \pm 0,09$	$137,63 \pm 1,24$	$196,28 \pm 2,26$
	lim	7,6–7,9	135–140	189–202
Міхурцева залоза	$M \pm m$	$8,53 \pm 0,27$	$114,11 \pm 1,32$	$232,38 \pm 3,16$
	lim	8,4–8,7	112–115	227–243
Передміхурова залоза	$M \pm m$	$6,87 \pm 0,25$	$98,27 \pm 1,41$	$154,38 \pm 2,29$
	lim	6,6–7,0	96–99	149–161

Таблиця 4

Співвідношення іонів у тканинах статевих органів (ч. в.)

Генеративні органи	Статистичний показник	$Na^+ : Ca^{2+}$	$K^+ : Ca^{2+}$	$Na^+ : K^+$
Яєчко	M	26 : 1	20 : 1	1 : 1
	lim	26–27 : 1	20–21 : 1	1–1 : 1
Головка придатка	M	26 : 1	8 : 1	3 : 1
	lim	28–28 : 1	8–8 : 1	3–3 : 1
Хвіст придатка	M	37 : 1	11 : 1	3 : 1
	lim	36–39 : 1	11–12 : 1	3–3 : 1
Сім'япровід	M	34 : 1	8 : 1	4 : 1
	lim	34–34 : 1	8–8 : 1	4–4 : 1
Ампула сім'япроводу	M	25 : 1	18 : 1	1 : 1
	lim	25–26 : 1	18–18 : 1	1–1 : 1
Міхурцева залоза	M	27 : 1	13 : 1	2 : 1
	lim	27–28 : 1	12–13 : 1	2–2 : 1
Передміхурова залоза	M	23 : 1	15 : 1	2 : 1
	lim	23–23 : 1	14–15 : 1	2–2 : 1

Найменшу концентрацію Ca^{2+} (5,1 мМ) і K^+ (42 мМ) та середню Na^+ (172 мМ) визначили у тканинах сім'япроводу. Це дозволяє припустити, що високий (4 : 1) рівень

співвідношень концентрації $Na^+ : K^+$, який координує інтенсивність роботи механізму їх іонної помпи, дозволяє утвореній генеративною тканиною яєчка, головки та хвоста придатка спермі переміститися із статевих органів калитки до ампули сім'япроводу.

На інтенсивність роботи вказаного механізму може також впливати низьке співвідношення $Na^+ : K^+$ (1 : 1) і високе $K^+ : Ca^{2+}$ (18 : 1) у тканинах ампули сім'япроводу. Очевидно саме ці показники – рушійна сила біохімічних і біофізичних іонних і молекулярних процесів, що забезпечують транспорт сперми вивідними протоками генеративних органів і каналом сім'япроводу до його ампули.

Кінцеву ланку транспорту сперми бугая завершує однаковий гомеостаз Ca^{2+} , K^+ та Na^+ у тканинах міхурцевої та передміхурової залоз. Їх секреторну плазмогенну функцію забезпечують майже однакові співвідношення $Na^+ : Ca^{2+}$, $K^+ : Ca^{2+}$ та $Na^+ : K^+$. Межа коливань співвідношень $Na^+ : Ca^{2+}$ у тканинах вказаних залоз становить 23–28 : 1, $K^+ : Ca^{2+}$ – 12–15 : 1, $Na^+ : K^+$ – 2 : 1. Це означає, що різниця між максимальними та мінімальними значеннями для співвідношень $Na^+ : Ca^{2+}$ складає 5 частин вмісту Na^+ , а для $K^+ : Ca^{2+}$ – 3 частини вмісту K^+ . Однак розбалансованість співвідношень вмісту $Na^+ : K^+$ – незначна, оскільки значення їх числового виразу однакові (2 : 1).

Висновки

Гіпо- та гіперфункції сперматозоїдогенної та секреторної тканин статевих органів бугая, які визначають величину контроверзності рівнів гомеостазу іонів у системі «клітина – середовище», регулюють інтенсивність перебігу біохімічних і біофізичних процесів у нативній і кріоконсервованій спермі. Можливо, що саме з цієї причини сперматозоїди в еякулятах з їх низькою та високою концентрацією не витримують екстремальних умов заморожування сперми до $-196\text{ }^\circ\text{C}$.

Бібліографічні посилання

1. **Зв'язок** концентрації іонів Ca^{2+} , K^+ , Na^+ з біологічною повноцінністю сперматозоїдів / Г. В. Максим'юк та ін. // Медична хімія. – 2003. – Т. 5, № 3. – С. 85–89.
2. **Максим'юк Г. В.** Активність Na^+ , K^+ і Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФаз та вміст K^+ , Na^+ і Ca^{2+} у спермі чоловіків при нормо- і олігоспермії // Г. В. Максим'юк, З. Д. Воробець, В. М. Беседін // Вісник Київ. нац. ун-ту ім. Т. Шевченка. Сер. біологія. – 2001. – Вип. 34. – С. 8–10.
3. **Максим'юк Г. В.** Особливості гомеостазу жирних кислот у системі «клітина – середовище» // Світ медицини та біології. – 2007. – № 4. – С. 14–18.
4. **Максим'юк Г. В.** Вміст і співвідношення Ca^{2+} , K^+ , Na^+ у тканинах organa genitalia scrotum bovina // Біологічні студії / Studia Biologica. – 2010. – Т. 4, № 2. – С. 91–96.
5. **Мартиросов С.** Бионасосы – работы клетки? – М. : Радио и связь, 1981. – 144 с.
6. **Технологія** одержання сперми і способи оцінки життєздатності сперматозоїдів / УААН та ін.; В. П. Буркат та ін. – Оброшино, 2006. – 42 с.
7. **Оцінка** впливу умов кріоконсервації на гомеостаз Ca^{2+} , K^+ , Na^+ у сперматозоїдах і спермальній плазмі / Г. В. Максим'юк та ін. // Клінічна та експериментальна патологія. – 2005. – Т. 4. – С. 116–120.
8. **A continuous spectrophotometric assay for aspartate transcarbamylase and ATPases** / C. E. Rieger et al. // Analytical Biochemistry. – 1997. – Vol. 246. – P. 86–95.
9. **Oxender D.** Membrane transport // Ann. Rev. Biochem. – 1972. – Vol. 41. – P. 774–814.
10. **Pradip K.** A quick assay for Na^+ - K^+ -ATPase specific activity // Z. Naturforsch. – 2002. – Vol. 57. – P. 562–564.
11. **Schwartz A.** The sodium-potassium adenosine triphosphatase: Pharmacological and biochemical aspects // A. Schwartz, G. Lindenmayer, J. Allen // Pharmacological Rev. – 1975. – Vol. 27. – P. 3–314.

Надійшла до редколегії 09.04.2011

УДК 612.82.062:57.04+57.084.1

О. З. Мельнікова, В. П. Ляшенко, Т. Г. Чаус, Д. О. Бурцева, Л. В. Калюжна

*Запорізький державний медичний університет
Дніпропетровський національний університет ім. Олесь Гончара*

ЗМІНИ СУМАРНОЇ ФОНОВОЇ ЕЛЕКТРИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ГІПОКАМПА ТА ПОВЕДІНКОВИХ РЕАКЦІЙ ЩУРІВ ПРИ ТРИВАЛОМУ СТРЕСІ

Досліджено динаміку потужностей і спектральну композицію хвиль сумарної фонові електричної активності гіпокампа та зміни рухової та дослідницької активності щурів протягом тривалого стресу. Виявлено залежність модуляції аналізованих показників від тривалості стресового впливу, встановлено кореляційні зв'язки між параметрами біоелектричної активності гіпокампа та поведінковими реакціями щурів.

О. З. Мельникова, В. П. Ляшенко, Т. Г. Чаус, Д. А. Бурцева, Л. В. Калюжная

*Запорожский государственный медицинский университет
Днепропетровский национальный университет им. Олесь Гончара*

ИЗМЕНЕНИЯ СУММАРНОЙ ФОНОВОЙ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГИПОКАМПА И ПОВЕДЕНЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ КРЫС ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

Исследовали динамику мощностей и спектральную композицию волн суммарной фоновой электрической активности гиппокампа и изменения двигательной и исследовательской активности крыс во время длительного стресса. Выявлена зависимость модуляции анализируемых показателей от длительности стрессового влияния, установлены корреляционные связи между параметрами биоэлектрической активности гиппокампа и поведенческими реакциями крыс.

O. Z. Melnikova, V. P. Lyashenko, T. G. Chaus, D. A. Burceva, L. V. Kalyuzhnaya

*Zaporizhzhya State Medical University,
Oles' Honchar Dnipropetrovsk National University*

CHANGES OF TOTAL BACKGROUND ELECTRICAL ACTIVITY OF HIPPOCAMPUS AND BEHAVIOURAL REACTIONS OF RATS DURING LONG-LASTING STRESS

The dynamics of power and waves spectral composition of total background electrical activity in hippocampus and changes of motor and investigative activity of rats during long-lasting stress were investigated. The dependence of analysed indices on duration of the stress influence was found. The correlation between hippocampus bioelectrical activity and behavioural reactions of rats were established.

Вступ

Відомо, що стрес-реакція організму здійснюється під контролем центральних структур головного мозку та регулюється ними [2; 3; 6–8]. Серед них важлива роль

належить гіпокампу, який бере участь в організації та регуляції емоційно-мотиваційних процесів, у механізмах вегетовісцерального та нейроендокринного забезпечення адаптивної поведінки, у формуванні, активації та енергетичному забезпеченні вищих функцій мозку, пов'язаних із пам'яттю, навчанням, мисленням [7; 13–15].

Під впливом різних стресорів відбуваються зміни сумарної фонові електричної активності гіпокампа, в якій відображується взаємодія збуджувальних і гальмівних процесів, що ініціюють у центральних структурах стресогенні умови [2–4; 12]. Указані зміни мають певні особливості протягом різних стадій стресу, відображуючи модуляцію гормонально-медіаторних впливів на нейрони мозку [4]. Це може зумовлювати складну динаміку різних компонентів цілісної стрес-відповіді організму, одним з яких слугує поведінка живих істот у стресогенних умовах [2; 9], зокрема їх рухова та дослідницька активність. Однак взаємозв'язок між характером змін фонового електрогенезу гіпокампа та вказаними показниками поведінки залишається не до кінця з'ясованим.

Тому мета нашого дослідження – виявити вплив тривалого стресу на параметри електрогіпокампограми (ЕГпГ) щурів, встановити зв'язок між ними та поведінковими реакціями щурів.

Матеріал і методи досліджень

Експерименти здійснювали на нелінійних білих щурах-самцях відповідно до існуючих міжнародних вимог і норм гуманного ставлення до тварин. На початку дослідження щури мали вагу 125–140 г. Їм створювали загальноприйняті санітарно-гігієнічні умови, раціон і режим пиття [5]. Контрольних тварин ($n = 24$) утримували в стандартних умовах протягом усього експерименту. Щурам другої групи ($n = 21$) протягом 21-го тижня створювали стресову зооконфліктну ситуацію шляхом обмеження життєвого простору до 80–100 см² на одну особину. Для цього до стандартної клітки розміром 0,3 x 0,5 м, де повинно утримуватись 2–3 тварини, розміщували 20–22 щури.

Тестування поведінкових реакцій щурів проводили за методикою «відкритого поля». Для цього використовували незакриту зверху пластикову камеру розміром 80 x 80 x 40, дно якої було розграфлено на 25 квадратів. Дотримувались загальноприйнятих правил тестування тварин у «відкритому полі» [1].

На початку дослідження тварину розміщували в центрі відкритого поля, а потім підраховували число відвіданих нею квадратів (показник горизонтальної рухової активності) і число відвіданих нею центральних квадратів (характеристика дослідницької активності) [1]. Квадратики вважали перетнутими, якщо тварина своїм тулубом (як мінімум, однією з лап) пересікала яку-небудь з його сторін. Тестування тривало 3 хвилини. Дослідження поведінкових реакцій кожної тварини проводили двічі на день протягом трьох діб перед тим як забрати її в гострий експеримент для реєстрації ЕГпГ.

Відведення ЕГпГ проводили у підгрупах із трьох тварин, відібраних із контрольної та стресової груп через кожні три тижні впродовж усього періоду дослідження (як згадувалось вище – 21 тиждень). Хірургічна підготовка до відведення ЕГпГ виконувалась після внутрішньочеревинного введення 20 мг/кг кетаміну та 50 мг/кг тіопенталу натрію. Після фіксації тварини у стереотаксичному приладі та проведення трепанації черепа в гіпокамп вводили уніполярний електрод (ніхром, діаметр 100 мкм) згідно з координатами: bregma (B) – 1,4, латеральна вісь (L) – 0,8, інтерауральна вісь (I) – 4,0 [10]. Референтний електрод закріплювали на вушній раковині тварини. Верифікацію локалізації кінчиків електродів проводили на фронтальних зрізах мозку.

ЕГпГ реєстрували за допомогою стандартного комплексу електрофізіологічного устаткування. Запис ЕГпГ починали, коли в електричній активності зникали наркотичні веретена. Із гіпокампа кожної тварини робили по 10–12 записів тривалістю 1–2 хвилини, які у цифровому вигляді запам'ятовували, зберігали у комп'ютері та здійснювали їх подальшу обробку за допомогою пакета прикладних програм у складі «MathCAD 2000». Аналізували спектральні потужності (мкВ^2) і нормовані потужності (%) хвиль ЕГпГ у межах загальноприйнятих частотних діапазонів [3].

Отримані результати по кожній підгрупі тварин у відповідні тижні дослідження обробляли статистично з визначенням середніх і їх помилок. Крім того, розраховували коефіцієнти кореляції (та їх похибки) між характеристиками ЕГпГ усіх частотних діапазонів і показниками рухової та дослідницької активності тварин. Міжгрупові відмінності оцінювали, використовуючи *t*-критерій Стьюдента. Результати вважали достовірними при рівні значимості $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

У змінах показників ЕГпГ під впливом тривалого стресу можна виділити декілька фаз (рис. 1). Протягом першої з них, що тривала від 3-го до 6-го тижнів, у тварин стресової групи відбувалось зменшення потужностей і спектральних потужностей хвиль у частотних діапазонах 4–8 і 8–14 Гц. При цьому такі показники для хвиль частотою 14–30 Гц збільшувались, а у діапазоні 0,5–4 Гц зростала тільки спектральна потужність коливань.

Із 9-го до 12-го тижня експерименту під впливом стресогенних умов відбувалось збільшення потужностей хвиль усіх частотних діапазонів (крім 14–30 Гц на 9-му тижні), що супроводжувалось зростанням спектральної потужності хвиль середньочастотних діапазонів. Однак до 15-го тижня експерименту потужність усіх хвиль в ЕГпГ щурів стресової групи істотно зменшувалась відносно контролю, хоча зміни спектральної потужності хвиль були подібними до попереднього періоду. Це явище спостерігалось до 18-го тижня дослідження, однак зменшення потужності хвиль, в основному, було недостовірним, а зміни спектральних потужностей хвиль ще більше зростали. До 21-го тижня стресового впливу останні майже не відрізнялись від контрольних значень, однак в ЕГпГ тварин стресової групи зменшилась частка високочастотних хвиль. Крім того, в електричній активності гіпокампа щурів у цей період відбулось зростання потужностей хвиль усіх частотних діапазонів.

У складній динаміці змін параметрів ЕГпГ тварин стресової групи порівняно з контролем могли відображатися різні стадії стрес-реакції організму. Упродовж них відбувається суттєва модуляція медіаторно-гормональних впливів на нейрони [10], внаслідок чого може змінюватись баланс процесів збудження та гальмування у центральних структурах, залучених до контролю цілісної стрес-відповіді. Такі процеси зумовлюють постсинаптичні потенціали, які сумуються та реєструються у фоновій сумарній електричній активності гіпокампа. Відомо, що збалансованому співвідношенню збудження та гальмування відповідає збільшення потужності хвиль фоновій сумарній електричній активності мозку [3; 7], яке в наших експериментах спостерігалось з 9-го по 12-й тиждень стресового впливу. Очевидно, у цей період збільшення процесів збудження у гіпокампі, про яке свідчило зростання відсотка високочастотних хвиль, викликало активацію стрес-лімітувальних систем мозку. Збільшення потужностей хвиль електричної активності відображає адаптований стан організму [6]. Однак наступне їх зменшення через 15–18 тижнів експерименту, очевидно, може свідчити про поступовий перехід стрес-реакції до стадії виснаження, що може бути зумовлено як

недостатньою спроможністю збуджувальних і гальмівних медіаторних систем мозку. До 21-го тижня дослідження потужність хвиль ЕГпГ тварин стресової групи зростала, що може відобразити відновлення активності цих систем. Однак це відбувалося на фоні зменшення високочастотної складової спектральної композиції та відсутності у стресованих тварин змін відсотка хвиль у діапазоні 4–8 Гц, які є індикаторами функціональної активності гіпокампа [14]. Це може свідчити про інший механізм зростання потужності хвиль ЕГпГ щурів під впливом стресу у цей період спостереження, ніж на 9–12-му тижнях.

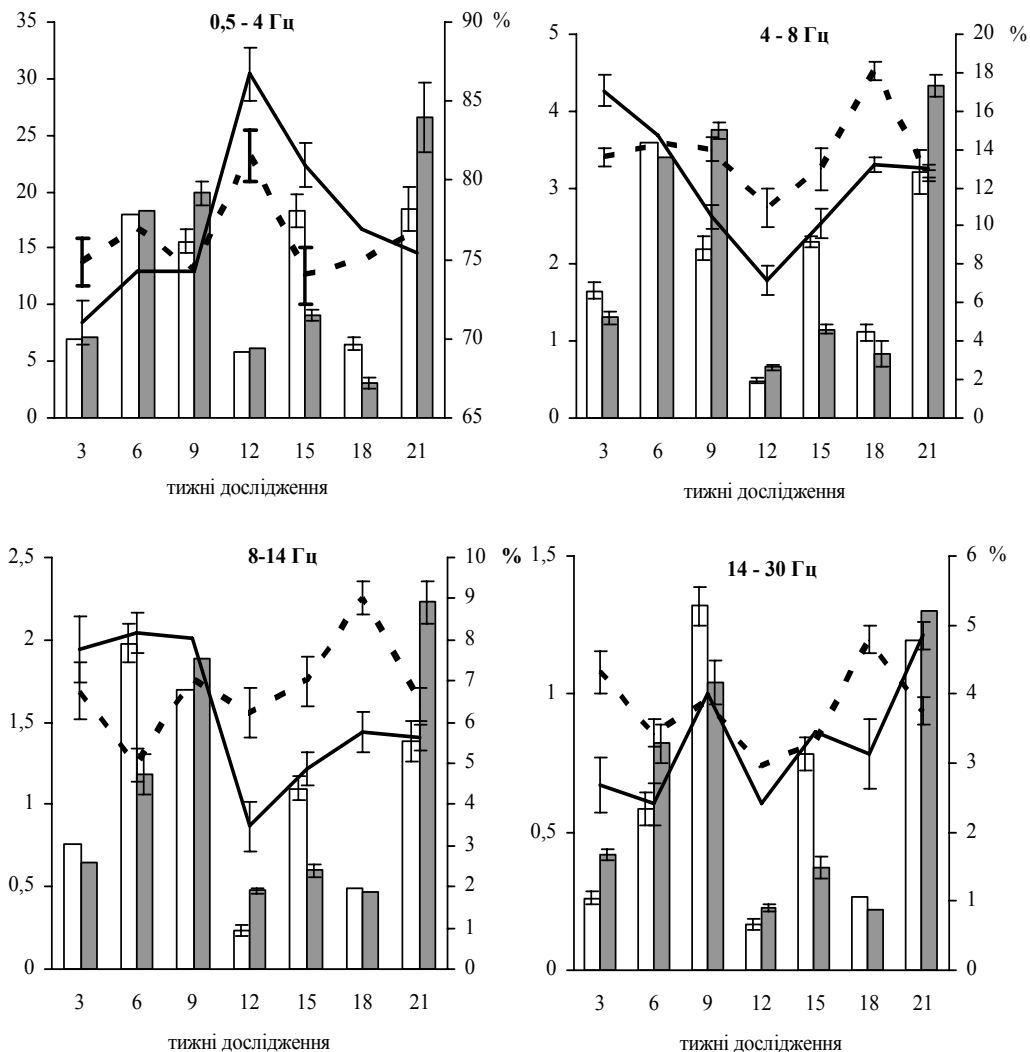


Рис. 1. Вплив тривалого стресу на показники ЕГпГ щурів: ліва вісь ординат – потужності хвиль ЕГпГ відносно початкових значень (умовні одиниці) у тварин контрольної (білі стовпчики) та стресової (сірі стовпчики) груп, права вісь ординат – спектральні потужності хвиль ЕГпГ (%) тварин контрольної (безперервна лінія) та стресової (пунктирна лінія) груп; вертикальними рисочками позначені помилки середніх у випадку достовірної різниці між групами

Для з'ясування проявів змін фонові електричної активності гіпокампа при тривалому стресі у цілісній стресс-відповіді організму здійснювали аналіз поведінкових

реакцій тварин. Результати дослідження рухової та дослідницької активності у тварин контрольної та стресової групи наведені на рисунку 2.

