

ISSN 2310-4155 print
ISSN 2312-7295 online

ВІСНИК



Дніпропетровського університету Серія БІОЛОГІЯ, МЕДИЦИНА

**Visnik Dnipropetrovs'kogo unìversitetu. Seriâ Biologiâ, medicina
Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, medicine**

2014 5(1)

Друкується за рішенням вченої ради Дніпропетровського національного університету ім. Олесь Гончара згідно з планом видань на 2013 рік (прот. № 6 від 19.12.2013 р.)

Редакційна колегія (Editorial Board)

Голова редакційної колегії (Editor-in-Chief):

Пахомов Олександр Євгенович – Дніпропетровський національний університет ім. Олесь Гончара, декан ф-ту біології екології та медицини; д-р біол. наук, проф.

Заступники голови редакційної колегії:

McLachlan John A. – Tulane University, School of Medicine, Department of Pharmacology, New Orleans, USA; PhD, Prof.;

Melamed Israel – Soroka University Medical Center, Deputy Chief of Department of Neurosurgery, Beer-Sheva, Israel; MD;

Pierzynowski Stefan G. – Lund University, Dept of Biology, Lund, Sweden; PhD, Prof.

Науковий секретар редакційної колегії:

Бригадиренко Віктор Васильович – Дніпропетровський національний університет ім. Олесь Гончара, доц. каф. зоології та екології; канд. біол. наук, доц.

Члени редакційної колегії:

Boyko Mathew – Ben Gurion University of the Negev, Faculty of Health Sciences, Beer Sheva, Israel; Dr., Assistant Prof.;

Бачинський Петро Петрович – Дніпропетровський національний університет ім. Олесь Гончара, проф. каф. клінічної лабораторної діагностики; д-р мед. наук, проф.;

Березницький Яків Соломонович – Дніпропетровська державна медична академія, проф. каф. хірургії № 1; д-р мед. наук, проф.;

Вінніков Альберт Іванович – Дніпропетровський національний університет ім. Олесь Гончара, завідувач каф. мікробіології, вірусології та біотехнології; д-р біол. наук, проф.;

Гассо Віктор Якович – Дніпропетровський національний університет ім. Олесь Гончара, завідувач каф. зоології та екології; канд. біол. наук, доц.;

Дюдюк Анатолій Дмитрович – Дніпропетровська державна медична академія, завідувач каф. дерматовенерології; д-р мед. наук, проф.;

Єрошкіна Тетяна Миколаївна – Дніпропетровський національний університет ім. Олесь Гончара, проф. каф. клінічної лабораторної діагностики; д-р мед. наук, проф.;

Кремленчуцький Геннадій Миколайович – Дніпропетровська державна медична академія, завідувач каф. мікробіології, вірусології, імунології і епідеміології; д-р мед. наук, проф.;

Кулікова Файна Іосифівна – Дніпропетровська обласна клінічна лікарня ім. І. І. Мечникова, зав. відділення рентгендіагностики; д-р мед. наук;

Лоскутов Олександр Євгенович – Дніпропетровська державна медична академія, проф. каф. травматології та ортопедії; д-р мед. наук, проф.;

Недзвецкий Віктор Станіславович – Дніпропетровський національний університет ім. Олесь Гончара, проф. каф. біофізики та біохімії; д-р біол. наук, проф.;

Севериновська Олена Вікторівна – Дніпропетровський національний університет ім. Олесь Гончара, завідувач каф. фізіології людини та тварин; д-р біол. наук, проф.;

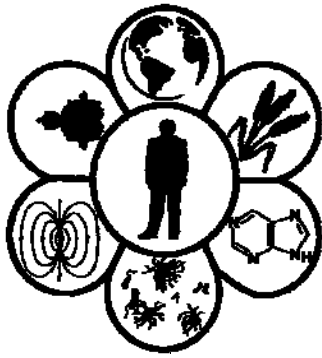
Татаровський Олександр Петрович – Дніпропетровський національний університет ім. Олесь Гончара, проф. каф. клінічної лабораторної діагностики; д-р мед. наук, проф.;