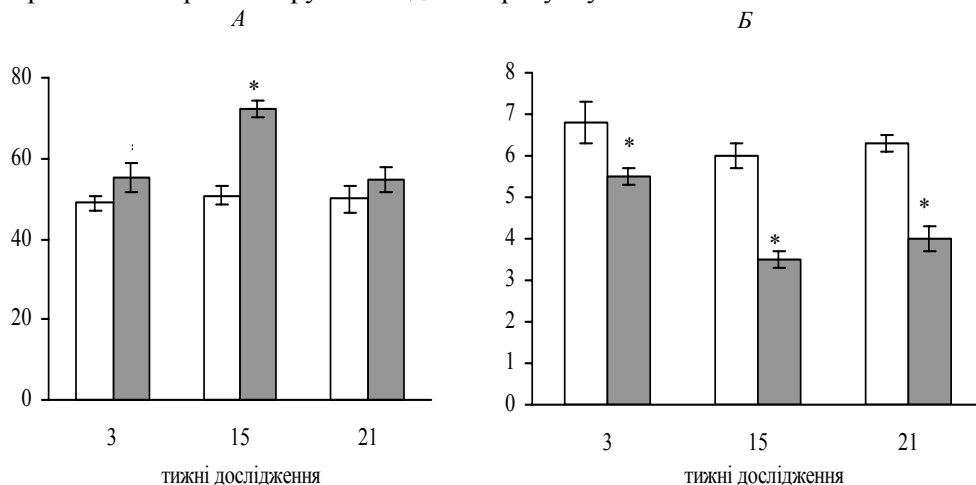


Рис. 2. Показники рухової (А) та дослідницької (Б) активності тварин контрольної (білі стовпчики) та стресової (сірі стовпчики) груп протягом експерименту:

* – достовірні зміни при $p < 0,05$

Як видно з наведених даних, під впливом тривалого стресу відбувалось збільшення рухової активності тварин протягом усього терміну спостереження. Воно було максимально вираженим на 15-му тижні дослідження, тобто впродовж другої стадії стрес-реакції. До 21-го тижня рухова активність зберігалась збільшеною, але достовірної різниці між цим показником у тварин контрольної та стресової груп не спостерігалось. На відміну від цього, дослідницька активність під впливом стресу достовірно зменшувалась протягом усього експерименту.

Кореляційний аналіз показав, що між потужностями хвиль середньочастотних діапазонів (4–8 і 8–14 Гц) ЕГпГ тварин контрольної групи та їх руховою активністю існували достовірні негативні зв'язки середньої сили (r складав близько $-0,4$). Між потужностями хвиль низько- та високочастотного діапазонів і руховою активністю кореляційних зв'язків не виявлено. При стресовому впливі коефіцієнти кореляції між потужністю хвиль ЕГпГ і локомоторною активністю тварин збільшувались, не змінюючи знака (r становив від $-0,5$ до $-0,6$), причому вони проявлялись у всіх частотних діапазонах.

Між нормованою потужністю хвиль ЕГпГ у діапазоні від 0,5 до 14 Гц і руховою активністю тварин контрольної групи виявлено достовірні сильні зв'язки (від 0,7): негативні для середньочастотних хвиль і позитивні для активності у низькочастотному діапазоні. Між нормованою потужністю високочастотних хвиль і руховою активністю шурів зареєстровано слабкий позитивний зв'язок. При стресовому впливі сила всіх указаних зв'язків зменшувалась. Тільки у високочастотному діапазоні він ставав негативним.

Потужності хвиль ЕГпГ тварин і показники їх дослідницької активності в контрольних тварин пов'язувались слабкою кореляцією, а між нормованими потужностями хвиль і дослідницькою активністю існували зв'язки середньої сили: негативні для низькочастотних хвиль і позитивні для хвиль середніх частот. У тварин стресової групи кореляційні зв'язки між потужностями хвиль ЕГпГ і дослідницькою активністю тварин майже не відрізнялись від контролю, а сила кореляції між нормованими потуж-

ностями хвиль ЕГпГ і аналізованим поведінковим показником збільшувалась для хвиль усіх частотних діапазонів, крім 14–30 Гц, до значень, характерних для сильної кореляції (0,70–0,81).

Таким чином, у ході роботи виявлено зміни характеристик ЕГпГ щурів під впливом тривалого стресу та модуляції їх поведінкових реакцій. Привертає увагу той факт, що останні більшою мірою корелювали з нормованими потужностями хвиль. При стресовому впливі сила цих зв'язків змінювалась реципрокно: між нормованими потужностями та руховою активністю зменшувалась, а між аналізованим показником ЕГпГ і дослідницькою активністю – збільшувалась. При цьому як у контролі, так і при стресовому впливі рухова активність мала негативний зв'язок із відсотком середньо-частотних хвиль, і позитивний – із представленістю хвиль низької частоти, а коефіцієнти кореляції дослідницької активності для хвиль вказаних діапазонів мали протилежні знаки. Все це певною мірою пояснює різноспрямовані зміни досліджених показників поведінкових реакцій під впливом тривалого стресу, однак це питання потребує подальших досліджень.

Висновки

При тривалому стресі виявлено зміни сумарної фонові електричної активності гіпокампа, динаміка яких могла відповідати різним стадіям стрес-реакції організму. Вказані зміни могли відображати процеси у мозку та організмі тварин, які призводили до модуляції їх рухової та дослідницької активності, про що свідчать результати кореляційного аналізу між показниками фонові електричної активності гіпокампа та характеристиками поведінкових реакцій.

Бібліографічні посилання

1. **Буреш Я.** Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Д. П. Хьюстон. – М. : Высш. шк., 1991. – 399 с.
2. **Ведяев Ф. П.** Модели и механизмы эмоциональных стрессов / Ф. П. Ведяев, Т. М. Воробьева. – К. : Здоров'я, 1983. – 136 с.
3. **Воробьева Т. М.** Электрическая активность мозга (природа, механизмы, функциональное значение) / Т. М. Воробьева, С. П. Колядко // Экспериментальная и клиническая медицина. – 2007. – № 2. – С. 4–11.
4. **Зміни динаміки показників фонові сумарної електричної активності гіпокампа наркотизованих щурів за умов довготривалого стресу і застосування на його тлі модуляторів синаптичної передачі** / С. М. Лукашов, Г. Г. Сидоренко, О. З. Мельнікова и др. // Нейрофизиология. – 2009. – Т. 41, № 4. – С. 316–326.
5. **Лабораторные животные: разведение, содержание, использование в эксперименте** / И. П. Западнюк, Е. А. Западнюк, Е. А. Захария и др. – К. : Вища школа, 1983. – 383 с.
6. **Меерсон Ф. З.** Адаптация, стресс и профилактика. – М. : Наука, 1981. – 278 с.
7. **Мозг: теоретические и клинические аспекты** / Ред. В. Н. Покровский. – М. : Медицина, 2003. – 536 с.
8. **Пшенникова М. Г.** Врожденная эффективность стресс-лимитирующих систем как фактор устойчивости к стрессорным повреждениям // Успехи физиологических наук. – 2003. – Т. 34, № 3. – С. 55–67.
9. **Пшенникова М. Г.** Феномен стресса // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2000. – № 2. – С. 24–31.
10. **Стабильные гомеостатические константы и эндокринный статус при хроническом нейрогенном стрессе и стресспротекторных воздействиях** / Г. Е. Данилов, И. Г. Брыдина, Л. С. Исакова и др. // Арх. клин. и эксперим. медицины. – 2000. – Т. 9, № 1. – С. 71–74.

11. **Стереотаксический** атлас мозга крыс (фронтальные сечения) / Под ред. А. Ю. Буданцева. – Пущино : Аналитическая микроскопия, 2002.
12. **Шеверева В. М.** Особенности формирования и обратимости эмоциональных нарушений у крыс при нейрогенном стрессе // *Нейрофизиология*. – 2003. – Т. 35, № 2. – С. 147–158.
13. **Altman J.** The hippocampus and behavioral maturation / J. Altman, R. L. Brunner, S. A. Bayer // *Behav. Biol.* – 1993. – Vol. 8. – P. 557.
14. **Buzsaki G.** Theta oscillations in the hippocampus // *Neuron*. – 2002. – Vol. 33. – P. 325–340.
15. **Sutherland R. J.** Configural association theory: The role hippocampal formation in learning, memory and amnesia / R. J. Sutherland, J. W. Ruby // *The Journal of Comparative Neurology*. – 2003. – Vol. 47. – P. 455–463.

Надійшла до редколегії 30.01.2011

УДК 579.841.11:577.18

К. М. Нестерук, І. Є. Соколова, О. В. Братусь

Дніпропетровський національний університет ім. Олесь Гончара

**РОЗПОВСЮДЖЕНІСТЬ КАРБАПЕНЕМРЕЗИСТЕНТНИХ ШТАМІВ
PSEUDOMONAS AERUGINOSA – ПРОДУЦЕНТІВ
МЕТАЛО- β -ЛАКТАМАЗ**

У багатьох країнах із клінічного матеріалу виділено грамнегативні мікроорганізми, що виявилися продуцентами метало- β -лактамаз. Досліджено полірезистентні штами *Pseudomonas aeruginosa*, виділені із сечі пацієнтів. Оцінено чутливість штамів до іміпенему та досліджено продукцію карбапенемгідролізуювальних ферментів у резистентних і помірно стійких штамів. За результатами фенотипового тесту встановлено високий рівень розповсюдженості метало- β -лактамаз. Це зумовлює необхідність здійснення моніторингу за поширенням продуцентів ферментів, які гідролізують карбапенеми.

Е. Н. Нестерук, И. Е. Соколова, Е. В. Братусь

Днепрпетровский национальный университет им. Олесь Гончара

**РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ КАРБАПЕНЕМРЕЗИСТЕНТНЫХ
ШТАММОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* – ПРОДУЦЕНТОВ
МЕТАЛЛО- β -ЛАКТАМАЗ**

Во многих странах из клинического материала выделены грамотрицательные микроорганизмы, которые оказались продуцентами метало- β -лактамаз. Исследованы полирезистентные штаммы *Pseudomonas aeruginosa*, выделенные из мочи пациентов. Оценена чувствительность штаммов к имипенему и исследована продукция карбапенемгидролизующих ферментов у резистентных и умеренно стойких штаммов. При использовании фенотипического теста установлен высокий уровень распространенности метало- β -лактамаз. Это обуславливает необходимость проведения мониторинга за распространением продуцентов ферментов, которые гидролизуют карбапенемы.

K. M. Nesteruk, I. E. Sokolova, O. V. Bratus

Oles' Honchar Dnipropetrovsk National University

**OCCURRENCE OF CARBAPENEM RESISTANT
PSEUDOMONAS AERUGINOSA PRODUCING
METALLO- β -LACTAMASES**

The existence of Gram-negative bacilli producing metallo- β -lactamase has been increasingly reported in many countries. The polyresistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients' urine were studied. The sensitiveness of strains to imipenem was assessed. The production of carbapenem-hydrolysing enzymes in resistant and moderately resistant strains was investigated. A high level of prevalence of the metallo- β -lactamase according to phenotypical test was showed. The necessity of monitoring of the distribution of carbapenem-hydrolysing enzymes producers is grounded.

Вступ

Інфекції сечовивідних шляхів відносять до найпоширеніших бактеріальних інфекцій в амбулаторній практиці урологів, акушерів-гінекологів і терапевтів [4]. У розвитку інфекцій сечовивідних шляхів головне місце займають грамнегативні мікроорганізми, проте етіологічна структура збудників змінюється із року в рік, що пов'язано з упровадженням нових антибіотиків та зміною мікрофлори людини. У зв'язку з цим важливим є дослідження структури комплексу збудників та їх чутливості до антибіотиків.

Стійкість мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів – неминучий наслідок широкого клінічного застосування останніх. У різні періоди – залежно від структури застосування антибіотиків – найрозповсюдженіші ті або інші механізми резистентності. Протягом останніх років карбапенеми, насамперед іміпенем і меропенем, міцно утримують одне з перших місць як препарати резерву при лікуванні інфекцій сечовивідних шляхів. Однак і ці антибіотики не стали винятком із загального правила, уже незабаром після впровадження карбапенемів описано мікроорганізми, що виявляють до них стійкість. Відомо декілька механізмів резистентності мікроорганізмів до карбапенемів, однак основний із них – ферментативний гідроліз антибіотиків метало- β -лактамазами (М β Л) [3–5].

Враховуючи все вказане вище, мета даної роботи – оцінити розповсюдженість серед полірезистентних мікроорганізмів, виділених із сечі, карбапенемрезистентні штами *Pseudomonas aeruginosa* – продуцента метало- β -лактамаз.

Матеріал і методи досліджень

Полірезистентні штами *P. aeruginosa* виділені із сечі пацієнтів у лабораторії Діагностичного центру медичної академії протягом 2010 року. При використанні диско-дифузійного методу оцінки антибіотикочутливості виділених бактерій відібрано резистентні та помірно стійкі штами відносно іміпенему.

Принцип диско-дифузійного методу ґрунтується на феномені пригнічення антибіотиком поверхневого видимого росту мікроорганізмів на щільному агаровому середовищі. Для приготування інокуляту використовували 18–20-годинну агарову культуру досліджуваного штаму *P. aeruginosa*. Суспензію з агарової культури доводили до оптичної густини 0,5 за стандартом Мак-Фарланда [2]. Підготовлений таким чином інокулят наносили стерильним ватним тампоном на поверхню чашки Петрі із середовищем Мюллера–Хінтона та рівномірно розтирали по поверхні у декількох площинах. На поверхню агару накладали стандартний диск, який містив 10 мкг іміпенему. Діаметр зон затримки росту з урахуванням діаметра самого диска вимірювали з точністю до 1 мм. При вимірюванні зон затримки росту орієнтувалися на повне пригнічення видимого росту [2].

Для виявлення продукції карбапенемаз у *P. aeruginosa* застосовано Hodge тест. Досліджували помірно стійкі та резистентні до іміпенему штами.

Для приготування інокуляту використовували 18–20-годинну агарову культуру індикаторного мікроорганізму – *Escherichia coli* ATCC 25922, використаного як негативний контроль. Суспензію з агарової культури доводили до оптичної густини 0,5 за стандартом Мак-Фарланда. Інокулят розсівали на поверхні чашки Петрі із середовищем Мюллера–Хінтона. У центр чашки клали паперовий диск з іміпенемом (10 мг) і за допомогою мікродозатора наносили 10 мкл 50 мМ розчину $ZnSO_4$. Відібрані добові штами *P. aeruginosa* підсівали до паперового диска з іміпенемом радіальною лінією від центра чашки до периферії. У такий самий спосіб на кожную чашку висівали штами

P. aeruginosa VIM-10, який слугував позитивним контролем. Після цього проводили добуву інкубацію за температури +37 °С. Присутність зміненої зони пригнічення росту розглядали як позитивний результат продукції ферментів, які гідролізують карбапенеми [6; 8; 9].

Для фенотипічного скринінгу продукції МβЛ застосовано метод DDST (від англ. *DDST – double-disk synergy test*) подвійних дисків з етилендіамінтетраоцтовою кислотою (ЕДТО) [8]. Принцип методу ґрунтується на здатності ЕДТО хелатувати йони цинку з активного центру метало-β-лактамаз і пригнічувати їх гідролітичну активність відносно β-лактамних субстратів. При визначенні чутливості МβЛ-продуцентів методом диск-дифузії за присутності ЕДТО спостерігали розширення зон пригнічення росту навколо дисків із β-лактамними антибіотиками, що пов'язано з інгібуванням МβЛ і відновленням активності β-лактамів.

Постановка диско-дифузійного тесту здійснена для штамів *P. aeruginosa* – продуцентів карбапенемаз відповідно до методичних вказівок щодо виявлення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів. Досліджені культури *P. aeruginosa* висівали на середовище Мюллера–Хінтона означеним вище способом і через 5–10 хвилин на підсохлу поверхню агару накладали диски за такою схемою: у центр – пустий диск, на який наносили 5 мкл 0,5 М розчину ЕДТО (рН 8,0), з боків від нього на відстані 15 мм між центрами дисків – диски з цефтазидимом, іміпенемом і меропенемом. Чашки інкубували в термостаті при +37 °С протягом 16–18 годин [2; 7; 8].

Одночасно з аналізом досліджуваних культур проводили оцінку контрольних штамів: *P. aeruginosa* VIM-10 – як позитивного контролю, *P. aeruginosa* ATCC 27853 – як негативного контролю.

Утворення розширеної зони пригнічення росту між диском з ЕДТО і хоч з одним диском, що містить лактамні антибіотики, вказує на продукцію МβЛ у тестованого мікроорганізму. Комбінація із трьох дисків (іміпенем, меропенем, цефтазидим) використовується для підвищення чутливості методу, оскільки деякі штами можуть проявляти синергізм тільки з одним з антибіотиків [9; 10].

Результати та їх обговорення

Із 17 досліджуваних штамів (табл.) визначено 11 резистентних, 4 – помірно стійких і 2 – чутливих до іміпенему, що складають відповідно 64,7, 23,5 та 11,8 %. Для подальшого вивчення взято в роботу резистентні та помірно стійкі мікроорганізми (15 штамів). Фенотипічний Hodge-тест застосований для виявлення продукції карбапенемаз у *P. aeruginosa*. Досліджували помірно стійкі та резистентні штами до іміпенему, адже саме цей антибіотик використовується у клінічній практиці, він чутливіший до карбапенемаз [6; 8].

У ході експерименту серед 15 штамів (11 резистентних і 4 помірно стійких) за Hodge тестом визначено 6 штамів з активною продукцією карбапенемаз. Як позитивний результат у визначенні продукції ферментів, що гідролізують карбапенеми, приймали присутність зміненої зони інгібування навколо паперового диска з іміпенемом, обробленого розчином $ZnSO_4$. Позитивні результати тесту для досліджуваних штамів збігалися з результатами, отриманими для позитивного контрольного штаму *P. aeruginosa* VIM-10 (рис. 1).

Отримані 9 негативних результатів свідчать про наявність у штамів *P. aeruginosa* інших механізмів резистентності до карбапенемів, окрім дії карбапенемаз. До таких механізмів відносять втрату поринового білка *opr D*, хромосомну β-лактамазу класу *Amp C* та ефлюкс [1; 5].

**Чутливість *Pseudomonas aeruginosa* до іміпенему
та продукція ферментів, які гідролізують карбапенеми**

Ступінь чутливості бактерій до антибіотиків	Чутливість до іміпенему, % штамів	Здатність продукувати карбапенемази, % штамів
Чутливі	11,8	–
Помірно стійкі	23,5	6,6
Резистентні	64,7	33,3

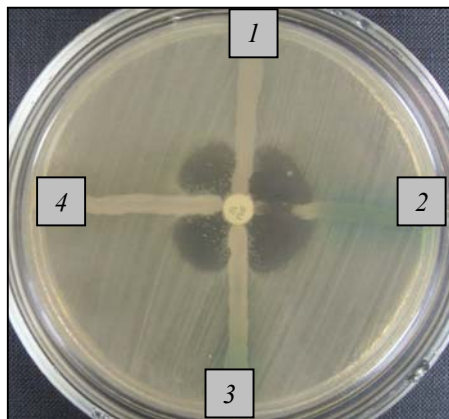


Рис. 1. Hodge тест – виявлення продукції карбапенемаз:

1 – позитивний контроль *Pseudomonas aeruginosa* VIM-10, 2 – негативний результат, 3, 4 – досліджувані штами *P. aeruginosa* – продуценти карбапенемаз (позитивний результат)

Отримані результати вказують на те, що розповсюдженість штамів-продуцентів карбапенемаз серед резистентних до іміпенему *P. aeruginosa* складає 39,9 %. Найбільшу групу карбапенемаз складають метало- β -лактамази (молекулярного класу *B*), серед яких виділяють: VIM, SPM та IMP групи. До карбапенемаз також відносять ферменти класу *A* – груп SME, NMS/IMI та KPS; класу *D* (OXA), що здійснюють гідроліз пеніцилінів і цефалоспоринів [3].

На наступному етапі дослідження проведено скринінг метало- β -лактамаз серед штамів *P. aeruginosa* – продуцентів карбапенемаз.

Метало- β -лактамази належать до ферментів молекулярного класу *B*, і, на відміну від серинових β -лактамаз, ферменти цього типу мають в активному центрі два атоми цинку. У результаті цього активність М β Л пригнічується не класичними інгібіторами серинових β -лактамаз (клавулановою кислотою, сульбактамом, тазобактамом), а різними хелатувальними, тобто зв'язуючими іони двовалентних металів агентами, наприклад, етилендіамінтетрацтовою кислотою чи 2-меркаптопропіоновою кислотою. Білкова глобула М β Л складається з двох доменів, у кожному з яких є по два атоми цинку. Обидва домени мають практично однакову топологію. Передбачається, що ці ферменти виникли в результаті дуплікації гена, який кодує один із доменів [2; 3; 8]. Метало- β -лактамази ефективно гідролізують усі β -лактамні антибіотики. Тому виявлення продуцентів М β Л серед грамнегативних мікроорганізмів необхідне для оптимального лікування пацієнтів, контролю за швидкістю розповсюдження резистентності [8].

За результатами аналізу встановлено, що всі 6 досліджуваних штамів *P. aeruginosa* продукують М β Л (рис. 2). Це свідчить про високий рівень розповсюдженості М β Л-індукованої резистентності до карбапенемів.

За останнє десятиліття описано 5 генетичних груп набутих МβЛ: VIM, IMP, SPM, GIM і SIM. Найширше розповсюдження та клінічне значення отримали ферменти VIM і IMP типів. Швидке розповсюдження МβЛ значною мірою зумовлене тим, що їх кодувальні гени, за винятком blaSIM-1, локалізовані всередині мобільних генетичних елементів – інтегронів. Крім того, зчеплення генів МβЛ з іншими детермінантами резистентності у складі інтегронів – часта причина множинної антибіотикостійкості штамів-продуцентів МβЛ [3].

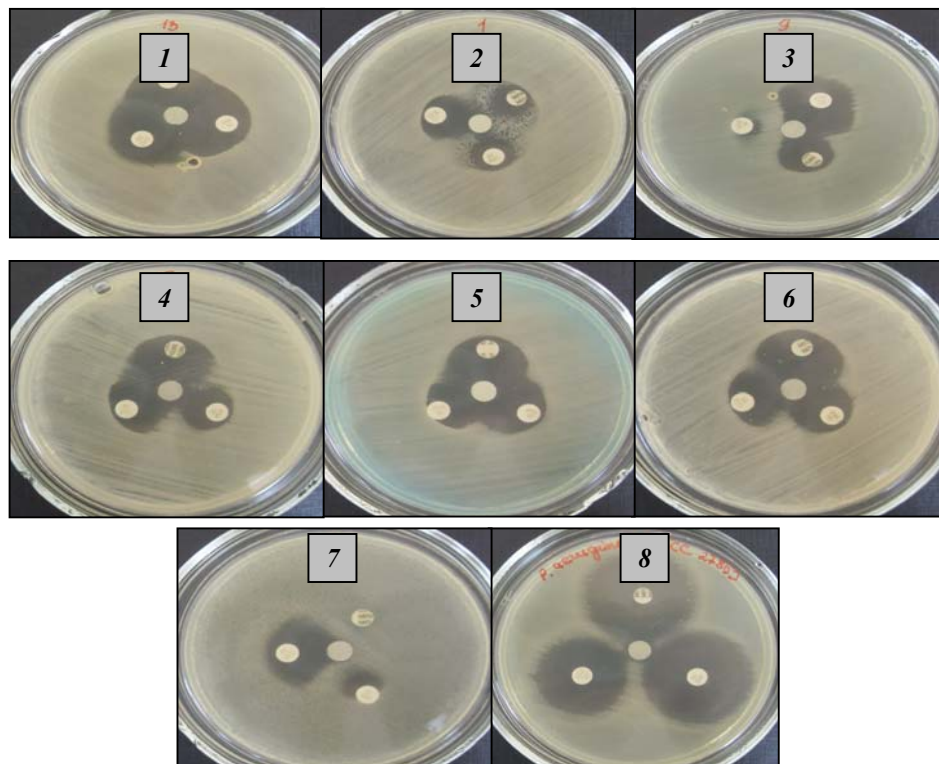


Рис. 2. Виявлення продукції метало-β-лактамаз за допомогою методу подвійних дисків з ЕДТО: 1–6 – досліджувані штами *P. aeruginosa* (позитивні результати, МβЛ+), 7 – *P. aeruginosa* VIM-10 (позитивний контроль), 8 – *P. aeruginosa* ATCC 27853 (негативний контроль)

Зростаюча розповсюдженість набутих метало-β-лактамаз змушує звернути увагу на підвищення їх клінічної важливості, а також необхідність здійснення моніторингу за поширенням продуцентів МβЛ.

Висновки

Серед 17 полірезистентних штамів *P. aeruginosa* виявлено 11 резистентних і 4 помірно стійких до іміпенему. За підсумками Hodge-тесту, серед резистентних і помірно стійких до іміпенему штамів виявлено 6 позитивних результатів на продукцію карбапенемаз. Розповсюдженість штамів-продуцентів карбапенемаз серед резистентних і помірно стійких до іміпенему складає відповідно 33,3 та 6,6 %. Отримані 9 негативних результатів свідчать про наявність у штамів *P. aeruginosa* інших механізмів резистентності до карбапенемів, крім дії карбапенемаз. За результатами фенотипічного тесту наявність метало-β-лактамаз встановлена у 100 % штамів, що продукують карбапенемгідролізувальні ферменти. Такий високий рівень розповсюдженості МβЛ зумов-

лений тим, що їх кодувальні гени локалізовані всередині мобільних генетичних елементів – інтегронів. Зчеплення генів МβЛ з іншими детермінантами резистентності у складі інтегронів – причина множинної антибіотикостійкості штамів-продуцентів МβЛ.

Бібліографічні посилання

1. **Антибактериальные** лекарственные средства. Методы стандартизации препаратов. – М. : Медицина, 2004. – 944 с.
2. **Методика** клинических лабораторных исследований. Справочное пособие. – Т. 3. Клиническая микробиология. Паразитологические исследования. Инфекционная иммунодиагностика. Молекулярные исследования в диагностике инфекционных заболеваний / Под ред. В. В. Меньшикова. – М. : Лабора, 2009. – 880 с.
3. **Сидоренко С. В.** Молекулярные основы резистентности к антибиотикам / С. В. Сидоренко, В. И. Тишков // Успехи биологической химии. – 2004. – Т. 44. – С. 263–306.
4. **Страчунский Л. С.** Резистентность грамотрицательных возбудителей инфекций мочевыводящих путей к антибактериальным препаратам / Л. С. Страчунский, С. В. Сехин, Э. Р. Абрамова // Терапевтический архив. – 2000. – № 6. – С. 30–35.
5. **Яковлев С. В.** Устойчивость *Pseudomonas aeruginosa* к карбапенемам: уроки исследования MYSTIC // Фарматека. – 2007. – № 8/9. – С. 56–62.
6. **Anderson K. F.** Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Enterobacteriaceae / K. F. Anderson, D. R. Lonsway, J. K. Rasheed // Journal of Clinical Microbiology. – 2007. – Vol. 8. – P. 2723–2725.
7. **Arakawa Y.** Convenient test for screening metallo-β-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds / Y. Arakawa, N. Shibata, K. Shibayama // Journal of Clinical Microbiology. – 2000. – Vol. 6. – P. 40–43.
8. **Lee K.** Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-β-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species / K. Lee, Y. Chong, H. B. Shin // Clinical Microbiology and Infection. – 2001. – Vol. 7. – P. 88–102.
9. **Lee K.** Evaluation of Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-β-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.* / K. Lee, Y. S. Lim, D. Yong // Journal of Clinical Microbiology. – 2003. – Vol. 10. – P. 4623–4629.
10. **Migliavacca R.** Simple microdilution test for detection of metallo-β-lactamase-producing in *Pseudomonas aeruginosa* / R. Migliavacca, J. D. Docquier, C. Mugnaioli // Journal of Clinical Microbiology. – 2002. – Vol. 11. – P. 4388–4390.

Надійшла до редколегії 26.04.2011

УДК 616.94:617(471.34)

Ю. Ю. Нікуліна, К. В. Лаврентьєва, Н. В. Черевач, О. А. Сірокваша, А. І. Вінніков

*Дніпропетровський національний університет ім. Олесь Гончара
Дніпропетровська обласна клінічна лікарня ім. І. І. Мечникова*

БИОЛОГИЧНИ ВЛАСТИВОСТІ БАКТЕРІЙ РОДУ *STAPHYLOCOCCUS*, ВИДІЛЕНИХ ВІД ПАЦІЄНТІВ ДНІПРОПЕТРОВСЬКОЇ КЛІНІЧНОЇ ЛІКАРНІ ІМ. І. І. МЕЧНИКОВА

Досліджено біологічні властивості 494 штамів бактерій роду *Staphylococcus*, виділених із патологічного матеріалу пацієнтів 15 відділень Дніпропетровської обласної клінічної лікарні ім. І. І. Мечникова. Досліджена мікрофлора представлена чотирма видами бактерій: *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* та *S. saprophyticus*. Найпоширеніший збудник стафілококових інфекцій – золотистий стафілокок. Найчутливішими виділені бактерії виявилися до лінезоліду, гентаміцину та меропенему.

Ю. Ю. Никулина, Е. В. Лаврентьева, Н. В. Черевач, Е. А. Сирокваша, А. И. Винников

*Днепрпетровский национальный университет им. Олесь Гончара
Днепрпетровская областная клиническая больница им. И. И. Мечникова*

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ РОДА *STAPHYLOCOCCUS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ ДНЕПРОПЕТРОВСКОЙ ОБЛАСТНОЙ КЛИНИЧЕСКОЙ БОЛЬНИЦЫ ИМ. И. И. МЕЧНИКОВА

Исследованы биологические свойства 494 штаммов бактерий рода *Staphylococcus*, выделенных из патологического материала пациентов 15 отделений Днепропетровской областной клинической больницы им. И. И. Мечникова. Исследуемая микрофлора представлена четырьмя видами бактерий: *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* и *S. saprophyticus*. Самый распространенный возбудитель стафилококковых инфекций – золотистый стафилококк. Наибольшую чувствительность выделенные бактерии проявили к линезолиду, гентамицину и меропенему.

Y. Y. Nikulina, K. V. Lavrentyeva, N. V. Cherevach, O. A. Sirokvascha, A. I. Vinnikov

*Oles Honchar Dnipropetrovsk National University
I. I. Mechnikov Dnipropetrovsk Region Clinical Hospital*

BIOLOGICAL PROPERTIES OF *STAPHYLOCOCCUS* GENUS STRAINS FROM PATIENTS OF MECHNIKOV DNIPROPETROVSK REGION CLINICAL HOSPITAL

It was investigated the biological properties of 494 strains of *Staphylococcus* genus isolated from pathological material of patients from 15 Departments of Mechnikov Dnipropetrovsk Region Clinical Hospital. All microflora was presented by four bacteria species: *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* and *S. saprophyticus*. *S. aureus* was the most extended agent of infections. All bacteria were the most sensitive to linezolid, gentamycin and meropenem.

Вступ

Стафілококова інфекція являє собою одну з найсерйозніших проблем охорони здоров'я, особливо протягом останнього десятиріччя, тому що інфекційні захворювання викликають вже і ті штами стафілококів, які раніше вважалися непатогенними, у першу чергу це стосується епідермального стафілокока [1; 4]. У наш час відомо понад 120 клінічних форм стафілококових інфекцій.

Актуальність проблеми стафілококових інфекцій визначається декількома аспектами. Стафілококи – представники нормальної мікрофлори людини, тому їх безпосереднє виявлення в організмі людини не є доказом того, що саме вони – збудники того чи іншого захворювання. Їх етіологічна роль у виникненні багатьох захворювань суперечлива та потребує додаткових досліджень і удосконалених методів діагностики [7; 10]. Самолікування хворих, недотримання режимів стерилізації та дезінфекції медичного інструментарію та обладнання працівниками лікувальних і діагностичних закладів, висока частота генетичних рекомбінацій у стафілококів викликають появу антибіотикополірезистентних штамів і, як наслідок, спалахів внутрішньолікарняних інфекцій [8; 9]. Останні важко піддаються лікуванню антибіотиками, які займають провідне місце серед засобів хімотерапії, що використовуються для боротьби зі стафілококовими інфекціями [11; 12].

У зв'язку з цим мета роботи – оцінити біологічні властивості 494 штамів бактерій роду *Staphylococcus*, виділених із патологічного матеріалу від пацієнтів 15 відділень Дніпропетровської обласної клінічної лікарні ім. І. І. Мечникова, та визначити їх чутливість до антибіотиків різних фармакологічних груп.

Матеріал і методи досліджень

Для виділення та дослідження стафілококів у пацієнтів Дніпропетровської обласної клінічної лікарні ім. І. І. Мечникова здійснювали забір клінічного матеріалу з ліквору, сечі, мокротиння, поранень різного походження, носа, горла, очей, піхви з наступним висівом на кров'яний агар [1; 2] та елективні для стафілококів середовища: жовтково-сольовий (ЖСА) та молочно-жовтково-сольовий агар (МЖСА). Надалі, згідно із Наказом МОЗ № 535 від 22.04.1985 р. [5], проводили мікроскопію забарвлених за Грамом мазків із вирослих колоній. Якщо за даними мікроскопії в досліджуваному матеріалі бактерій виявлялося мало, здійснювали посів у збагачувальне тіогліколеве середовище, а звідти знову на елективні. Через добу описували характер росту та морфологію колоній, що виросли. З усіх типів колоній робили мазки, забарвлювали за Грамом і мікроскопіювали, виявляючи типові грамозитивні коки. Видову ідентифікацію штамів проводили за допомогою мінімального диференціувального ряду тестів: утворення плазмокоагулази, гіалуронідази, лужної фосфатази, ДНК-ази, лецитинази, ліпази, уреаз, стійкості до новобіоцину та поліміксину В, ферментації вуглеводів в анаеробних умовах [3; 4].

Чутливість до антибіотиків виділених штамів бактерій визначали диско-дифузійним методом. Для дослідження антибіотикочутливості використано антибіотики різних фармакологічних груп: цефалоспорини – цефепім, цефуросим аксетил, цефотаксим, цефтріаксон; аміноглікозиди – гентаміцин, амікацин, нетилміцин; β-лактами – ампіцилін, імipенем, меропенем, оксацилін; фторхінолони – гатифлоксацин, ципрофлоксацин, моксифлоксацин, левофлоксацин, норфлоксацин; тетрацикліни – доксицилін, тетрациклін; макроліди – еритроміцин; оксазолідинони – лінезолід. Результати обробляли статистично [6].

Результати та їх обговорення

Мікробіологічне дослідження матеріалу від пацієнтів при інфекційних захворюваннях різної етіології проведено на базі бактеріологічної лабораторії Дніпропетровської обласної клінічної лікарні ім. І. І. Мечникова. Від пацієнтів 15 відділень лікарні виділено 494 штами бактерій, які за комплексом культуральних та фізіолого-біохімічних ознак віднесено до роду *Staphylococcus*. Усі виділені культури на кров'яному агарі утворювали непрозорі, злегка опуклі колонії середніх розмірів із гладенькою, блискучою поверхнею, чітко окресленим краєм, маслянистої консистенції. Патогенні штами утворювали навколо колоній прозорі зони гемолізу. При мікроскопії мазків клітини мали вигляд коків, зібраних у вигляді виноградного грона, забарвлених за Грамом позитивно.

На ЖСА стафілококи утворювали колонії із зоною помутніння навколо них (лецитиназна активність) і характерним райдужним ореолом по периферії (ліпазна активність), а колонії штамів *S. aureus*, крім того, синтезували жовто-оранжевий пігмент. Видову ідентифікацію штамів проводили за допомогою додаткових біохімічних тестів (табл. 1).

Таблиця 1

Диференціальні ознаки стафілококів, виділених від пацієнтів Дніпропетровської обласної клінічної лікарні ім. І. І. Мечникова

Ознака	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i>
Каротиноїдний пігмент	+	-	-	V
Утворення плазмокоагулази	+	-	-	-
Гіалуронідаза	+	-	-	-
Термостабільна ДНК-аза	+	-	-	-
Лужна фосфатаза	+	+	-	-
Уреаза	V	+	+	-
Стійкість до новобіоцину	-	-	+	-
Стійкість до поліміксину В	+	+	-	-
Анаеробна ферментація вуглецьумісних сполук:				
- маніту	+	-	V	V
- трегалози	+	-	+	+
- манози	+	(+)	-	-
- мальтози	+	+	+	+
- сахарози	+	+	+	+
- фуранози	+	V	+	V

Примітки: «-» – негативна реакція, «+» – позитивна реакція, «(+)» – слабо позитивна реакція, «V» – варіабельна реакція.