Тимчук Сергій Миколайович – Дніпропетровська обласна клінічна лікарня ім. І. І. Мечникова, зав. відділення лор-онкології; д-р мед. наук;

Ушакова Галина Олександрівна – Дніпропетровський національний університет ім. Олесь Гончара, проф. каф. біофізики та біохімії; д-р біол. наук, проф.;

Шевченко Тетяна Миколаївна – Дніпропетровський національний університет ім. Олесь Гончара, завідувач каф. клінічної лабораторної діагностики; д-р біол. наук, доц.;

Штеменко Наталія Іванівна – Дніпропетровський національний університет ім. Олесь Гончара, завідувач каф. біофізики та біохімії; д-р біол. наук, проф.



УДК 615.218.2.099:611-018.1-019

Оцінка цитотоксичної дії антигістамінних препаратів лоратадину та дезлоратадину з використанням тест-об'єкта – спермійв бугаїв

О.Б. Кузьмінов¹, Д.Д. Остапів², Т.А. Альохіна¹

¹Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Львів, Україна

²Інститут біології тварин НААН, Львів, Україна

Оцінено цитотоксичний вплив фармакологічних субстанцій для виробництва вітчизняних антигістамінних препаратів лоратадину та дезлоратадину. Як тест-об'єкт використано суспензію спермійв бугая. Проби сперми ділили на контрольну (розріджену фосфатно-сольовим буфером) і дослідні з додаванням у фосфатно-сольовий буфер лоратадину у дозах 1/500 LD₅₀ (12,3 мг), 1/100 LD₅₀ (61,5 мг) та LD₅₀ (6150 мг) і дезлоратадину 1/500 LD₅₀ (1,25 мг), 1/100 LD₅₀ (6,25 мг) та LD₅₀ (625 мг). Визначали виживання спермійв до припинення прямолінійного поступального руху у збереженій за температури +2...+5 °С спермі, дихальну активність (*ex tempore*) – полярографічно у термостатованій комірці (38,5 °С) об'ємом 1,0 мл з автоматичною реєстрацією перебігу процесу потенціометром; відновну активність – потенціометрично з використанням системи відкритих мікроелектродів, які вставляли в термостатовану полярографічну комірку. Виживання спермійв у спермі за дії лоратадину нижче показників контролю на 10,0–30,0%, за дії дезлоратадину – на 5,3–52,7%. Дихальна та відновна активність сперми під впливом лоратадину знижуються відповідно на 20,5–61,5% і 80,0–98,0%, під впливом дезлоратадину відповідно на 16,2–80,7% і 12,0–60,0% порівняно з контролем.

Ключові слова: лоратадин; дезлоратадин; цитотоксичний вплив; спермії бугаїв

Evaluation of cytotoxic action of antihistamines – desloratadine and loratadine – using bulls spermatozoa as a test object