Штами (243), які синтезували на ЖСА каротиноїдні пігменти, утворювали гіалуронідазу, ДНК-азу, фосфатазу, були стійкими до поліміксину В і нестійкими до новобіоцину, ферментували маніт, трегалозу, манозу, мальтозу, сахарозу та фуранозу в анаеробних умовах віднесено до *S. aureus*. Із них 156 штамів були коагулазопозитивними, а 87 – коагулазонегативними. 95 штамів, що не синтезували каротиноїдних пігментів, плазмокоагулази, гіалуронідази, ДНК-ази, а утворювали фосфатазу та здійснювали анаеробну ферментацію мальтози та сахарози, характеризувались стійкістю до поліміксину В і чутливістю до новобіоцину, віднесено до *S. epidermidis*. Для 85 штамів, які ідентифікували як *S. saprophyticus*, позитивними тестами виявилися синтез уреаз та стійкість до новобіоцину, інші тести були негативними. Крім того, виділені культури були здатні до ферментації трегалози, мальтози, сахарози та фуранози в анаеробних умовах. Для 71 штаму, віднесеного до *S. haemolyticus*, відмічали відсутність синтезу всіх перелічених ферментів. Бактерії цього виду характеризувались чутливістю до но-

вобіоцину та поліміксину В і в анаеробних умовах ферментували лише мальтозу, трегалозу та сахарозу.

Весь спектр збудників стафілококових інфекцій у пацієнтів 15 відділень Дніпропетровської обласної клінічної лікарні ім. І. І. Мечникова представлений чотирма видами бактерій: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* та *S. haemolyticus*. Причому найчастіше штами *S. aureus* (табл. 2) виявлялися при флегмонах і абсцесах – у 57,2 %, захворюваннях органів дихання – у 63,6 %, запаленні суглобів – у 72,7 % та кісткової тканини – у 82,6 % пацієнтів. *S. epidermidis* найчастіше виявлявся при захворюваннях сечовидільної системи (у 28,6 % випадків), а *S. haemolyticus* – при запаленні мозкових оболонок – у 43,8 % пацієнтів. Найбільший відсоток виявлення *S. saprophyticus* установлений при захворюваннях органів травлення (28,5 %) і захворюваннях сечовидільної системи (28,6 %).

Таблиця 2

Наявність у біоматеріалі (%) бактерій роду *Staphylococcus* при захворюваннях різних систем органів і тканин

Ураження систем органів і тканин	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. saprophyticus</i>
Органи травлення	42,9	14,3	14,3	28,5
Органи дихання	62,6	11,4	25,0	1,0
Сечовидільна система	14,2	28,6	28,6	28,6
Мозкові оболонки	25,0	18,7	43,8	12,5
Суглоби	72,8	15,2	6,0	6,0
Кісткова тканина	82,6	8,7	2,2	6,5
Флегмони та абсцеси	57,2	8,7	14,5	19,6

При дослідженні антибіотикочутливості виділених штамів бактерій встановлено, що 100,0 % штамів *S. aureus*, виділених із клінічного матеріалу, мали стійкість до амікацину та іміпенему (табл. 3, 4).

Таблиця 3

Визначення чутливості (%) до антибактеріальних препаратів штамів *Staphylococcus aureus* і *S. epidermidis*

Фармакологічна група антибіотиків		<i>S. aureus</i>			<i>S. epidermidis</i>		
		стійкі	помірно чутливі	чутливі	стійкі	помірно чутливі	чутливі
Цефалоспорины	цефепім	33,3	0,0	66,7	100,0	0,0	0,0
	цефуроксим	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0
	аксетил						
	цефотаксим	50,0	0,0	50,0	0,0	100,0	0,0
цефтріаксон	50,0	0,0	50,0	0,0	100,0	0,0	
Аміноглікозиди	гентаміцин	3,2	2,5	94,3	6,3	12,5	81,2
	амікацин	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
	нетілміцин	0,0	0,0	100,0	33,3	0,0	66,7
β-лактами	ампіцилін	73,4	0,0	26,6	100,0	0,0	0,0
	іміпенем	100,0	0,0	0,0	17,0	0,0	83,0
	меропенем	50,0	0,0	50,0	0,0	0,0	100,0
	оксацилін	18,6	0,7	80,7	73,5	4,0	22,5
Фторхінолони	гатифлоксацин	7,2	23,1	69,7	14,0	16,0	70,0
	ципрофлоксацин	4,0	3,3	92,7	27,8	11,0	61,2
	моксифлоксацин	2,9	21,3	75,8	1,8	47,9	50,3
	левофлоксацин	0,5	0,5	99,0	9,0	12,6	78,4
	норфлоксацин	0,0	0,0	100,0	25,0	0,0	75,0
Тетрацикліни	доксидиклін	2,7	26,3	71,0	6,1	14,1	79,8
	тетрациклін	33,5	7,5	59,0	57,6	14,8	27,6
Макролід	еритроміцин	27,5	23,5	49,0	45,4	24,6	30,0
Оксазолідинони	лінезолід	7,3	0,2	92,5	3,0	0,0	97,0

Найактивнішими антибіотичними препаратами відносно *S. aureus* виявилися аміноглікозиди – гентаміцин (94,3 % штамів), нетилміцин (100,0 %), антибактеріальні препарати фторхінолонової групи – ципрофлоксацин (92,7 %), левофлоксацин (99,0 %), норфлоксацин (100,0 %) та лінезолід (92,5 %).

Що стосується *S. epidermidis*, то 100,0 % штамів цього виду виявилися стійкими до цефепіму та ампіциліну. Проте 100,0 % штамів *S. epidermidis* проявили чутливість до амікацину та меропенему. Також високочутливими *S. epidermidis* були до гентаміцину (81,2 % штамів), іміпенему (83,0 %) та лінезоліду (97,0 %).

Штами *S. haemolyticus* проявили стійкість до еритроміцину, ципрофлоксацину та ампіциліну (див. табл. 4). Резистентними до цих препаратів були 63,3, 69,1 і 73,1 % штамів відповідно. Поряд із цим 100,0 % штамів чутливі до цефотаксиму, цефтріаксону, нетилміцину та меропенему. Відносно високу чутливість *S. haemolyticus* проявили до лінезоліду (95,2 %), іміпенему (90,0 %), гентаміцину (88,1 %) та оксациліну (80,7 %).

Що стосується *S. saprophyticus*, то 100,0 % штамів проявили стійкість до цефалоспоринів (цефепіму, цефуроскиму аксетилу, цефотаксиму, цефтріаксону), аміноглікозидів (амікацину, нетилміцину, ампіциліну) та фторхінолонів (моксифлоксацину та норфлоксацину). Проте 100,0 % штамів *S. saprophyticus* чутливі до гентаміцину та меропенему.

Таблиця 4

Визначення чутливості (%) до антибактеріальних препаратів штамів *Staphylococcus haemolyticus* та *S. saprophyticus*

Фармакологічна група антибіотиків		<i>S. haemolyticus</i>			<i>S. saprophyticus</i>		
		стійкі	помірно чутливі	чутливі	стійкі	помірно чутливі	чутливі
Цефалоспорини	цефепім	33,4	33,3	33,3	100,0	0,0	0,0
	цефуроским	50,0	50,0	0,0	100,0	0,0	0,0
	аксетил	50,0	50,0	0,0	100,0	100,0	100,0
	цефотаксим	0,0	0,0	100,0	100,0	0,0	0,0
	цефтріаксон	0,0	0,0	100,0	100,0	0,0	0,0
Аміноглікозиди	гентаміцин	11,9	0,0	88,1	0,0	0,0	100,0
	амікацин	33,3	0,0	66,7	100,0	0,0	0,0
	нетилміцин	0,0	0,0	100,0	100,0	0,0	0,0
β-лактами	ампіцилін	73,1	0,0	26,9	100,0	0,0	0,0
	іміпенем	10,0	0,0	90,0	50,0	50,0	0,0
	меропенем	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0
	оксацилін	18,6	0,7	80,7	90,0	10,0	0,0
Фторхінолони	гатіфлоксацин	1,9	26,0	72,1	0,0	0,0	100,0
	ципрофлоксацин	69,1	4,8	26,1	50,0	0,0	50,0
	моксифлоксацин	16,1	7,8	76,1	100,0	0,0	0,0
	левофлоксацин	9,0	26,4	64,6	0,0	16,7	83,3
	норфлоксацин	55,6	0,0	44,4	100,0	0,0	0,0
Тетрацикліни	доксциклін	14,4	17,4	68,2	25,0	0,0	75,0
	тетрациклін	29,0	40,0	31,0	25,0	0,0	75,0
Макроліди	еритроміцин	63,3	20,0	16,7	25,0	50,0	25,0
Оксазолідинони	лінезолід	3,8	1,0	95,2	83,4	0,0	16,6

Універсальними препаратами для лікування стафілококових інфекцій виявилися аміноглікозид гентаміцин, β-лактам меропенем і оксазолідинон лінезолід.

Висновки

Виділено 494 штами бактерій роду *Staphylococcus* від пацієнтів 15 відділень Дніпропетровської обласної клінічної лікарні ім. І. І. Мечникова. Досліджена мікрофлора представлена чотирма видами стафілококів: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* та *S. saprophyticus*. Найпоширенішим збудником стафілококових інфекцій, а са-

ме абсцесів, флегмон, захворювань органів дихання, запалення суглобів і кісткової тканини виявився *S. aureus*. *S. haemolyticus* найчастіше виділявся при запаленнях мозкових оболонок. Інші види стафілококів практично з однаковою частотою виявлялися при захворюваннях сечовидільної системи. Серед протестованих антибактеріальних препаратів найефективнішими відносно всіх видів стафілококів були аміноглікозид гентаміцин, β-лактам меропенем і оксазолідинон лінезолід.

Бібліографічні посилання

1. **Воробьев А. А.** Медицинская и санитарная микробиология. – М. : Академия, 2003. – 464 с.
2. **Практична мікробіологія** / С. Є. Климнюк, І. О. Ситник, М. С. Творко та ін. – Т. : Укрмедкнига, 2002. – 352 с.
3. **Поздеев О. К.** Медицинская микробиология / О. К. Поздеев, В. И. Покровский. – М. : Геотар-мед, 2001. – 656 с.
4. **Покровский В. И.** Стафилококки. – М. : Медицина, 2005. – 340 с.
5. **Приказ Минздрава СССР** от 22.04.1985 г. № 535 об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений. – 12 с.
6. **Решедько Г. К.** Особенности определения чувствительности микроорганизмов диско-диффузионным методом // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2001. – Т. 3, № 4. – С. 28–32.
7. **Bengualid V.** Not all coagulase negative *Staphylococcus* are created equal / V. Bengualid, J. Krishnaprakash, R. Tan // New York Medical Journal. – 2009. – Vol. 4, N 2. – P. 17–21.
8. **Bonten M.** Microcin for preventing *Staphylococcus aureus* infections / M. Bonten, R. Wenzel, J. Kluymons // Journal of Perioperative Practice. – 2009. – Vol. 102, N 11. – P. 120–124.
9. **Combes A.** Impact of methicillin resistance on outcome of *Staphylococcus aureus* ventilator-associated pneumonia / A. Combes, C. Luyt, M. Wolf // Respiratory and Critical Care Medicine. – 2004. – Vol. 170, N 10. – P. 786–792.
10. **Derycke L.** *Staphylococcus aureus* and chronic airway disease / L. Derycke, N. Pere // World Allergy Organization Journal. – 2010. – Vol. 3, N 8. – P. 223–228.
11. **Guzman-Blanco M.** Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin America / M. Guzman-Blanco, C. Mejia, R. Isturiz // International Journal of Antimicrobial Agents. – 2009. – Vol. 5, N 6. – P. 304–308.
12. **Zimmerman U. P.** Occurrence and significance of *S. aureus* resistant to gentamicin // Antinfection. Drugs and Chemoter. – 2008. – Vol. 16, N 2. – P. 147–149.

Надійшла до редколегії 12.04.2011

УДК 616.98:579.841.52+036.21:599.323

І. Т. Русев

Український науково-дослідний протичумний інститут ім. І. І. Мечникова, Одеса

ВПЛИВ АНТРОПОГЕННОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ ТЕРИТОРІЇ ДУНАЙ-ДНІСТРОВСЬКОГО МЕЖИРІЧЧЯ НА ПРИРОДНУ ВОГНИЩЕВІСТЬ ТУЛЯРЕМІЇ

Проаналізовано еколого-епізootичну та епідемічну активність природного вогнища туляремії у Дунай-Дністровському межиріччі у ХХ сторіччі. Встановлено, що за цей період епізootична та епідемічна активність проявилась двічі: у 1948–1949 та 1988–1989 роках. Навіть кардинальне перетворення природних екосистем під впливом господарської діяльності людини може тільки тимчасово припинити активність вогнища туляремії, але ніяк не викоренити її, що свідчить про її стійкість.

И. Т. Русев

Украинский научно-исследовательский противочумный институт им. И. И. Мечникова, Одесса

ВЛИЯНИЕ АНТРОПОГЕННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ТЕРРИТОРИИ ДУНАЙ-ДНЕСТРОВСКОГО МЕЖДУРЕЧЬЯ НА ПРИРОДНУЮ ОЧАГОВИСТЬ ТУЛЯРЕМИИ

Проаналізована еколого-епізootична та епідемічна активність природного очага туляремії в Дунай-Дністровському межуріччя в ХХ столітті. Установлено, що за цей період епізootична та епідемічна активність проявилась двічі: в 1948–1949 і 1988–1989 роки. Навіть кардинальне переобрання природних екосистем під впливом господарської діяльності людини може тільки тимчасово припинити активність очага туляремії, але ніяк не викоренити його, що свідчить про стійкість інфекції.

I. T. Rusev

I. I. Mechnikov Ukrainian Antiplague Research Institute, Odessa

INFLUENCE OF ANTHROPOGENIC TRANSFORMATION OF DANUBE–DNIESTER INTERFLUVE ON NATURAL FOCI OF TULARAEMIA

The paper is devoted to the problem of occurrence of bacteria *Francisella tularensis* in steppe coastal zone of the Black Sea west part in the second half of XX century. The key factor decreasing the activity of tularaemia natural foci is anthropogenic influence. Resumed activity of natural foci appeared after implementation of big irrigation and drainage construction in former USSR – building of the Danube-Dniester-Dnepr irrigation system resulted in forming new environmental conditions as well as corridors for tularaemia distribution. The practical recommendation is to implement the eco-epizootological monitoring and to collect data for developing practical management of the natural foci of disease.

Вступ

Вплив антропогенної трансформації та господарського освоєння території степової зони України на ензootичний потенціал ряду природно-вогнищевих інфекцій – про-

блема актуальна, незважаючи на визначні досягнення в галузі профілактики ряду нозозформ [10; 18]. Серед останніх, перш за все, треба відзначити туляремію – як найрозповсюдженішу природно-вогнищеву інфекцію на території України, епідемічні прояви якої суттєво залежать від антропогенних впливів [16].

Результати аналізу багатьох праць із даної проблеми свідчать, що зниження епідемічної активності природних вогнищ туляремії, безсумнівно, викликане як вакцинацією населення [3; 7; 9; 16; 17], так і зменшенням її епізоотичного потенціалу, зумовленого господарською діяльністю людини [2; 11; 14]. Тому встановлення закономірності природної вогнищевості туляремії в перетворених природних ландшафтах особливо важливе для раціонального планування протиепідемічних заходів та є основною умовою оптимізації комплексу профілактичних заходів. Тим більше, що, незважаючи на широке розповсюдження природних вогнищ туляремії в Україні, скільки-небудь масштабних наукових досліджень, присвячених вивченню їх біоценотичної структури, епізоотологічних та епідеміологічних особливостей розповсюдження на різних територіях, у різних ландшафтно-географічних зонах не проведено. Як на одну з найсерйозніших у цьому плані можна вказати на роботу В. С. Бесалова з вивчення природного вогнища туляремії на о. Бирючий, виконану ще в 1960-х роках [1].

Виходячи з викладеного, ця праця присвячена аналізу епізоотичного та епідемічного проявів природного вогнища туляремії та виявленню екологічної основи його існування у степовій зоні південно-західної частини України – Дунай-Дністровському межиріччю в умовах антропогенного навантаження.

Матеріал і методи досліджень

В основу роботи покладено матеріали ретроспективного аналізу захворюваності людей на туляремію за архівними та звітними документами 1947–2002 років Одеської ПЧС, Одеської обласної СЕС, районних лікарень і санепідстанцій, розташованих на території Дунай-Дністровського межиріччя (Ізмаїльський, Білгород-Дністровський, Арцизький, Болградський, Кілійський, Ренійський, Саратський, Тарутинський і Татарбунарський райони Одеської області) – територія колишньої Бессарабії до середини 1944 року, яка входила до складу Румунії.

Біоценотична структура природного вогнища туляремії встановлена за даними, зібраними в процесі еколого-епізоотологічного обстеження території, проведеного експедиційним загоном Українського науково-дослідного протичумного інституту ім. І. І. Мечникова під керівництвом автора, а також за архівними матеріалами. Польовий матеріал, а також сироватки крові хворих вивчали в бактеріологічній протичумного інституту з використанням бактеріологічних і серологічних методів дослідження.

Результати та їх обговорення

Дунай-Дністровське межиріччя, розташоване у степовій зоні України на території Причорноморської низини. Воно являє собою акумулювативну низову приморську рівнину, розчленовану річковими долинами та балками. Прибережні водні екосистеми межиріччя представлені приморськими лиманами, дельтами Дунаю та Дністра, а також системою придунайських озер.

Долини річок глибокі та вузькі у верхів'ях, знижуються та розширюються в приморській частині, де вони поступово переходять у лимани (Сасик, Шагани, Алибей, Бурнас та ін.), а в придунайській низині – у придунайські озера (Кагул, Ялпуг, Катлабух, Китай та ін.). Цей район виділяється серед інших степових областей Північно-Західного Причорномор'я найбільшими тепловими ресурсами, порівняно слабкою

континентальністю та теплою зимою. Середньорічна амплітуда температур складає 24–26 °С. Безморозний період триває понад 200 діб. Середньорічні опади (350–400 мм) розподіляються вкрай нерівномірно.

Перші свідчення про захворювання на туляремію на території Дунай-Дністровського межиріччя України відносять до періоду румунської окупації Бессарабії, коли в 1941–1942 рр. серед осіб, які займалися промислом гризунів, з'явилося захворювання, що супроводжувалося збільшенням лімфатичних вузлів. Туляремійний характер захворювання був підтверджений внутрішньошкірною пробою з тулярином. У грудні 1947 року у військовій частині, дислокованій у Ренійському районі, захворіло 75 % усього складу. Етіологія захворювання була підтверджена імунологічними реакціями. У 1948 и 1949 рр. хворобу діагностували практично на території всього Дунай-Дністровського межиріччя.

Перші випадки захворювання були зареєстровані на початку 1948 року на територіях, прилеглих до водних екосистем, розташованих у басейні Дунаю, придунайських озер і дельти Дністра, де, вірогідно, існувало заплавно-болотяне вогнище туляремії. Найінтенсивніші епізоотії захворювання серед гризунів та епідемічні ускладнення на той період були відмічені в Татарбунарському, Кілійському та Старо-Козацькому районах. Усього протягом зимово-весняного періоду 1948 року серед громадянського населення зареєстровано 292 випадки захворювання. Улітку 1948 року в окремих районах відмічали поодинокі випадки захворювання. Усього за липень – серпень нараховано 30 випадків.

Із кінця вересня 1948 року кількість захворювань почала різко зростати й у грудні досягла максимуму (2 972 випадки), а з січня кількість захворювань знизилася й із квітня відмічалися вже поодинокі випадки (рис. 1).

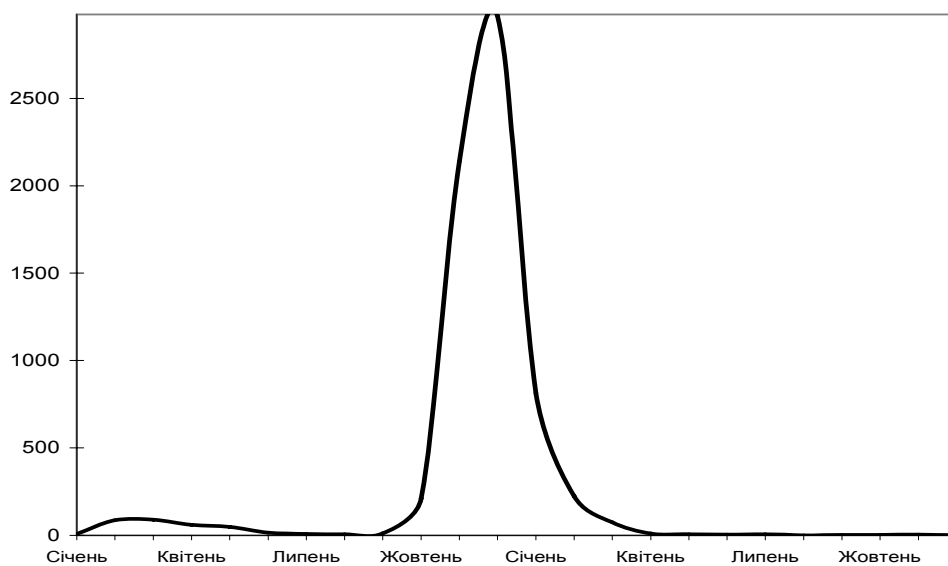


Рис. 1. Динаміка кількості хворих на туляремію в 1948–1949 рр. у Дунай-Дністровському межиріччі

Загальна кількість хворих на території Дунай-Дністровського межиріччя у 1948–1949 рр. представлена в таблиці. Картина епідемічного прояву епізоотії туляремії по всіх адміністративних районах Дунай-Дністровського межиріччя подібна: на початку 1948 року незначна кількість хворих і стрімке зростання кількості їх кількості з осені

1948 до зими 1949 року, що свідчить про занесення інфекції в селитебні зони мишо-подібними гризунами в результаті їх природної осінньої міграції. Це властиво, перш за все, для хатньої миші (*Mus musculus* Linnaeus, 1758), хоча слід зосередити увагу на одній особливості. У Дунай-Дністровському межиріччі поряд із хатньою розповсюджена і курганцева миша (*Mus spicilegus* Petenyi, 1882). Причому характерно те, що останній вид, на відміну від хатньої миші, цілорічно існує у природних умовах, споруджуючи на зиму своєрідні укриття – курганчики [4; 6; 12]. Тому слід уважати, що, будучи активним «паливним» матеріалом для епізоотії туляремії у степовій зоні, цей вид не може бути важливим джерелом захворювання в селитебних зонах. На цю особливість свого часу звернув увагу ще А. А. Максимов [8], характеризуючи спалах туляремії у степовій зоні Азово-Чорноморського краю.

Таблиця

Захворюваність на туляремію у Дунай-Дністровському межиріччі (1948–1949 рр.)

1948 р.		1949 р.		Усього	
усього випадків	на 10 тис. людей	усього випадків	на 10 тис. людей	усього випадків	на 10 тис. людей
5 654	117,8	1 152	26,1	6 806	143,9

Несприятливі епідеміологічні обставини відносно туляремії склалися на той період не тільки в цьому районі. Інфекція також охопила всю степову та лісостепову зони України. При цьому основними носіями інфекції служили звичайна полівка (*Microtus arvalis* Pallas, 1779) і хатня миша*. Усього за офіційними даними в Україні за цей період зареєстровано 47 620 та 16 102 випадків відповідно у 1948 і 1949 роках.

Торкаючись питання про шляхи та фактори зараження населення туляремією, слід відзначити, що переважна кількість хворих у степовому природному вогнищі туляремії Дунай-Дністровського межиріччя в середині ХХ століття заразилася внаслідок контакту з сільськогосподарськими продуктами, зараженими збудником туляремії мишовидними гризунами (звичайною полівкою та хатньою мишею).

Завдяки проведеній восени 1949 та на початку 1950 року масовій імунізації сільського населення епідемічний процес різко знизився і вже в 1950 році захворіло лише декілька десятків чоловік.

У наступні роки механізація сільськогосподарського виробництва, його хімізація, осушення водно-болотних угідь, спорудження рибних ставків, орання та культивування земель у зоні природних вогнищ туляремії, посилення боротьби з основними носіями збудника туляремії (мишо-подібними гризунами) спричинили різку депресію епізоотичного процесу протягом останніх 40 років. Виділення культур бактерії від гризунів і кліщів припинилося, і лише в окремі роки на цій території виявляли одиничні серопозитивні погадки хижих птахів у низьких титрах, що свідчило про «в'ялий» перебіг епізоотичного процесу. Тому з 1979 року ензоотичність із переважної кількості території Дунай-Дністровського межиріччя (8 районів із 9) була знята і планомірні епізоотологічні спостереження не проводилися.

У другій половині ХХ століття в регіоні відбулися істотні антропогенні перетворення. У цей період у зв'язку з масовою організацією колгоспів на території колишньої Бесарабії практично завершилася повна перебудова степових екосистем на агроценози

* Автор розуміє під звичайною полівкою наявність двох видів – східноєвропейської (*Microtus rossiaemeridionalis*) та власне звичайної полівки (*M. arvalis*), а під хатньою мишею – курганцеву (*Mus spicilegus*) і власне хатню мишу (*M. musculus*).

і почалося масове лісонасадження. Наприкінці 1970-х років почалось будівництво ДДЗС** і в результаті екосистема солоного лиману Сасик була перетворена на прісне озеро Сасик у межах каналу Дунай – Дністер – Дніпро для зрошення сільгоспугідь. Це вимагало спорудження цілої системи меліоративних каналів із наземним і підземним транспортуванням води, що спричинило регіональну екологічну кризу [13; 15].

Після введення в дію першої черги Дунай-Дністровської зрошувальної системи епізоотологічна ситуація різко змінилася і вже на початку 1980-х років кількість відригів хижих птахів з антигеном збудника туляремії в діагностичних титрах зростає. А в 1988–1989 роках виникла велика епізоотія в поселеннях основного носія збудника туляремії – звичайної полівки, яка викликала захворювання людей у колгоспі ім. Чапаєва (с. Вишневе Татарбунарського р-ну Одеської обл.).

При цьому шляхом епідеміологічного розслідування та еколого-епізоотологічного обстеження території встановлено, що зараження людей пов'язане з водою ДДЗС, яку жителі села використовували для господарсько-побутових цілей, а розширенню межі епізоотії, вірогідно, сприяли зайці-русаки. Цей факт ще раз підтверджує їх важливу роль у розповсюдженні туляремійної інфекції та формуванні просторової структури природного вогнища туляремії.

Розвитку епізоотичного процесу, крім антропогенних перетворень, сприяли особливі кліматичні умови, що передують виникненню епізоотії. Зокрема, літо 1988 року на території Дунай-Дністровського межиріччя характеризувалося значними перепадами температур і рясними опадами. Слід зазначити, що в цілому за літо середньомісячна температура на 0,5–1,5 °C перевищувала багаторічну, а кількість опадів була більшою за норму в 1,5 рази. Хитлива погода з рясними дощами значно утруднила жнива. Масове збирання зернових почалося із запізненням і проводилося до кінця серпня у складних погодних умовах. Рясні опади спричиняли полягання зернових на значній території Причорноморської ділянки степової зони. Це сприяло інтенсивній вегетації рослинності і, як наслідок, росту чисельності звичайної полівки, зайця-русака, іксодових кліщів і їх екстенсивного розселення [15]. До другої половини літа істотно збільшилися займані площі та щільність поселень звичайної полівки. А вже до осені 1988 року чисельність дрібних ссавців у степовій зоні України стала зростати досягаючи 60 % і більше влучення в давилки Геро, що вимагало від регіональних служб захисту рослин спеціальних заходів для винищення їх на полях у зв'язку з великими втратами посівів овочевих і зернових культур.

Із перших чисел серпня 1989 року експедиційним загonom протичумного інституту розпочато вивчення біоценотичної та просторової структури знову виниклого природного вогнища туляремії.

У результаті обстеження проведено облов усіх ділянок, пошук полеглих звірків, а також збирання погадок хижих птахів і калу хижих ссавців. Усього за цей період обстеження відпрацьовано 9 355 пастко-ночей, у тому числі на полях колгоспу, присадибних ділянках і прилеглих до них непридатних землях поблизу дренажної системи. Виловлено 1 151 дрібного ссавця 8 видів. При дослідженні матеріалу з навколишнього середовища виділено 15 культур туляремійної бактерії (з води – 5 культур, із гнізд полівок звичайних – 3, від мишоподібних гризунів: полівок звичайних – 2, миші лісової – 1, миші хатньої – 1, сірого пацюка – 1, зайців – 2). Видовий склад і чисельність реальних і потенційних носіїв і переносників у природному вогнищі туляремії

** ДДЗС – Дунай-Дністровська зрошувальна система – перша черга проекту Мінводгоспу СРСР з перенесення води Дунаю через Дністер у Дніпро.

свідчить про складну біоценотичну структуру наземної екосистеми, що послужила основою для сприятливого циркулювання збудника туляремії за допомогою численних функціональних зв'язків усіх компонентів – підсистем природного вогнища: наземного (повітряного), підземного (гніздово-норного) і водного біоценотичних комплексів.

Механізм формування нового вогнища, імовірно, відбувався в такий спосіб. Вода Дунай-Дністровської зрошувальної системи, а також дощові стоки могли інфікувати воду дренажного каналу, що перетинає з півночі на південь с. Вишневе, у результаті природних змивів туляремійних бактерій або безпосередньо транзитного перенесення збудника з водно-болотних угідь Стенцівсько-Жебріянівських плавнів, де існує заплавно-болотне вогнище туляремії. Можливо, прояв активності природного вогнища відбувся за рахунок ондатри, ядро поселень якої розташоване в дельті Дунаю та Стенцівсько-Жебріянівських плавнів, де вона – один із характерних носіїв збудника туляремії у водно-болотних екосистемах [10]. Міграція цих звірків зі Стенцівсько-Жебріянівських плавнів (стара частина дельти Дунаю) по гідрологічних мережах цілком очевидна, тому що дамби всіх магістральних і радіальних каналів пориті норами цього звірка. Слід також зазначити, що в прилеглих до каналу наземних екосистемах ключовими ланками у біоценотичних зв'язках туляремійного вогнища виступали звичайні полівки, хатні миші, зайці-русаки і, зрідка, через свою нечисельність, звичайні хом'яки.

Щільні біоценотичні зв'язки зазначених членів наземної та водної осередкових екосистем, насамперед, інфікованих звичайних полівок із гризунами інших видів, забезпечили залучення до епізоотії туляремії лісових мишей і навіть представника другої групи чутливості – сірого пацюка (*Rattus norvegicus*). Інтенсифікація паразитарних міжвидових контактів між гризунами, на нашу думку, відбулася у другій половині літа, коли після збирання сільськогосподарських культур, а також випалювання стерні зернових, гризуни сконцентрувалися у стаціях переживання, які були представлені на той період схилами дренажного каналу, що заросли бур'янистою рослинністю. Зараження туляремією жителів с. Вишневе відбувалося, крім безпосереднього контакту з водою дренажного каналу, очевидно, і через воду з колодязів, тому що в деяких із них при проведенні епідеміологічного розслідування виявлено інтенсивну фільтрацію води з дренажного каналу.

Висновки

Вогнище туляремії у Дунай-Дністровському межиріччі України уперше виявило свою епізоотичну та епідемічну активність наприкінці 1940-х років минулого століття. Активне антропогенне перетворення степових ландшафтів (масова оранка, формування лісозахисних лісосмуг, інтенсивна хімізація сільського господарства, різке скорочення гідроморфних територій тощо) сприяло різкій зміні видового різноманіття та чисельності основних носіїв, розриву біоценотичних зв'язків у осередкових екосистемах, що викликало глибоку депресію епізоотичного процесу та помилково оцінено як повна ліквідація природного вогнища. Це послужило підставою для припинення імунізації населення та моніторингу за осередковою екосистемою.

Гідромеліоративне втручання, пов'язане з будівництвом магістрального каналу Дунай – Дністер – Дніпро, зумовило відновлення гідроморфних ландшафтів, створення сприятливих умов для збільшення видового різноманіття переносників, формування колишніх біоценотичних взаємозв'язків осередкової екосистеми і, як наслідок, відновлення епізоотичної активності природного вогнища.

Вогнище туляремії у Дунай-Дністровському межиріччі свідчить, що навіть кардинальні перетворення природних екосистем під впливом господарської діяльності

людини можуть тільки тимчасово призупинити активність осередкової екосистеми, що свідчить про її стійкість і необхідність періодичного еколого-епізоотологічного контролю, регулярність якого повинна визначатися циклічністю атмосферних процесів і пов'язаних із ними комплексів екологічних умов.

Бібліографічні посилання

1. **Бессалов В. С.** Интенсивность зараженности возбудителем различных объектов в природном очаге туляремии на о. Бирючем Херсонской области / В. С. Бессалов, А. Г. Король // Проблемы особо опасных инфекций. – 1972. – Вып. 6 (28). – С. 117–121.
2. **Бощенко Ю. А.** Эволюция активности природных очагов туляремии в степной зоне Северо-Западного Причерноморья // Анналы Мечниковского института. – Харьков, 2001. – № 1. – С. 54–57.
3. **Ендемічність** території Львівщини із туляремії / Н. О. Виноград, Л. П. Козак, З. П. Василюшин, Е. І. Луговський // Анналы Мечниковского института. – 2003. – № 4–5. – С. 113–114.
4. **Загороднюк И. В.** *Mus spicilegus* (Mammalia) в фауне Подолии и северная граница ареала этого вида в Восточной Европе / И. В. Загороднюк, В. И. Березовский // Зоологический журнал. – 1994. – Т. 73, вып. 6. – С. 110–119.
5. **Исаков Ю. А.** О массовом размножении и гибели мышевидных грызунов в Рязанской области // Паразитология и трансмиссивные болезни. – М. : Изд-во АМН СССР, 1947. – С. 32–34.
6. **Котенкова Е. В.** О крысах и мышах / Е. В. Котенкова, Н. Н. Мешкова, М. И. Шутова. – М. : Наука, 1989. – 170 с.
7. **Кучерук В. В.** Анализ современных направлений и дальнейшие задачи изучения природно-очаговых болезней человека // Природно-очаговые болезни человека. – М., 1979. – С. 5–14.
8. **Максимов А. А.** Природные очаги туляремии в СССР. – М.–Л. : Изд-во АН СССР, 1960. – 290 с.
9. **Милютин Н. Г.** Распространение и структура природных очагов туляремии в левобережной лесостепи и смежных районах степи Украины // Проблемы паразитологии. Тр. Укр. научн. о-ва паразитологов. – К., 1964. – Т. 3. – С. 277–286.
10. **Олсуфьев Н. Г.** Об антропогенном воздействии на очаги туляремии в СССР // Антропогенное воздействие на условия существования природных очагов болезней человека. – М., 1985. – С. 11–23.
11. **Олсуфьев Н. Г.** Природные очаги туляремии и их антропогенная трансформация / Н. Г. Олсуфьев, И. С. Мещерякова // Тез. докл. XII Всесоюзной конф. по природной очаговости болезней. – М., 1989. – С. 119–121.
12. **Русев И. Т.** Характер обитания курганчиковой мыши на агроценозах Северо-Западного Причерноморья // Тез. VII Всесоюзн. совещ. по грызунам. – Свердловск, 1988. – Т. 3. – С. 131–132.
13. **Русев И. Т.** Озеро Сасык в плену экологического безумия. – К. : Эхо-Восток, 1995. – С. 165.
14. **Русев И. Т.** Пусковые механизмы активности природных очагов туляремии в степной зоне Северо-Западного Причерноморья // Наукові та практичні аспекти боротьби з інфекціями в Україні на межі сторіч. – Київ – Одеса, 2000. – С. 38–39.
15. **Русев И. Т.** Прорыв Сасыкской блокады: тернистый путь возрождения жемчужины Причерноморья. – 2001. – 461 с.
16. **Перспективы** профилактики туляремии в Украинской ССР / Г. К. Сергеев, Н. Ф. Приз, Н. Ф. Компанцев и др. // Тез. докл. X Укр. республ. съезда микробиологов, эпидемиологов и паразитологов. – К., 1980. – С. 59–60.
17. **Изучение** географического распространения туляремии и ее профилактика в Украинской ССР / Г. К. Сергеев, Н. Ф. Приз, Н. Ф. Компанцев и др. // Природно-очаговые инфекции и инвазии на территории СССР. – Л., 1983. – С. 41–45.
18. **Hornick R.** Tularemia Revisited // N. Engl. J. Med. – 2001. – Vol. 345. – P. 1637–1639.

Надійшла до редколегії 25.04.2011

УДК 619+616.98:579.842.11+631.147

Ю. С. Сухарев

Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ТЕРМОСТАБИЛЬНОГО ЭНТЕРОТОКСИНА *ESCHERICHIA COLI* ПРИ КОЛИБАКТЕРИОЗЕ ТЕЛЯТ

Разработана ИФА тест-система, с помощью которой идентифицирован термостабильный ST-энтеротоксин *Escherichia coli* в фекалиях телят на разных стадиях заболевания колибактериозом. Диапазон его титра на сверхострой стадии составил ≥ 250 нг/мл, на острой стадии – ≥ 500 нг/мл, а на подострой – $\geq 1\ 000$ нг/мл. Регистрируемые титры энтеротоксина можно считать диагностическими.

Ю. С. Сухарев

Харківський національний університет ім. В. Н. Каразіна

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТЕРМОСТАБІЛЬНОГО ЕНТЕРОТОКСИНУ *ESCHERICHIA COLI* ПРИ КОЛІБАКТЕРІОЗІ ТЕЛЯТ

Розроблено ІФА тест-систему, за допомогою якої ідентифіковано термостабільний ST-ентеротоксин *Escherichia coli* у фекаліях телят на різних стадіях захворювання колибактеріозом. Діапазон його титру на надгострій стадії склав ≥ 250 нг/мл, на гострій стадії – ≥ 500 нг/мл, а на підгострій – $\geq 1\ 000$ нг/мл. Реєстровані титри ентеротоксину можна вважати діагностичними.

Y. S. Sukharev

V. N. Karazin Kharkiv National University

IDENTIFICATION OF THE THERMOSTABLE ENTEROTOXIN OF *ESCHERICHIA COLI* IN CALVES WITH COLIBACTERIOSIS

IFA test-sistem is developed for identification of the heat stable (ST) enterotoxin of *Escherichia coli* in the calves faeces at different stages of colibacteriosis. The range of its titre makes ≥ 250 ng/ml at the hyperacute stage, at the acute stage – ≥ 500 ng/ml, and at the subacute one – $\geq 1\ 000$ ng/ml. The registered enterotoxin titres can be considered as the diagnostic indices.