O. Kuzminov¹, D. Ostapiv², T. Alekhina¹

¹Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

²Institute of Animal Biology of NAAS, Lviv, Ukraine

Antihistamines with active ingredients of loratadine and desloratadine are produced by Ukrainian pharmaceutical industry. According to the law, there are assessed for their potential danger to human health and the environment, including alternative test objects. Evaluation has been carried out with regard to cytotoxic effect of pharmacological substances (loratadine and desloratadine) using the bull sperm suspension as test objects, standardized and highly sensitive to toxic substances. Sperm was divided into the control sample (dissolved by phosphate-buffered saline) and the investigated sample. Loratadine was added to phosphate-buffered saline in doses of 1/500 LD₅₀ (12.3 mg), 1/100 LD₅₀ (61.5 mg) and LD₅₀ (6150 mg). Desloratadine doses were 1/500 LD₅₀ (1.25 mg), 1/100 LD₅₀ (6.25 mg) and LD₅₀ (625 mg). Survival of spermatozoa was defined until termination of rectilinear forward movement in sperm intacted at +2...+5 °C. Respiratory activity (*ex tempore*) was defined in 1.0 ml thermostated cell (temperature of 38.5 °C) by polarography with the automatic registration of process flow by potentiometer; restorative activity was defined potentiometrically, using the open microelectrodes that were inserted in thermostated polarographic cell. Survival of spermatozoa in the sperm under the impact of loratadine in doses of 1/500 LD₅₀ and 1/100 LD₅₀ is respectively 136.0 ± 26.2 hours and 144.0 ± 19.6 hours. Adding LD₅₀ dose of loratadine reduced survival to 112.0 ± 26.2 hours, which is lower than the control (160.0 ± 26.1 hours), respectively, by 10.0–15.0 and 30.0%. Loratadine reduces the respiratory activity of sperm: in the dose of 1/500 LD₅₀ by 20.5%, in the dose of 1/100 LD₅₀ – by 43.6%, and that of 100 LD₅₀ – by 61.5% compared to the control.

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, вул. Пекарська, 69, Львів, 79010, Україна.

Lviv National Medical University of Danylo Halytsky, Pekarska str., 69, Lviv, 79019, Ukraine.

Tel.: +38-032-260-09-06. E-mail: toxcentr@rambler.ru

Інститут біології тварин НААН, вул. Василя Стуса, 38, Львів, 79034, Україна.

Institute of Animal Biology of NAAS, V. Stusa str., 38, Lviv, 79019, Ukraine.

Tel.: +38-032-270-23-89, E-mail: inenbiol@mail.lviv.ua

Restorative sperm activity under the impact of the loratadine reduced by 84.0% (dose of 1/500 LD₅₀), 98.0% (dose of 1/100 LD₅₀), 80.0% (dose LD₅₀) compared to controls. The survival of spermatozoa in the sperm under desloratadine action in the dose of 1/500 LD₅₀ is 144.0 ± 19.6 hours (10.0% reduction compared with the control – 152.0 ± 23.6 hours), in the dose of 1/100 LD₅₀ – 136.0 ± 26.1 hours (15.0% reduction), in the dose of LD₅₀ – 72.0 ± 19.6 hours (30.0% reduction). The intensity of oxygen consumption by sperm reduced by 16.2% when adding desloratadine in the dose of 1/500 LD₅₀, by 38.8% in the dose of 1/100 LD₅₀ and by 80.7% – in the dose of LD₅₀, compared with the control. Inhibition of respiratory activity is accompanied by decreasing in the transport of protons and electrons from spermatozoa into the extracellular medium, that manifests decreasing of reconstructive activity when the dose of desloratadine is 1/500 LD₅₀ (by 12.0%), 1/100 LD₅₀ (by 40.0%) and LD₅₀ (by 60.0%) compared with the control.

Keywords: loratadine; desloratadine; cytotoxic effect; bull sperm

Вступ

Антигістамінні препарати з діючими речовинами лоратадин і дезлоратадин займають одну з провідних позицій за обсягом споживання на українському фармацевтичному ринку. Широке використання вказаних препаратів зумовлене їх властивостями (гальмування виходу утворених і заново синтезованих медіаторів на рівні клітини (Genovese et al., 1997)) і доведеною ефективністю у випадку лікування алергічного риніту та кропивниці, відсутністю негативного впливу на репродуктивну функцію (McIntyre et al., 2003), стійкістю лікарських форм (Karen et al., 2013). Виявлено також позитивний вплив лоратадину як модифікатора радіаційної відповіді під час лікування раку (Soule et al., 2010). Дія лоратадину та дезлоратадину на метаболізм клітин опосередкована низькою здатністю до взаємодії з мембранозв'язаним фосфорильованим глікопротеїном (170 кДа, P-GP) порівняно з іншими антигістамінними препаратами (Wang Erjia et al., 2003).