Введение

Несмотря на широкое использование самых современных антибиотиков и био-препаратов, колибактериоз, который вызывают токсигенные *Escherichia coli*, занимает лидирующее положение по количеству случаев заболеваемости и смертности среди других инфекционных патологий у сельскохозяйственных животных [5; 7; 11].

Основная группа факторов, определяющих развитие диарейного синдрома при колибактериозе, включает энтеротоксины: термостабильный (ST) и термолабильный (LT), которые путем активизации аденилат- и гуанилатциклазы нарушают транспорт электролитов и воды через мембраны клеток кишечного эпителия. В результате этого данные вещества переходят в просвет тонкого кишечника, что приводит к развитию водянистой диареи и дегидратации организма [13; 14]. Колибактериоз проявляется

главным образом в первые три дня жизни телят. Иногда они заболевают сразу после рождения, еще до приема молозива, и в течение 12–48 часов болезнь оканчивается летальным исходом [12].

Имеющаяся современная классификация колибактериоза основана на учете времени течения болезни. В связи с этим по клиническим проявлениям различают сверхострую, острую и подострую формы [2; 6].

Сверхострое течение болезни встречается в основном у телят первых 3–5 дней жизни и характеризуется диареей высокой интенсивности. Истощенные животные погибают в глубоком коматозном состоянии.

Остро болезнь протекает у телят в возрасте 3–7 дней. Болезнь длится несколько суток и заканчивается летальным исходом.

Если животное перенесло острый приступ болезни, наступает постепенное выздоровление. Заболевание переходит в подострое. Подострая форма бывает также при заболевании телят в возрасте 6–10 дней и является следствием затяжного острого течения болезни.

Применяющиеся в настоящее время фенотипические методы определения токсигенности *E. coli* с технической точки зрения сложны и часто недостаточно чувствительны. Более того, они занимают не менее 18–24 часов после выделения колоний кишечной палочки до получения окончательного результата. Это обстоятельство не удовлетворяет ни клиницистов, ни эпидемиологов [3].

Известные методы определения энтеротоксигенных *E. coli* с помощью ИФА дают возможность идентифицировать только LT-энтеротоксин *E. coli* в исследуемых образцах [4]. Отсутствие иммуногенных свойств у ST-энтеротоксина не позволяет получить специфические антитела и сконструировать ИФА тест-систему для его обнаружения. На основе собственных исследований и данных литературы установлено, что энтеротоксигенные *E. coli* – возбудители колибактериоза новорожденных телят синтезируют чаще термостабильный ST-энтеротоксин [1; 8].

В связи с этим поставлена цель: определить с помощью ИФА [9] наличие ST-энтеротоксина *E. coli* и его титр в фекалиях телят при сверхостром, остром и подостром течении болезни. Новизна разработанного метода ИФА заключалась в том, что определение энтеротоксинов в фекалиях телят на разных стадиях заболевания колибактериозом осуществляли с помощью антител к конъюгату энтеротоксинов [10], обладающих аффинностью как к LT, так и к ST-энтеротоксином *E. coli*.

Материал и методы исследований

В состав разработанной ИФА тест-системы входили следующие компоненты: полистироловый 96-луночный планшет; кроличьи поликлональные биспецифические антитела к конъюгату энтеротоксинов *E. coli*; калибровочный материал – лиофилизированный ST-энтеротоксин; конъюгат мышинных антикроличьих антител с пероксидазой хрена, полученный перифодатным методом Nakane и Kawaoi; фосфатно-солевой буфер с *pH* 7,2–7,4; карбонатный буфер с *pH* 9,6; цитратный буфер; твин-20 (детергент); индикаторная субстратная смесь: кислота лимонная, натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный, ортофенилендиамин, перекись водорода; серная кислота.

У телят с клиническим проявлением сверхострой, острой и подострой формой колибактериоза брали пробы фекалий в количестве 10 г в стерильную посуду стерильным инструментом. При этом срок доставки материала в лабораторию с момента его забора не превышал 2 часов. При невозможности доставки материала в указанный срок его хранили в холодильнике при 4 °С не более 6 часов. Фекалии центрифугировали

при 2 000–3 000 об./мин. в течение получаса, осадок отбрасывали, а супернатант собирали в отдельные пробирки и использовали для ИФА.

Чувствительность тест-системы вычисляли по формуле Р. А. Тигранян:

$$\delta = \sqrt{\frac{\sum(\overline{ОП}_0 - ОП_0)^2}{n-1}},$$

где $\overline{ОП}_0$ – среднее арифметическое значение оптической плотности отрицательного контроля; $ОП_0$ – значение оптической плотности каждого измерения для отрицательного контроля; n – число измерений.

Результаты и их обсуждение

В основу разработанного метода определения энтеротоксинов *E. coli* положен метод двойных антител (“сэндвич-ИФА”). Этот тест представляет собой метод неконкурентного твердофазного ИФА для индикации энтеротоксинов *E. coli*, в котором твердая фаза покрыта высокоаффинными биспецифическими антитоксинами. Амплификация достигалась с использованием технологии полимерной конъюгации, в результате чего происходила фиксация, при которой на каждый связанный участок антигена приходился полимерный комплекс с высокомолекулярным фрагментом (рис. 1).

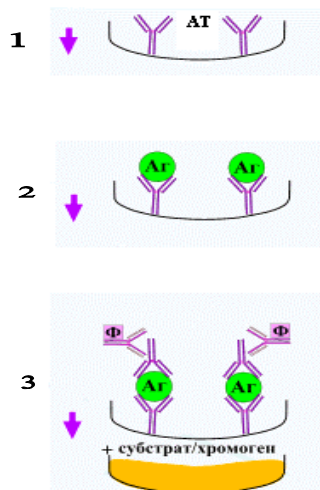


Рис. 1. Схема “сэндвич-ИФА” (метод двойных антител):

- 1 – АТ, связанные с твердой фазой; 2 – инкубация с пробой, содержащей энтеротоксины;
3 – инкубация с субстратом и измерение количества продукта реакции

Сенсибилизацию 96-луночного полистиролового планшета проводили внесением в каждую лунку 0,1 мл кроличьих специфических антитоксических антител к ST-энтеротоксину *E. coli*. Планшет накрывали крышкой и помещали на три часа в термостат при +37 °С. Извлекали содержимое лунок встряхиванием, промывали дважды раствором фосфатного буфера с твином-20, pH 7,3 и четыре раза – раствором фосфатно-солевого буфера, но без твина.

Готовили 8 двойных разведений ST в фосфатно-солевом буфере так, чтобы получить интервал концентраций от 1 000 до 0,08 нг/мл. Лунки А₁–Н₁ полистиролового планшета использовали в качестве контроля, внося в них все компоненты, кроме стандартов ST-энтеротоксина. Анализируемые образцы фекалий вносили по 0,1 мл в две

лунки планшета и инкубировали 30 минут при +37 °С, затем промывали карбонатным буферным раствором с *pH* 9,6.

Во все лунки планшета добавляли по 0,1 мл раствора, содержащего конъюгат мышинных антикроличьих антител с пероксидазой хрена. Планшеты инкубировали в течение 30 минут при +37 °С и промывали дважды раствором фосфатно-солевого буфера с *pH* 7,3, который содержал твин-20, и четыре раза – раствором того же буфера, но без твина.

В лунки вносили по 0,1 мл раствора, содержащего индикаторную субстратную смесь, и инкубировали в течение 15–20 минут при +20 °С. Визуально позитивные пробы окрашивались в желто-оранжевый цвет. Интенсивность окрашивания пропорциональна количеству ST-энтеротоксина в исследуемых образцах. Для остановки реакции использовали 0,1 мл раствора серной кислоты (2 моль/л), который добавляли во все лунки планшета.

Учет результатов проводили инструментально на регистрирующем спектрофотометре «Мультискан» при 492 нм. При этом определяли содержание энтеротоксинов в пробах, которое соответствовало конечному разведению стандарта токсина в лунках, где оптическая плотность пробы и стандарта в два раза превышала поглощение в контроле, но при значениях оптической плотности не менее чем 0,1. Концентрацию энтеротоксина в исследуемых образцах определяли по значению оптической плотности лунки, в которую вносился образец.

Калибровочную кривую зависимости оптической плотности от средней концентрации энтеротоксина (в двух лунках) строили в системе координат, где в выбранном масштабе по оси ординат откладывали полученные значения единиц оптической плотности (ЕОП), а по оси абсцисс – соответствующие значения концентрации энтеротоксина (рис. 2).

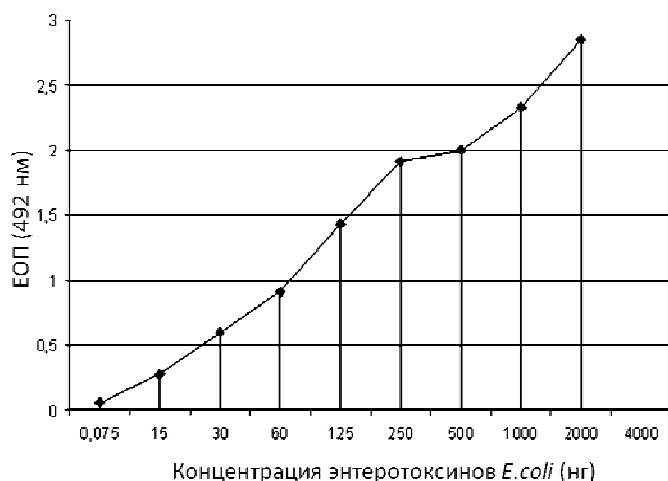


Рис. 2. Калибровочная кривая для определения концентрации энтеротоксинов *E. coli*

На разных стадиях заболевания колибактериозом в фекалиях телят обнаруживаются энтеротоксины *E. coli* (табл. 1). Специфичность ИФА тест-системы (способность определять только то вещество, для определения которого эта система разработана) подтверждена путем постановки ИФА с бесклеточным супернатантом *P. vulgaris* и стерильной средой культивирования токсигенных штаммов *E. coli* (табл. 2).

Таблица 1

Титр ST-энтеротоксина (нг/мл) в фекалиях новорожденных телят при сверхостром, остром и подостром течении колибактериоза, определяемый ИФА тест-системой

Исследуемый материал	Стадия заболевания	Титр ST, нг/мл
Фекалии	подострая	≥ 1000
	острая	≥ 500
	сверхострая	≥ 250

Таблица 2

Оптическая плотность (ЕОП) бесклеточного супернатанта *P.vulgaris* и стерильной среды культивирования токсигенных штаммов *E.coli* при 492 нм

Исследуемый материал	Результат реакции	ЕОП (492 нм), $X \pm s, n = 4$
Культуральный фильтрат <i>P. vulgaris</i>	–	$0,055 \pm 0,001$
Стерильная среда культивирования <i>E. coli</i>	–	$0,070 \pm 0,001$
Положительный контроль (ST – 125 нг)	+	$1,43 \pm 0,01$

Примечания: «–» – отрицательная реакция, «+» – положительная реакция.

Для штаммов *E. coli*, синтезирующих энтеротоксины, чувствительность разработанной тест-системы составила ~ 6 нг/мл.

Выводы

Разработана ИФА тест-система, с помощью которой идентифицирован термостабильный ST-энтеротоксин *Escherichia coli* в фекалиях телят, находящихся на разных стадиях заболевания колибактериозом. При определении стадии заболевания регистрируемые в ИФА титры энтеротоксинов *E. coli* можно считать диагностическими.

Индикация энтеротоксинов *E. coli* с помощью твердофазного ИФА является экономным и в то же время достаточно специфичным и чувствительным методом в рутинной диагностике колибактериоза. В связи с этим ИФА может применяться для получения окончательного результата определения токсигенности штаммов *E. coli* в течение рабочего дня. Преимуществом разработанного теста является отсутствие ложноположительных результатов, обусловленных межвидовой перекрестной реакцией ST и LT-энтеротоксинов, отсутствие инфицированного антигенного материала, химически точная структура антигена, а также пригодность для использования на автоматических системах для ИФА.

Библиографические ссылки

1. **Вергнев Ю. В.** Бактериальные токсины: биологическая сущность и происхождение // Журн. микробиол. – 1996. – № 3. – С. 43–46.
2. **Захаров П. Г.** Профилактика и лечение болезней новорожденных телят // Зооиндустрия. – 2001. – № 3. – С. 21–25.
3. **Иванов А. С.** Современные подходы к микробиологической диагностике и терапии инфекционных диарей // Болезни органов пищеварения. – 2004. – № 2. – С. 15–17.
4. **Имуноферментная** тест-система для определения термолабильного энтеротоксина эшерихий / А. П. Алексанкин, К. Ш. Матевосян, О. С. Белоновская, С. Н. Серебряков // Вопросы физико-химической биологии в ветеринарии. – М. : ФГОУ ВПО МГАВМиБ им К. И. Скрябина, 2004–2005. – С. 53–56.
5. **Кашин А. С.** Колибактериоз телят в современных экологических условиях Сибири (Особенности эпизоотологии, клин. проявления, патогенез, диагностика, меры профилактики и борьбы). Метод. рекомендации / А. С. Кашин, М. И. Заздравных, Н. А. Шкиль. – Барнаул: Азбука, 2003. – 79 с.

6. **Малов В. А.** Острые инфекционные диарейные заболевания / В. А. Малов, А. Н. Горобченко // Лечащий врач. – 2005. – № 2. – С. 6–8.
7. **Олійник Л. В.** Розповсюдження ешерихій та оцінка їх патогенного потенціалу // Ветеринарна медицина. – Х., 2004. – № 83. – С. 167–170.
8. **Сухарев Ю. С.** Визначення термостабільного (ST) ентеротоксину *E. coli* методом твердофазного імуноферментного аналізу // Актуальні проблеми молекулярної діагностики у ветеринарній медицині та біології. Наук.-практ. конф. з міжнар. участю (22–25 травня 2007 р., АР Крим, м. Феодосія) // Ветеринарна медицина. – Х., 2007. – Т. 88. – С. 251–255.
9. **Сухарев Ю. С.** Спосіб виготовлення гіперімунної антитоксичної сироватки крові до кон'югату термостабільного і термолабільного ентеротоксинів *E. coli*. Пат. 30128 Україна, АБ1К 39/108. Заявл. 06.11.2007; опубл. 11.02.2008. Бюл. № 3. – С. 3.
10. **Сухарев Ю. С.** Энтеротоксины *Escherichia coli* (методы получения, очистки, изготовление иммунизирующих препаратов, антитоксических сывороток и диагностических тест-систем на их основе). – Х. : Коллегиум, 2009. – 92 с.
11. **Шахов А. Г.** Этиология и профилактика желудочно-кишечных и респираторных болезней телят и поросят // Ветеринарный консультант. – 2003. – № 1. – С. 4–5.
12. **Шпонько Ю. Б.** Этиологические факторы, профилактика и терапия диарей телят и поросят в Краснодарском крае: Автореф. дисс. ... канд. вет. наук: 16.00.01, 16.00.03. – Воронеж, 2007. – С. 12–13.
13. **Prevalence** of toxin types and colonization factors in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated during a 2-year period from diarrheal patients in Bangladesh / F. Qadri, S. Kumar Das, A. S. G. Faruque et al. // J. Clin. Microbiol. – 2000. – Vol. 38, N 1. – P. 27–31.
14. **Thielman N. M.** Acute infectious diarrhea / N. M. Thielman, R. L. Guerrant // N. Engl. J. Med. – 2004. – Vol. 350 (1). – P. 38–47.

Надійшла до редколегії 17.01.2011

УДК 636.4:591.11:577.16

С. О. Шаповалов, М. М. Долгая

Інститут тваринництва УААН України

**ВІТАМІННЕ ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ ОРГАНІЗМУ ПОРОСЯТ
ЗА УМОВ УВЕДЕННЯ МІКРОЕЛЕМЕНТНОЇ КОМПОЗИЦІЇ
СУПОРОСНИМ СВИНОМАТКАМ ТА ПОРОСЯТАМ
У РАНЬОМУ ПОСТНАТАЛЬНОМУ ОНТОГЕНЕЗІ**

Оцінено вплив мікроелементної композиції «Біотам» на вміст вітамінів *A, E, C, B₂* у крові, печінці та м'язах поросят у ранньому постнатальному онтогенезі. Показано достовірне підвищення їх концентрації у дослідній групі тварин, які отримували препарат «Біотам».

С. О. Шаповалов, М. Н. Долгая

Інститут животноводства НААН України

**ВИТАМИННОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ОРГАНИЗМА ПОРОСЯТ
ПРИ ВВЕДЕНИИ МИКРОЭЛЕМЕНТНОЙ КОМПОЗИЦИИ
СУПОРОСНЫМ СВИНОМАТКАМ И ПОРОСЯТАМ
В РАННЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ**

Оценено влияние микроэлементной композиции «Биотам» на содержание витаминов *A, E, C, B₂* в крови, печени и мышцах поросят в раннем постнатальном онтогенезе. Показано достоверное повышение их концентрации в опытной группе животных при использовании препарата «Биотам».

S. O. Shapovalov, M. N. Dolgaya

Institute of Animal Husbandry NAAS of Ukraine

**VITAMINS SUPPLY OF PIGLETS UNDER INTRODUCTION OF
MICROELEMENTS COMPOSITION INTO SOWS AND PIGLETS IN
EARLY POSTNATAL ONTOGENESIS**

Data on the influence of «Biotam» microelements composition on the level of vitamins *A, E, B₂* in blood, liver and muscles of piglets in early postnatal ontogenesis are presented. Significant increase of its concentrations in the animals of the experimental group is shown.

Вступ

Найважливіші умови стабілізації виробництва тваринницької продукції, поліпшення її біологічної цінності та якості – максимальне збереження новонародженого молодняку та забезпечення високої життєздатності тварин. На сучасному етапі розвитку технологій у тваринництві відбувається активне впровадження нових лікарських засобів, які відповідають високим фармакологічним вимогам [3; 5; 8]. До такої універсальної субстанції належить мікроелементний комплекс «Біотам» – композиція поліденерних комплексів есенційних мікроелементів. Природа і мольне співвідношення

мікроелементів, які входять до композиції, відповідають їх складу у металумісних ферментах. Поєднання цих комплексів максимальне за своєю спрямованістю і може сприяти стимуляції та стабілізації обмінних процесів у організмі в цілому. Окреме важливе завдання – максимальне збереження депо жиророзчинних вітамінів у печінці поросят, які надійшли від свиноматки на етапі ембріогенезу, до повної нормалізації вітамінно-обмінних процесів [2; 4; 6].

Показано, що у промислових умовах поросята на ранньому етапі розвитку не можуть отримати фізіологічно необхідну дозу жиророзчинних вітамінів навіть із використанням ряду вітамінісних препаратів [7]. Існують суперечливі погляди щодо можливостей організму поросят у ранньому онтогенезі трансформувати отримані вітаміни [5; 6]. Є також дані, що в організмі підсисних поросят трансформація та перетворення вітамінів із провітамінів майже не відбувається. Тому вітамінна забезпеченість новонародженого молодняку можлива, перш за все, завдяки використанню молозива [1; 2; 7]. За даними інших дослідників, інтенсивність трансформації вітамінів в організмі поросят до 40-добового віку дуже повільна [2].

Специфічний критерій забезпеченості організму вітамінами *A*, *E*, *C* – визначення їх вмісту у плазмі крові та печінці. Інші автори наполягають на дослідженні вітамінів саме у печінці, оскільки вона здатна депонувати вітаміни *A* та *E* і визначення їх саме у цьому органі може бути додатковим критерієм забезпеченості організму цими вітамінами [1, 2].