Серед зарубіжних виробників на українському фармацевтичному ринку представлені препарати виробництва США, Великобританії, Індії, Угорщини, Швейцарії, Канади (Zauchenko et al., 2012). Випуск генеричних версій розпочато на ПАТ «Лекхім-Харків» (м. Харків), ПАТ «Фармак» (м. Київ), ПАТ «Київмедпрепарат» (м. Київ), ПАТ «Фармацевтична фірма “Дарниця”» (м. Київ). Промислове виробництво зумовлює проведення токсикологічної оцінки впливу фармакологічних субстанцій лоратадину та дезлоратадину на працівників з обґрунтуванням допустимого рівня вмісту препаратів в об'єктах довкілля.

За правилами нового Європейського законодавства, яке набуло чинності у 2007 році, до переліку обов'язкових методів оцінки потенційної небезпечності хімічних речовин для здоров'я людини та навколишнього середовища повинні бути включені методи оцінки токсичності на альтернативних тест-об'єктах (Dmytrukha, 2013; Enayetallah et al., 2013).

Поширені альтернативні методи досліджень із використанням рухливості статевих клітин як тест-об'єкта (Almova and Begieva, 2012; Nemkova et al., 2013).

Високою чутливістю до токсичних речовин володіє суспензія сперміїв бугая, яка широко використовується у практиці штучного запліднення і є стандартизованою. Переваги даного методу дозволили поширити його в медицині та ветеринарії під час токсикологічних досліджень (Muzyka et al., 2011).

Мета статті – з'ясувати наявність цитотоксичної дії лоратадину та дезлоратадину за тривалістю виживання сперміїв та інтенсивністю окисних процесів у спермії бугаїв.

Матеріал і методи досліджень

Лоратадин – етиловий ефір-4-(8-хлор-5,6-дигідро-11Н-бензо-[5,6]циклогепта-[1,2-б]піридин-11-іліден)-1-піперидинкарбонової кислоти. Синоніми – Веро-Лоратадин, Кларитин, Ломелан, Лоратин, Кларотадин. CAS № 79794-75-5. Емпірична формула – C₂₂H₂₃N₂ClO₂, молекулярна маса – 382,9. За зовнішнім виглядом це порошок білого кольору, помірно розчинний у воді, дуже мало розчинний у гексані, практично нерозчинний у спирті та хлороформі. Температура плавлення +131...+137 °С. Вміст основної речовини – 98,5–101,0% у перерахунку на суху речовину. Агрегатний стан у повітрі – аерозоль дезінтеграції. Виробник субстанції «Farmachem SA Chem Limited», Індія. Середньосмертельна доза (LD₅₀) для білих щурів становить 6 150 мг/кг.

Дезлоратадин – 8-хлор-6,11-дигідро-11-(4-піперидиніліден)-5Н-бензо[5,6]циклогепта[1,2-б]піридин. Синоніми – Делот, Кларамакс, Кларинекс, Ларинекс, Лоратек, Лордестин, НеоКларитин, Едем, Еридез, Еріус, Еслотин. CAS № 100643-71-8. Емпірична формула – C₁₉H₁₉ClN₂, молекулярна маса – 310,8. За зовнішнім виглядом це порошок від білого до кремового кольору, помірно розчинний у воді, розчинний в етиловому та метиловому спирті, диметилсульфоксиді, хлороформі. Температура плавлення +155...+160 °С. Вміст основної речовини – 98,0–102,0% у перерахунку на суху речовину. Агрегатний стан у повітрі: аерозоль дезінтеграції. Виробник субстанції – «Cadila Healthcare LTD», Індія. LD₅₀ для білих щурів – 625 мг/кг.

Для досліджень використовували свіжоотримані еякуляти бугаїв таких фізіологічних характеристик: об'єм 4–5 мл, концентрація сперміїв 0,7–0,9 × 10⁹ клітин/мл, кількість живих статевих клітин – 70–85%. Для оцінювання та характеристики дії фармакологічних субстанцій проби сперми ділили на контрольну, розріджену фосфатно-сольовим буфером (ФСБ; NaCl – 0,8 г, KCl – 0,02 г, Na₂HPO₄ – 0,11 г, KH₂PO₄ – 0,02 г, MgCl₂ – 0,01 г, H₂O – до 100 мл) та дослідні, із додаванням у ФСБ лоратадину у дозах 1/500 LD₅₀ (12,3 мг), 1/100 LD₅₀ (61,5 мг) та LD₅₀ (6150 мг) і дезлоратадину – 1/500 LD₅₀ (1,25 мг), 1/100 LD₅₀ (6,25 мг) та LD₅₀ (625 мг). Визначали виживання сперміїв (год) до припинення прямолінійного поступального руху у збереженій за температури +2...+5 °С спермі, дихальну активність (ex tempore) – полярографічно (нгатом O/0,1мл сперми (С) × хв) у термостатованій комірці (температура 38,5 °С) об'ємом 1,0 мл з автоматичною реєстрацією перебігу процесу потенціометром; відновну активність – потенціометрично (mV/0,1 мл С × хв) із використанням системи відкритих мікроелектродів, які вставляли у термостатовану полярографічну комірку

(Shtolts et al., 1980). Різницю між вибірками вважали статистично вірогідною за $P < 0,05$ (Plokhinskiy, 1970).

Результати та їх обговорення

Вживання сперміїв у спермі за дії лоратадину в дозах 1/500 LD₅₀ та 1/100 LD₅₀ майже однакове (136,0–144,0 год), а у разі додавання лоратадину в дозі LD₅₀ – мінімальне (112,0 ± 26,2 год), що нижче показників контролю, відповідно, на 10,0–15,0% та 30,0% (табл. 1).

Кореляційне відношення для виживання сперміїв за наростаючих доз лоратадину слабке ($\eta^2 = 0,141$). Лоратадин знижує дихальну активність сперми, проте сила впливу на досліджуваний показник мала ($\eta^2 = 0,255$). Однак наростаючі дози вказаної фармакологічної суб-

станції зменшують відновну активність сперми. При цьому лоратадин у дозі 1/500 LD₅₀ знижує величину показника на 84,0%, у дозі 1/100 LD₅₀ – на 98,0% ($P < 0,05$), а у разі додавання лоратадину на рівні LD₅₀ зниження становило 80,0% порівняно з контролем. Кореляційне відношення для відновної активності сперми за наростаючих доз лоратадину середньої сили ($\eta^2 = 0,581$).

За дії наростаючих доз дезлоратадину (1/500 LD₅₀, 1/100 LD₅₀ і LD₅₀) величина фізіологічного показника знижується, відповідно, на 5,3, 10,6 і 52,7% (табл. 2). При цьому різниця між величинами контролю та за дози дезлоратадину LD₅₀ статистично вірогідна ($P < 0,05$). Вплив наростаючих доз дезлоратадину на виживання сперміїв середній по силі ($\eta^2 = 0,400$).

Таблиця 1

Вживання сперміїв та інтенсивність окисних процесів у спермі бугаїв за дії лоратадину ($n = 3$; $M \pm m$)

Показники	Умови інкубування сперми				Кореляційне відношення, η^2
	Контроль (ФСБ)	ФСБ + 1/500 LD ₅₀	ФСБ + 1/100 LD ₅₀	ФСБ + LD ₅₀	
Вживання сперміїв, год	160,0 ± 26,1	136,0 ± 26,2	144,0 ± 19,6	112,0 ± 26,2	0,141
Споживання кисню, нг-атом O/(0,1 мл С × хв)	3,9 ± 1,34	3,1 ± 0,87	2,2 ± 0,74	1,5 ± 0,48	0,255
Відновна активність, mV/(0,1 мл С × хв)	2,5 ± 0,82	0,4 ± 0,26	0,05 ± 0,01*	0,5 ± 0,39	0,581

Примітка: * – різниця статистично вірогідна порівняно з контролем за $P < 0,05$.