З огляду на вищевикладене завдання наших досліджень – визначити можливість регуляції та накопичення цих вітамінів завдяки уведенню композиції поліядерних комплексів есенційних мікроелементів поросят у ранньому постнатальному онтогенезі.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проведене у ДГ «Гонтарівка» Вовчанського району Харківської області на 12 супоросних свиноматках, поділених на дві групи (дослідну та контрольну) за принципом пар-аналогів по шість тварин у кожній. Біохімічні дослідження крові проводили на базі Випробувального центру Екологічного моніторингу та дослідження якості продукції тваринного походження Інституту тваринництва УААН. Свиноматкам дослідної групи за три тижні до опоросу давали мікроелементну композицію «Біотам» у дозі 20 мг/кг маси тіла щоденно до опоросу, тварини перебували на стандартному раціоні для цієї фізіологічної групи. Після опоросу з групи, що отримувала «Біотам», сформовано дві групи поросят за принципом пар-аналогів, та за цим же принципом – групу контрольних тварин. Таким чином сформовано три групи поросят. На 7 та 14-ту добу проводили забір крові у поросят безпосередньо із серця. На 35-ту добу тварин було забито. У крові на 7, 14 та 35-ту добу та на 35 добу у печінці визначали концентрацію вітамінів *A*, *E* та *C*.

Визначення вітаміну *A* та каротиноїдів проводили за методом П. Ф. Сурая та І. А. Іонова. Визначення вітаміну *E* проводили за методом Еммері – Енгеля у модифікації П. Ф. Сурая. Визначення вітаміну *C* проводили за модифікованим методом В. А. Девятніна. Вміст аскорбінової кислоти (АК) визначають за різницею між сумою АК + ДАК і ДАК [1]. Препарат «Біотам», який вводили свиноматкам у вигляді сухої форми, містить композицію мікроелементів, у якій містяться індивідуальні комплекси металів Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} з *N*-2,3-диметилфенілантраніловою (мефенаміновою) кислотою. Вміст мікроелементів у 1 грамі: Zn^{2+} – 17 мг, Cu^{2+} – 3,7 мг, Co^{2+} – 0,35 мг, Cr^{3+} – 0,3 мг, Fe^{3+} – 14,5 мг, Mn^{2+} – 4 мг, *N*-2,3-диметилфенілантранілової кислоти – 412 мг, глюконат кальцію – 180 мг, і крохмаль, цукор, аеросил до 1 г. Препарат

«Біотам», який вводили поросяткам першої групи у вигляді гелю, містив мікроелементів у 50 см^3 : Zn^{2+} – 17 мг, Cu^{2+} – 3,7 мг, Co^{2+} – 0,35 мг, Cr^{3+} – 0,3 мг, Fe^{3+} – 14,5 мг, Mn^{2+} – 4 мг, *N*-2,3-диметилфенілантранілової кислоти – 412 мг. Таким чином дослідній групі поросят додатково уведено протягом експерименту 7 см^3 препарату на голову (табл. 1).

Таблиця 1

Схема дослідження

Групи	Тварини	Групи	Тварини	Доза препарату
Дослід	Супоросні свиноматки за 3 тижні до опоросу, ОР + 20 мг/кг/добу препарату	1	поросята ($n = 6$)	3 2 по 8-му добу, щодня $1 \text{ см}^3/\text{гол./добу per os}$ у вигляді гелю
		2	поросята ($n = 6$)	–
Контроль	Супоросні свиноматки за 3 тижні до опоросу, ОР	К	поросята ($n = 15$)	–

Результати досліджень

У дослідних групах спостерігається достовірне підвищення концентрації вітаміну *A* у сироватці порівняно з контролем в другій групі на 14-ту та 35-ту добу на 7,8 та 18,8 % відповідно (табл. 2). У той же час відмічене збільшення вмісту ретинолу в контрольній групі з 7-ї до 35-ї доби на $0,22 \text{ мкг}/\text{см}^3$, а у другій дослідній групі – на $0,36 \text{ мкг}/\text{см}^3$. Рівень вітаміну *E* у сироватці крові поросят другої дослідної групи достовірно вищий за контроль на 14-у добу в 1,2, а на 35-у добу в 1,5 раза. У другій дослідній групі спостерігається тенденція до підвищення концентрації α -токоферолу в сироватці крові. При дослідженні зразків сироватки крові встановлено, що концентрація аскорбінової кислоти у поросят контрольної та дослідної групи не відрізняється вірогідно, крім другої дослідної групи, на 35-ту добу, де ця різниця вища на 10 % відносно контролю ($p < 0,05$). У цілому спостерігається підвищення концентрації вітаміну *C* з 7-ї по 35-ту добу як у дослідних, так і контрольній групах на 27–35 %.

Таблиця 2

Вміст вітамінів *A*, *E*, *C* ($\text{мкг}/\text{см}^3$) у плазмі крові поросят

Термін відбору проби	Групи тварин		
	контроль	дослід 1	дослід 2
вітамін <i>E</i>			
7-ма доба	$1,56 \pm 0,19$	$1,60 \pm 0,07$	$1,81 \pm 0,11$
14-та доба	$2,53 \pm 0,03$	$2,69 \pm 0,08$	$3,05 \pm 0,04^*$
35-та доба	$3,32 \pm 0,17$	$3,85 \pm 0,09$	$4,91 \pm 0,12^{**}$
вітамін <i>A</i>			
7-ма доба	$0,89 \pm 0,03$	$1,03 \pm 0,04$	$1,01 \pm 0,04$
14-та доба	$1,05 \pm 0,02$	$1,10 \pm 0,07$	$1,14 \pm 0,03^{**}$
35-та доба	$1,11 \pm 0,08$	$1,12 \pm 0,07$	$1,37 \pm 0,04^{***}$
вітамін <i>C</i>			
7-ма доба	$1,21 \pm 0,09$	$1,19 \pm 0,07$	$1,28 \pm 0,08$
14-та доба	$1,45 \pm 0,04$	$1,32 \pm 0,16$	$1,44 \pm 0,03$
35-та доба	$1,77 \pm 0,05$	$1,65 \pm 0,07$	$1,98 \pm 0,01^*$

Примітки: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ порівняно з контролем.

Дослідження функціонального стану біохімічних реакцій у клітинах печінки – досить інформативне у зв'язку з роллю печінки в обміні речовин. У результаті проведених досліджень (табл. 3) встановлено, що в печінці дослідної групи поросят 35-добового віку збільшився рівень усіх досліджених вітамінів. Концентрація вітаміну *A* достовірно збільшилась у другій дослідній групі на 17 %, вітаміну *E* – на 32 %, кароти-

ноїдів – на 38 %, вітаміну B_2 – на 2 %. Що стосується рівня вітаміну C , то було показано, в дослідній групі 1 він був вищим на 6,9 %, а в дослідній групі 2 – на 10,1 %. Проте рівень відновленої форми аскорбінової кислоти був також на 6 % вищим у дослідній групі 1, а в дослідній групі 2 він був вищим на 13,0 %. Слід зазначити, що у дослідній групі 2 рівень дегідроаскорбінової кислоти був меншим на 3,0 %. Таким чином, у дослідній групі 2 у печінці переважає відновлена форма вітаміну C .

Таблиця 3

Вміст вітамінів A , E , B_2 і каротиноїдів у печінці поросят

Група	Контрольна	Дослідна 1	Дослідна 2
Вітамін A , мкг/г	33,2 ± 0,3	34,3 ± 1,4	40,4 ± 1,1*
Вітамін E , мкг/г	29,8 ± 2,2	31,2 ± 1,4	44,2 ± 2,5*
Каротиноїди, мкг/г	0,16 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,26 ± 0,02**
Вітамін B_2 , мкг/г	0,139 ± 0,002	0,135 ± 0,004	0,142 ± 0,001
Вітамін C (АК + ДАК), мкг/г	202,3 ± 14,2	217,3 ± 1,2	225,1 ± 3,3**
Аскорбінова кислота (АК), мкг/г	165,4 ± 11,1	176,2 ± 10,1	190,4 ± 14,3
Дегідроаскорбінова кислота (ДАК), мкг/г	36,9 ± 0,1	41,0 ± 2,1	34,7 ± 0,2
Вітамін A , мг/орган	6,1 ± 1,1	6,7 ± 1,1	8,7 ± 1,1*
Вітамін E , мг/орган	5,5 ± 1,5	6,1 ± 1,1	9,5 ± 2,1**
Каротиноїди, мкг/орган	29,6 ± 11,3	34,9 ± 12,4	55,9 ± 5,7**
Вітамін B_2 , мкг/орган	25,5 ± 1,1	26,1 ± 1,1	30,4 ± 2,4*
Вітамін C (АК + ДАК), мг/орган	37,4 ± 2,2	42,2 ± 2,5	48,4 ± 2,4**
Аскорбінова кислота, мг/орган	30,6 ± 1,3	34,2 ± 2,5	40,9 ± 4,6*
Дегідроаскорбінова кислота, мг/орган	6,8 ± 0,3	7,9 ± 0,9	7,5 ± 0,7*

Примітки: див. табл. 2.

За умов порівняння концентрації вітамінів у цілому органі показано, що в дослідних групах 1 та 2 вміст вітаміну A вищий на 7,6 та 29,0 % відповідно, вміст вітаміну E – на 9,1 та 41,9 %, каротиноїдів – на 15,2 та 47,0 %, вітаміну B_2 – на 2,1 та 16,0 %, вітаміну C – на 11,2 та 22,6 %, аскорбінової кислоти – на 10,5 та 25,3 %, дегідроаскорбінової кислоти – вищий на 14,3 та 8,6 % відповідно.

При застосуванні мікроелементної композиції на 35-ту добу дослідження встановлено (табл. 4) достовірний ($p < 0,05$) підвищений рівень вмісту вітаміну A у м'язах у дослідній групі 1 на 46,0 %, у дослідній групі 2 – на 53,0 %, вищу концентрацію вітаміну E (на 18,0 %, $p < 0,01$) у дослідній групі 2.

Таблиця 4

Вміст вітамінів A та E (мкг/г) у м'язовій тканині поросят,

Група	Контрольна	Дослідна 1	Дослідна 2
Вітамін A	1,29 ± 0,07	2,39 ± 0,12*	2,77 ± 0,17**
Вітамін E	1,44 ± 0,10	1,49 ± 0,12	1,77 ± 0,12**

Примітки: див. табл. 2.

При розгляді принципової схеми рециклізації антиоксидантів, запропонованої L. Rasker [10], можна припустити, що введення композиції мікроелементів запобігає втраті вітамінів у процесі їх рециклізації за рахунок активізації ферментативної ланки антиоксидантної системи: глутатіонзалежним ферментам (СОД та каталазі), оскільки іони металів, що містяться у досліджуваній композиції, входять до складу цих ферментних систем, виконуючи в активних центрах оксидоредуктаз каталітичну роль, і безпосередньо беруть участь у здійсненні більшості окисно-відновних реакцій, стримуючи розвиток вільнорадикального окиснення.

Висновки

Уведений комплекс мікроелементів виявляє позитивний вплив на накопичення вітамінів *A* та *E*, каротиноїдів у печінці та м'язах поросят, що створює необхідний запас для ефективного отримання метаболічних енергосубстратів і підвищення антиоксидантного захисту та резистентності організму поросят у ранньому постнатальному онтогенезі.

Бібліографічні посилання

1. **Витамины** в питании животных. Метаболизм и потребность / А. Р. Вальдман, П. Ф. Сурай, И. А. Ионов, Н. И. Сахацкий. – Харьков : Оригинал, 1993. – 423 с.
2. **Витамины** в кормлении сельскохозяйственных животных / О. Е. Привало, С. М. Паенок, С. М. Гусак и др. – К. : Урожай, 1983. – 160 с.
3. **Горбачев В. В.** Витамины, микро- и макроэлементы / В. В. Горбачев, В. Н. Горбачев. – Минск : Интерпречсервис, 2002. – 300 с.
4. **Двинская Л. М.** Физиолого-биохимические основы витаминного питания сельскохозяйственных животных // Научные основы витаминного питания сельскохозяйственных животных. Тез. докл. II Всесоюзн. симпоз. – Рига, 1987. – С. 78–80.
5. **Калетина Н. И.** Биоконплексы микроэлементов – регуляторы металло-лигандного гомеостаза / Н. И. Калетина, Е. В. Арзамасцев // Микроэлементы в медицине. – 2002. – № 3 (1). – С. 8–14.
6. **Крюков В. С.** Нормирование жирорастворимых витаминов / В. С. Крюков, П. Ф. Сурай, И. А. Ионов // Птицеводство. – 1991. – № 9. – С. 11–17.
7. **Куртяк Б. М.** Жиророзчинні вітаміни у ветеринарній медицині і тваринництві / Б. М. Куртяк, В. Г. Янович. – Львів, 2004. – 425 с.
8. **Оберлис Д.** Новый подход к проблеме дефицита микроэлементов // Микроэлементы в медицине. – 2002. – № 3 (1). – С. 2–7.
9. **Сурай П. Ф.** Биохимические методы контроля метаболизма в органах и тканях птиц и их витаминной обеспеченности (методические рекомендации) / П. Ф. Сурай, И. А. Ионов. – Харьков, 1990. – 138 с.
10. **Packer L.** Interactions among antioxidants in health and disease: Vitamin *E* and its redox cycle // Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. – 1992. – Vol. 20. – P. 271–276.

Надійшла до редколегії 14.12.2010

УДК 612.83+612.8.681.5

О. О. Шугуров

Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара

ВИКЛИКАНІ ПОТЕНЦІАЛИ СПИННОГО МОЗКУ ЗА ДІЇ НА НЬОГО МЕХАНІЧНИХ ПОДРАЗНЕНЬ

Досліджено зміни викликаних потенціалів дорсальної поверхні (ПДП) кішки за механічних впливів на поверхню спинного мозку (СМ) з енергією від $1 \cdot 10^{-3}$ до $4 \cdot 10^{-3}$ Дж. Реєстрацію ПДП проводили в попереково-крижовому потовщенні в місці знаходження максимуму першого негативного (N_1) компонента. Точку стимуляції мозку переміщували уздовж СМ від L_2 до L_6 сегмента. Підвищення сили стимулу веде до зростання як амплітуди, так і тривалості ПДП. Аналогічна тенденція знайдена для випадку зміни сили механічного стимулу при постійній відстані (1 см) від місця стимулу до точки реєстрації. Механічні впливи на мозок спричинюють десинхронізацію викликаної активності моно- та полісинаптичних нейронів СМ.

О. О. Шугуров

Днепрпетровский национальный университет им. Олеся Гончара

ВЫЗВАННЫЕ ПОТЕНЦИАЛЫ СПИННОГО МОЗГА ПРИ ДЕЙСТВИИ НА НЕГО МЕХАНИЧЕСКИХ СТИМУЛОВ

Исследованы изменения вызванных потенциалов дорсальной поверхности (ПДП) кошки при механических влияниях на поверхность спинного мозга (СМ) с энергией от $1 \cdot 10^{-3}$ до $4 \cdot 10^{-3}$ Дж. Регистрацию ПДП проводили в пояснично-крестцовом утолщении в месте максимума его первого негативного (N_1) компонента. Точку стимуляции мозга перемещали вдоль СМ от L_2 до L_6 сегментов. Увеличение силы стимула приводит к повышению как амплитуды, так и длительности ПДП. Аналогичная тенденция обнаружена для случая изменения силы механического стимула на постоянном удалении (1 см) от точки стимуляции до точки регистрации. Механические влияния на мозг ведут к десинхронизации вызванной активности моно- и полисинаптических нейронов СМ.

О. О. Shugurov

Oles' Honchar Dnipropetrovsk National University

THE EVOKED POTENTIALS OF SPINAL CORD UNDER INFLUENCE OF MECHANICAL STIMULI

The electrical evoked potentials (EP) of spinal cord (SC) in reply to the mechanical activation were investigated. The energy of stroke varied from $1 \cdot 10^{-3}$ up to $4 \cdot 10^{-3}$ J. The registration of EP is realized in a L_5 segment of SC, the point of stimulation was sequentially moved upwards along the SC. We have shown, that the augmentation of stimulus force produced the increase of amplitude of a potential and its duration. After excluding a place of stimulation from a place of registration the potential was decreased proportional to the square of the distance. We concluded that the mechanical percussions of the SC resulted in the development of long-term oscillating activity of neurones of SC.

Вступ

Травми спинного мозку (СМ) спричинюють ряд змін ефективності роботи нейронних ланцюгів, що можна оцінити завдяки аналізу електричної активності нейрональних структур і м'язових актів. Такі дослідження проводять в умовах експериментального

спинального ушкодження на щурах [3], собаках [5] та екстраполують результати на людей у клініці [9; 11]. Велику кількість струсів СМ відзначено у спортсменів [6]. Деякі дослідження, здійснювані на людині, завдяки оцінці рівня викликаних потенціалів дають можливість точно визначати ряд патологій нервової системи, таких, наприклад, як ушкодження шийних корінців, дегенерація нервових провідників тощо [7; 8].

Травматичні та хронічні ушкодження спинного мозку (СМ) в наш час мають дуже масовий характер як у дорослих, так і дітей [4]. Для підвищення різних методів реабілітації функцій СМ треба якомога швидше оцінити напрями лікування в кожному конкретному випадку. Це неможливо без глибокого знання того, де вражено мозок, як сильно, які нейронні структури порушено. У наших попередніх дослідках вказано, що механічна стимуляція СМ веде до зростання амплітуди його потенціалів дорсальної поверхні (ПДП) [2]. Але причини такого зростання та залежність її від точки механічного впливу на мозок не досліджувалися.

Мета дослідження – оцінити зміни функціонального стану СМ за механічних впливів шляхом аналізу його викликаних потенціалів.

Матеріал і методи досліджень

Досліди проведено на 15 спинальних і спинальних наркотизованих дорослих кішках масою 2,5–3 кг. Як наркоз використовували тіопентал натрію (40 мг/кг маси, внутрішньочеревинно). Проводили ламінектомію хребта на рівні $L_1 - S_2$ сегментів. Попередньо знаходили точку на мозку, у якій перший негативний (N_1) компонент ПДП, який реєстрували за стандартною методикою [2], був максимальним. Механічну стимуляцію проводили з використанням електронного реле, до якоря якого приєднували тонкий металевий важіль. При подачі на реле відповідної напруги якір притягувався до сердечника котушки та зміщував важіль, який робив механічну стимуляцію дорсальної поверхні СМ. За величиною напруги, яка подавалася на реле, обраховували енергію на вироблення стимулу. Після проведення дослідів проводили безбольову евтаназію тварин шляхом передозування барбітуратів.

ПДП реєстрували за допомогою інтерфейсної системи КАМАК при використанні прогресивної методики накопичення та усереднення сигналів, обробку даних проводили з використанням модуля ANOVA програми Statistica 6.0.

Результати та їх обговорення

Негативну реакцію на регуляторні механізми СМ можуть робити механічні травми, удари, струси, компресії [6–8]. Навіть слабкі удари по мозку, що не викликали видимих змін у тканинах (наприклад, набряків, гематом), здатні створювати неадекватні реакції або зриви стандартних процесів керування. Слабкі механічні удари в районі дорсальних стовпів СМ на рівні L_3 -сегмента зумовлюють виникнення негативної хвилі на поверхні мозку на рівні попереково-крижового потовщення (6 на рис. 1а). Параметри такої негативності відповідають за часовими характеристиками сумі перших двох негативних компонентів ПДП, викликаного електричною стимуляцією дорсальних стовпів.