Таблиця 2

Вживання сперміїв та інтенсивність окисних процесів у спермі бугаїв за дії дезлоратадину ($n = 3$; $M \pm m$)

Показники	Умови інкубування сперми				Кореляційне відношення, η^2
	Контроль (ФСБ)	ФСБ + 1/500 LD ₅₀	ФСБ + 1/100 LD ₅₀	ФСБ + LD ₅₀	
Вживання сперміїв, год	152,0 ± 23,6	144,0 ± 19,6	136,0 ± 26,1	72,0 ± 19,6*	0,400
Споживання кисню, нг-атом O/(0,1 мл С × хв)	3,1 ± 0,47	2,6 ± 0,66	1,9 ± 0,61	0,6 ± 0,25**	0,513
Відновна активність, mV/(0,1 мл С × хв)	2,5 ± 0,47	2,2 ± 0,36	1,5 ± 0,10	1,0 ± 0,39	0,466

Примітка: * – різниця статистично вірогідна порівняно з контролем за $P < 0,05$, ** – за $P < 0,01$.

Більшими змінами характеризуються величини дихальної та відновної активностей сперми за впливу вказаної фармакологічної субстанції. Інтенсивність споживання кисню спермою за умови додавання дезлоратадину знижується на 16,2% за дози препарату 1/500 LD₅₀, на 38,8% – за дози препарату 1/100 LD₅₀ і на 80,7% порівняно з контролем за дози LD₅₀ ($P < 0,05$). Гальмування дихальної активності супроводжується зменшенням транспорту протонів та електронів зі сперміїв у позаклітинне середовище, що проявляється зниженням відновної активності за дози дезлоратадину 1/500 LD₅₀ на 12,0%, за дози дезлоратадину 1/100 LD₅₀ – на 40,0% і за умови додавання препарату в дозі LD₅₀ – на 60,0%, порівняно з контролем. Вплив наростаючих доз дезлоратадину на дихальну та відновну активність сперми середній за силою (відповідно, $\eta^2 = 0,513$ і 0,466).

Таким чином, досліджені фармакологічні субстанції у спермі проявляють цитотоксичний вплив, який характеризується пониженою інтенсивністю окисних процесів, імовірно, зниженням функціонування ланцюга дихання мітохондрій і ресинтезом АТФ, що зумовлює втрату рухливості та зменшення тривалості виживання сперміїв.

Висновки

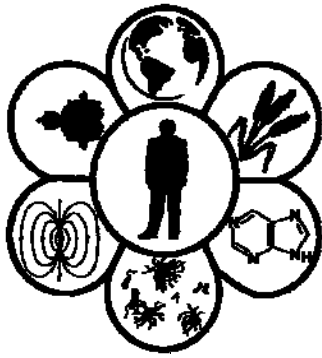
Цитотоксична дія лоратадину та дезлоратадину залежить від дози та характеризується порушенням окисних процесів сперми, що проявляється зменшенням споживання кисню та пониженою відновною активністю. Обґрунтовуючи допустимий рівень вмісту препаратів у повітрі робочої зони, необхідно провести дослідження їх гонадотоксичного впливу на лабораторних тваринах.

Бібліографічні посилання

- Almova, A.A., Begieva, M.B., 2012. Opredelenie toksicheskogo deystviya polimernykh materialov na osnove N,N-diallilaminokislot [Definition of toxic action of polymeric materialson the basis of N,N-dasllyamino acids]. Fundamental'nye Issledovaniya 9, 539–541(in Russian).
- Dmytrukha, N.N., 2013. Kultura kletok kak in vitro model v toksikologicheskikh issledovaniyakh [Cell culture as in vitro model in toxicology studies]. Medix. Anti-Aging. 3, 50–55 (in Russian).
- Enayetallah, A.E., Puppala, D., Ziemek, D., Fischer, J.E., Kantesaria, S., Pletcher, M.T., 2013. Assessing the translat-

- ability of *in vivo* cardiotoxicity mechanisms to *in vitro* models using causal reasoning. *BMC Pharmacol. Toxicol.* 14, 46–58.
- Genovese, A., Patella, V., De Crescenzo, G., De Paulis, A., Spadaro, G., Marone, G., 1997. Loratadine and desethoxycarbonyl-loratadine inhibit the immunological release of mediators from human fcr ϵ 1+cells. *Clin. Exp. Allergy* 27(5), 559–567.
- Karen, H.D., Patel, D.M., Jasakiya, A.R., Patel, C.N., 2013. Development of oral strip for loratadine and *in vitro* evaluation. *Int. J. Pharm. Pharmacol.* 2(8), 125–130.
- McIntyre, B.S., Vancutsem, P.M., Treinen, K.A., Morrissey, R.E., 2003. Effects of perinatal loratadine exposure on male rat reproductive organ development. *Reprod. Toxicol.* 17(6), 691–697.
- Muzyka, V.P., Atamanjuk, I.S., Chajkovs'ka, O.I., Panych, O.P., Sergijenko, O.I., Ostapiv, D.D., Jaremchuk, I.M., Kuzmina, N.V., Ostapiv, R.D., 2011. Do ocinjuvannja toksychnoi' dii' polimernih vyrobiv z vykorystannjam test-ob'jektu-spermii'v bugai'v [Evaluation of toxic effects of polymer products using the test object bull spermatozoa]. *Naukovo-Tekhnichnyj Bjuletyn' Instytutu Biologii' Tvaryn i DNDKI Vetprepartiv ta Kormovyh Dobavok* 12(3), 414–420 (in Ukrainian).
- Nemkova, I.N., Guskova, T.A., Syubaev, R.D., Engalycheva, G.N., Vasiliev, A.N., 2013. Issledovanie *in vitro* tsitotoksicheskogo deystviya nesteroidnykh protivovospalitel'nykh sredstv, ispol'zuemykh v sostave kombinirovannykh lekarstvennykh preparatov [*In vitro* studi on cytotoxic effect of non-steroidal anti-inflammatory agents used in the composition of combined medicinal preparations]. *Toksikologicheskij Vestnik* 5, 13–16 (in Russian).
- Plokhinskiy, N.A., 1970. *Biometriya* [Biometry]. MSU, Moscow (in Russian).
- Shtolts, K.F., Mosolova, I.M., Dronova, L.A., 1980. Amperometricheskoe opredelenie ferrotsianida v prisutstvii subkletechnykh struktur [Amperometric definition of ferrocyanide in the presence of subcellular structures]. *Biokhimicheskie Metody. Nauka, Moscow*, 147–150 (in Russian).
- Soule, B.P., Simone, N.L., DeGraff, W.G., Choudhuri, R., Cook, J.A., 2010. Loratadine dysregulates cell cycle progression and enhances the effect of radiation in human tumor cell lines. *Radiat. Oncol.* 5(8), 1–12.
- Wang, E., Casciano, C.N., Clement, R.P., Johnson, W.W., 2003. Evaluation of the interaction of loratadine and desloratadine with P-glycoprotein. *DMD* 29(8), 1080–1083.
- Zaychenko, G.V., Yakovleva, L.V., Bryukhanova, T.O., Kolos, O.M., 2012. Suchasni protyalergichni preparaty: Kliniko-farmakologichni ta farmakoekonomichni osoblyvosti [Modern antiallergic drugs: Clinical and pharmacological and pharmaco-economic characteristics]. *Ukrai'ns'kyj Medychnyj Chasopys* 6, 134–136 (in Ukrainian).