При наближенні місця удару (при незмінній силі стимулу) до точки «максимуму амплітуди» ПДП у попереково-крижовому потовщенні (точки реєстрації) відзначається збільшення не тільки амплітуди ПДП, а і його тривалості, також суттєво змінюється загальна форма відповіді (0–6 на рис. 1а). При цьому можна побачити, що час, необхідний для активації нейронів у зоні максимуму та виникнення ПДП, зменшується з

20–22 до 10–12 мс, що можна бачити навіть за зміною латентного періоду відповідних компонентів (початок потенціалу показано стрілками).

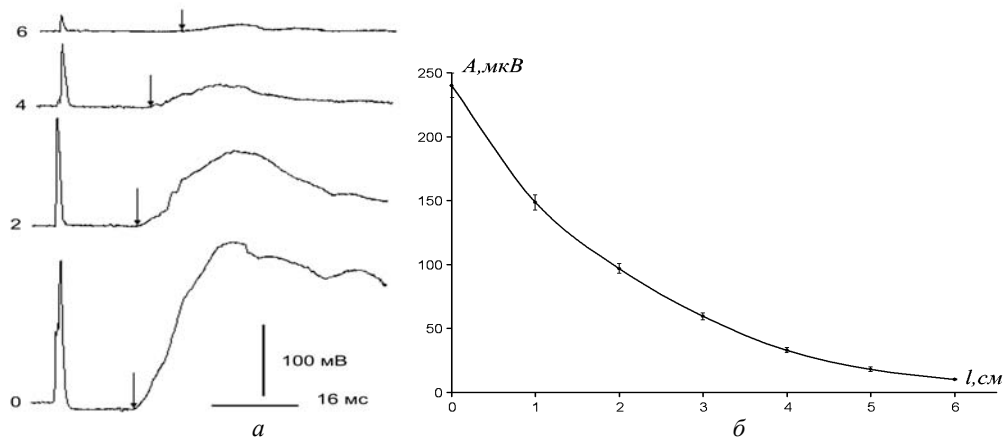


Рис. 1. Зміна ПДП при механічній стимуляції СМ:

a – сигнали, зареєстровані при наближенні місця нанесення механічного стимулу до точки реєстрації ПДП (L_5 сегмент); цифри – відстань між точками стимуляції (см); стрілками позначено закінчення латентних періодів відповідей; наведено типові дані одного з 14 дослідів;

б – графік зміни амплітуди (A) ПДП (мкВ) при віддаленні точки стимуляції (l) у краніальному напрямку (см); наведено середньоквадратичні відхилення при $p < 0,05$ за даними 14 дослідів

Графік зміни амплітуди ПДП залежно від відстані від точки механічної стимуляції мозку до точки реєстрації у межах 6 см мозку у краніальному напрямку показує, що спад величини відповіді має нелінійний характер (рис. 1б). По мірі віддалення точки стимуляції та зменшення сили коливання мозку ослаблення механічного впливу йде по ступеневій функції: збільшення відстані удвічі зумовлює послаблення ефекту навіть більше ніж учетверо. У даному випадку це свідчить про неелектричний характер збудження нейронів СМ, а саме – про механічний.

Якщо проводити механічну стимуляцію мозкових структур у одній точці, але змінювати силу стимулу, то при невеликій силі механічної активації мозку ($1 \cdot 10^{-3}$ Дж) неподалік від місця розташування таких нейронів (l на рис. 2) нейрони СМ відповідають досить синхронно. Це проявляється як невеликою загальною тривалістю відповіді, так і наявністю одного максимуму з малим часом фронту сигналу (7–10 мс) та відносно великим його зрізом (спадом сигналу) (30–40 мс).

Збільшення сили стимулу вдвічі (2, рис. 2) веде у першу чергу до істотного збільшення тривалості відповіді (на 15–20 мс) при постійному латентному періоді (оскільки місце стимуляції незмінне). Також суттєво (в 1,3–1,5 раза) зростає максимальна амплітуда ПДП. Подальше посилення механічного впливу на СМ (3, рис. 2) веде до розвитку відповіді з несинхронізованими розрядами на фоні тривалої негативності (100–150 мс), пов'язаної з часовим ростом електротонічної суми моно- та полісинаптичних нейронів, які утворили потенціал ЗПСП. Такі швидкі розряди на фоні загальної негативності тривають 15–25 мс. Далі вони змінюються повільнішими коливаннями активності. В останній період розвитку потенціалу (через 40–50 мс після максимальної активності), зменшення сигналу йде досить рівномірно та без помітних його коливань на зрізі. Одночасно визначено, що при вказаній стимуляції не виявлено стандартної позитивної хвилі ПДП, яка завжди присутня у нормі при електричній активації периферичних нервів.

Струс мозку добре вивчено клінічно та експериментально, але для спинного мозку такий ефект все ще погано зрозумілий [6; 8]. Одна з ознак ушкоджень типу «струсу» – швидкий і повний неврологічний дефіцит нейрональної активності. З іншого боку, закінчення повного відновлення мозкової діяльності відбувається у межах 72 годин після струсу.

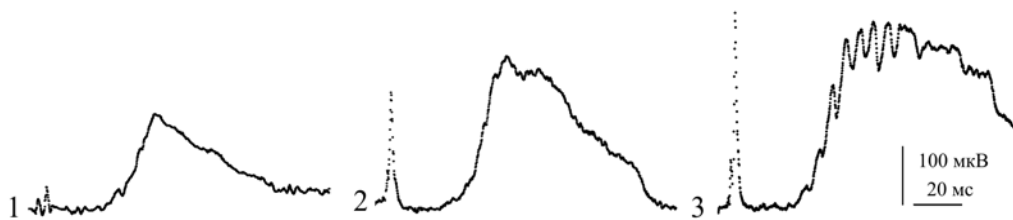


Рис. 2. Зміни ПДП СМ у L_5 сегменті при зростанні енергії механічного подразнення, прикладеного до дорсальної поверхні мозку:

1 – $1 \cdot 10^{-3}$ Дж, 2 – $2 \cdot 10^{-3}$ Дж, 3 – $4 \cdot 10^{-3}$ Дж; наведено типові дані одного з 12 дослідів

На відміну від електричної стимуляції периферичного нерва або дорсального корінця, при механічному впливові на мозок вхідні аферентні волокна активуватися не будуть (якщо впливи не стосуються безпосередньо таких волокон). Тому вказана стимуляція може викликати ЗПСП нейронів СМ тільки двома шляхами: або за рахунок розвитку антидромних розрядів у дорсальних стовпах, або шляхом механічного впливу безпосередньо на нейрональні структури. Отже зазначене збільшення тривалості негативної частини ПДП та утворення коливальності на передньому фронті потенціалу може здійснюватися за рахунок або реверберації механічного важеля-активатора, або виникнення повторної активації моно- та полісинаптичних нейрональних систем. Перший фактор менш імовірний, оскільки важіль після першого удару притискується до тканин мозку і тим самим демпфується, що не дозволяє здійснювати повторні удари. Час досягнення розрядів при стимуляції дорсальних стовпів точки генерації ПДП [1], значно менший від знайдених латентних періодів у наших дослідях (15–20 мс).

Зміщення точки механічної активації мозку на деяку відстань (до 6 см) при швидкостях розповсюдження потенціалів дії у стовпах 60–80 м/с не може давати підвищення латентного періоду у 4–5 мс. При постійній силі стимуляції зрушення точки стимуляції у краніальному напрямку веде до зменшення амплітуди ПДП, причому таке зменшення нелінійне, а скоріше відповідає ступеневій функції, що не може бути пов'язано з електричним способом активації нейронів. Таким чином, можна вважати, що наведені зміни амплітуди та тривалості потенціалів пов'язані саме з механічними ефектами збудження нейронів СМ.

Наші дані свідчать, що за будь-якої сили механічного подразнення у ПДП практично повністю відсутня позитивна (P) хвиля, яка у нормі завжди пов'язана з розвитком деполяризації первинних аферентів за дії механізму пресинаптичного гальмування на вході мозку. Причиною цього факту може бути те, що нейрони желатинозної субстанції, які забезпечують синхронізовану деполяризацію аферентів, є малими нейронами діаметром до 5 мкм, та, крім того, вони включені до щільної тканини нейронального ретикулуму II та III шарів СМ [10]. Тому механічне коливання мозку не викликає їх спонтанної активності. У той же час показано для середніх та відносно великих клітин СМ (негативна частина ПДП), що в міру підвищення сили струсу спостерігається розвиток тривалої безсистемної активності за принципом осциляцій (3 на рис. 2). Така «патологічна» активність, з одного боку, може не давати розрядів у головних сенсо-

моторних шляхах, з іншого – приводити до тривалого гальмування сигналів у нейрональних рефлекторних ланцюгах, яке утворюється за рахунок синаптичної депресії при повторній активації синапсів.

Висновки

Механічна стимуляція спинного мозку приводить до утворення тривалої несинхронізованої активності моно- та полісинаптичних нейронів спинного мозку, але маленькі нейрони желатинозної субстанції не виявляють такої. Електричні відповіді спинальних нейронів при механічному впливі на мозок за часовою течією істотно відрізняються від стандартної реакції на розряди, які прийшли до мозку аферентними шляхами. При стимулюванні з силою, що не травмує мозок, зменшення амплітуди викликаних потенціалів приблизно пропорційне квадрату відстані від місця генерації потенціалу до точки механічної стимуляції.

Бібліографічні посилання

1. **Лебеденко В. Е.** К вопросу регуляции активности нейрональных механизмов шейного утолщения спинного мозга восходящими афферентными потоками / В. Е. Лебеденко, М. П. Моцный // Биол. и техн. системы упр. – Д. : ДГУ, 1984. – С. 3–5.
2. **Шугуров О. А.** Вызванные потенциалы спинного мозга / О. А. Шугуров, О. О. Шугуров. – Д. : Наука і освіта, 2006. – 319 с.
3. **Bianchi E.** Lo studio delle radici dei nervi mediante valutazione delle onde del cord dorsum potential e del riflesso H / E. Bianchi, D. Callegari, M. Dondi // Ann. Fac. Medic. Vet. di Parma. – 2003. – Vol. 23, N 1. – P. 79–86.
4. **Kokoska E. R.** Characteristics of pediatric cervical spine injuries / E. R. Kokoska, M. S. Keller, M. C. Rallo // J. Pediatr. Surg. – 2001. – Vol. 36, N 1. – P. 100–105.
5. **LeCouteur R. A.** Electrophysiological studies of experimental spinal cord injury in dogs / R. A. LeCouteur, T. A. Holliday // Proc. Am. Col. Vet. Int. Med. – 1984. – P. 170–177.
6. **Pearce J. M.** Observations on concussion. A review // European Neurology. – 2007. – Vol. 59, N 3–4. – P. 113–119.
7. **Schmit B. D.** Absence of local sign withdrawal in chronic human spinal cord injury // J. Neurophysiol. – 2003. – Vol. 90, N 6. – P. 3232–3241.
8. **Shimoji K.** Evoked spinal cord potentials: An illustrated guide to physiology, pharmacology and recording techniques / K. Shimoji, W. D. Willis. – N–Y. : Springer, 2006. – 198 p.
9. **Stepping-like** movements in humans with complete spinal cord injury induced by epidural stimulation of the lumbar cord: Electromyographic study of compound muscle action potentials / K. Minassian, B. Gilge, F. Rattay, M.M. Pinter // Spinal Cord. – 2004. – Vol. 42, N 7. – P. 401–416.
10. **Substantia gelatinosa** neurons in the medullary dorsal horn: An intracellular labeling study in the rat / Y.-Q. Li, H. Li, T. Kaneko, N. Mizuno // J. Comp. Neurol. – 1999. – Vol. 411, N 3. – P. 399–412.
11. **Wu M.** Spastic reflexes triggered by ankle load release in human spinal cord injury / M. Wu, B. D. Schmit // J. Neurophysiol. – 2006. – Vol. 96, N 12. – P. 2941–2950.

Надійшла до редакції 17.04.2011

ЗМІСТ

Барбухо О. В., Жиденко А. О. Підвищення життєздатності личинок коропа в умовах дії гербіциду раундап пробіотичним препаратом БПС-44	3
Бекташева О. Р., Лаврентьєва К. В., Черевач Н. В., Вінніков А. І., Москаленко А. А. Біологічні властивості бактерій родини Enterobacteriaceae – збудників гнійно-запальних захворювань у дітей	12
Воронкова Ю. С., Штеменко Н. І. Вплив кластерних сполук ренію з органічними лігандами на активність глюкозооксидази	18
Гуцько С. О. Кадмій у ґрунтах м. Дніпродзержинськ	24
Гюльяхмедов С. Г., Гусейнова Н. Ф., Абдуллаєва Н. А., Кулиєв А. А. Влияние лецитина и казеина на спектр антимикробной активности бактериоцинов молочнокислых бактерий, изолированных из азербайджанских сыров	31
Деркач К. В., Крупська Г. С., Абраїмова О. Є., Сатарова Т. М. Вплив складу живильного середовища на розвиток та проростання незрілих зародків кукурудзи в культурі <i>in vitro</i>	35
Доценко О. І. Особливості реагування антиоксидантної системи нирок мишей на дію низькочастотної вібрації	40
Дроздов А. Л., Демченко Е. М., Эйяд А., Неруш О. П. Влияние психотропных лекарственных средств на спонтанную поведенческую активность белых крыс	47
Єрошкіна Т. В., Борисенко С. С., Даниленко Г. В., Положай Н. Г. Роль комісії підприємств з атестації робочих місць у професійній реабілітації осіб з обмеженими можливостями	54
Кононова Г. С., Антоноук С. В., Штеменко Н. І. Вплив реній-платинової системи у вигляді наноліпосом на проліферативну активність ракових клітин	59
Кучменко О. Б., Петухов Д. М., Євстратова І. Н., Мхітарян Л. С., Донченко Г. В. Ефект попередників і модуляторів біосинтезу убихінону на вміст і функціонування убихінону та оксидативний статус у серці при введенні адреналіну	68
Новицький Р. О., Христов О. О., Кочет В. М. Іхтіопатологічні наслідки ураження прісноводних риб електрострумом	75
Максим'юк Г. В., Воробець З. Д. Деякі аспекти взаємозв'язку концентрації сперматозоїдів в еякулятах із концентрацією Ca^{2+} , K^+ та Na^+ у тканинах статевих органів і спермі	81
Мельнікова О. З., Ляшенко В. П., Чаус Т. Г., Бурцева Д. О., Калюжна Л. В. Зміни сумарної фонові електричної активності гіпокампа та поведінкових реакцій щурів при тривалому стресі	88
Нестерук К. М., Соколова І. Є., Братусь О. В. Розповсюдженість карбапенемрезистентних штамів <i>Pseudomonas aeruginosa</i> – продуцентів метало- β -лактамаз	95
Нікуліна Ю. Ю., Лаврентьєва К. В., Черевач Н. В., Сірокваша О. А., Вінніков А. І. Біологічні властивості бактерій роду <i>Staphylococcus</i> , виділених від пацієнтів Дніпропетровської клінічної лікарні ім. І. І. Мечникова	101
Русев І. Т. Вплив антропогенної трансформації території Дунай-Дністровського межиріччя на природну вогнищевість туляремії	107
Сухарев Ю. С. Идентификация термостабильного энтеротоксина <i>Escherichia coli</i> при колибактериозе телят	114
Шапавалов С. О., Долгая М. М. Вітамінне забезпечення організму поросят за умов уведення мікроелементної композиції супоросним свиноматкам та поросят у ранньому постнатальному онтогенезі	120
Шугуров О. О. Викликані потенціали спинного мозку за дії на нього механічних подразнень	125
ЗМІСТ	130

**ВІСНИК ДНІПРОПЕТРОВСЬКОГО
УНІВЕРСИТЕТУ**

Біологія. Медицина

Заснований у 1993 р.

Випуск 2, том 1

Українською, російською та англійською мовами

Свідоцтво державної реєстрації серія КВ № 7898 від 17.09.2003 р.

Редактор В. Д. Маловик
Технічний редактор В. А. Усенко
Коректор В. Д. Маловик
Оригінал-макет виготовив В. В. Бригадиренко

Підписано до друку 25.07.2010. Формат 70×108 ¹/₁₆. Папір друкарський. Друк плоский.
Ум. друк. арк. 11,55. Ум. фарбовідб. 11,55. Обл.-вид. арк. 11,82. Тираж 100 пр. Вид. № 1542.
Замовлене

Свідоцтво державної реєстрації № ДК – 289 від 21.12.2000 р.

Видавництво Дніпропетровського університету,
пр. Гагаріна, 72, м. Дніпропетровськ, 49010
Друкарня ДНУ, вул. Наукова, 5, м. Дніпропетровськ, 49050

*Друкується за рішенням вченої ради
Дніпропетровського національного університету ім. Олеся Гончара
згідно з планом видань на 2011 рік*

Приведены результаты научных исследований, посвященных актуальным проблемам биохимии, микробиологии, физиологии человека и животных, медицины.

Для широкого круга научных сотрудников, преподавателей, аспирантов, студентов, работников здравоохранения.

Наведено результати наукових досліджень, присвячених актуальним проблемам біохімії, мікробіології, фізіології людини та тварин, медицини.

Для широкого кола науковців, викладачів, аспірантів, студентів, працівників охорони здоров'я.

Редакційна колегія:

д-р біол. наук, проф. О. Є. Пахомов (відп. редактор); канд. біол. наук, доц. В. В. Бригадиренко (відп. секретар); д-р психол. наук, проф. І. Ф. Аршава; д-р мед. наук, проф. П. П. Бачинський; д-р мед. наук, проф. Я. С. Березницький; д-р біол. наук, проф. Н. А. Білова; д-р біол. наук, проф. О. М. Вінниченко; д-р біол. наук, проф. А. І. Вінніков; канд. біол. наук, доц. В. Я. Гассо; д-р біол. наук, проф. Ю. І. Грицан; д-р біол. наук, проф. А. І. Дворецький; д-р біол. наук, проф. Л. Г. Долгова; д-р мед. наук, проф. А. Д. Дюдюк; д-р мед. наук, проф. Т. М. Єрошкіна; д-р біол. наук, проф. В. М. Зверковський; д-р мед. наук, проф. Г. М. Кременчуцький; канд. біол. наук, ст. н. с. А. Ф. Кулик; д-р мед. наук, проф. Ф. Й. Куликова; д-р біол. наук, проф. Ю. В. Лихолат; д-р мед. наук, проф. О. Є. Лоскутов; д-р біол. наук, проф. В. П. Ляшенко; канд. біол. наук, проф. О. Б. Мурзін; д-р біол. наук, проф. Л. П. Мищик; д-р біол. наук, проф. В. С. Недзвецький; канд. мед. наук, доц. Н. М. Поліон; канд. біол. наук, доц. Т. М. Полішко; д-р біол. наук, проф. Т. М. Сатарова; д-р біол. наук, проф. О. В. Севериновська; д-р мед. наук, проф. О. П. Татаровський; д-р мед. наук, проф. С. М. Тимчук; чл.-кор. НАНУ, д-р біол. наук, проф. А. П. Травлеєв; д-р біол. наук, проф. Г. О. Ушакова; д-р біол. наук, доц. О. В. Федоненко; д-р біол. наук, проф. Н. М. Цветкова; д-р біол. наук, проф. Н. І. Штеменко; д-р біол. наук, проф. О. О. Шугуров.