Надійшла до редколегії 10.02.2014



УДК 579.61:616-078

Влияние цефтриаксона и тетрациклина на формирование биопленки штаммами *Staphylococcus epidermidis*

О.И. Сидашенко, О.С. Воронкова, Е.А. Сирокваша, А.И. Винников

Днепропетровский национальный университет имени Олеся Гончара, Днепропетровск, Украина

Изучено влияние цефтриаксона и тетрациклина на образование биопленки двумя штаммами *S. epidermidis*: контрольным (С) и клиническим (СІ). Минимальные подавляющие концентрации (МПК) антибиотиков для планктонных культур изучаемых штаммов в два раза меньше, чем для биопленочных культур. При внесении препаратов к одно- и двусуточным биопленочным культурам *S. epidermidis* более эффективно на сформировавшуюся биопленку клинического штамма действовал тетрациклин. Добавление последнего к суточной биопленке *S. epidermidis* СІ с получением в среде культивирования штамма концентрации 20 мкг/мл снижало эффективность формирования биопленки: количество клеток уменьшалась в 590 раз по сравнению с контролем. Повышение концентрации тетрациклина до 100 мкг/мл при внесении к суточной биопленке выделенного штамма приводило к снижению количества бактериальных клеток в 4400 раз по сравнению с контролем.

Ключевые слова: минимальные подавляющие концентрации (МПК); планктон; клинический штамм; контрольный штамм

Ceftriaxone and tetracycline effect on biofilm-formation strains of *Staphylococcus epidermidis*

O.I. Sidashenko, O.S. Voronkova, Y.A. Sirokvasha, A.I. Vinnikov

Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Dnipropetrovsk, Ukraine

122 strains of staphylococci were identified. Among the examined 122 clinical strains of staphylococci, 67 strains belonged to coagulase-positive, and 55 strains to the coagulase-negative ones. According to the study of physiological and biochemical properties, it was found that 37 strains (30.3%) belonged to *S. epidermidis* species. One of the biological properties of many bacteria is the ability to film formation and these strains attract special attention, since it is known that the film antibiotic resistance is higher than in planktonic cultures. It was determined that 20 strains of those under study were film-forming, 17 strains – non-biofilm forming ones. The film was formed during three days, and settled to the bottom of the plate holes. The clinical (CI) strain of *S. epidermidis* was sensitive to ceftriaxone and tetracycline. The control (C) strains of *S. epidermidis* were sensitive to ceftriaxone, tetracycline and sizomicine. The study of biofilm growth for 2, 3 and 4 days of incubation was carried out. The maximum rate of biofilm *S. epidermidis* C was observed during 2–3 days; there is the most intense increase of cells number from 5.2×10^8 CFU/ml, for *S. epidermidis* CI to 5.6×10^8 CFU/ml. The effect of ceftriaxone and tetracycline on biofilm formation by 2 investigation strains of *S. epidermidis* was found. We determined differences in minimal inhibitory concentrations (MIC) for planktonic cultures and biofilm of strains under study. It was established that MIC antibiotics inhibited the growth of planktonic cultures on average 2 times lower compared to the MIC which inhibited the biofilm formation. MIC for planktonic culture of *S. epidermidis* CI defined for ceftriaxone was equal to 10 mg/ml, and for tetracycline – 1 mg/ml. MIC of ceftriaxone for the control strain was equal to 12 mg/ml, MIC of tetracycline – 0.7 mg/ml. MIC values for dynamics biofilm formation of *S. epidermidis* CI strain on the plater were as follows: to ceftriaxone – 20 mg/ml and for tetracycline – 2 mg/ml, MIC of ceftriaxone for *S. epidermidis* C strain – 24 mg/ml, MIC of tetracycline – 1.5 mg/ml. The effect of ceftriaxone and tetracycline was defined to the larger extent, than MIC for biofilm-forming on the plate (10, 50 and 100 times). More effective action of tetracycline was shown for 1- and 2-daily biofilm cultures of *S. epidermidis* clinical strain. Adding tetracycline concentration of 20 mg/ml in the culture medium of the 1-day biofilm of *S. epidermidis* CI strain reduced the cell number of biofilm formation 590 times, increasing concentrations of tetracycline to 100 mg/ml and added to the 1-day biofilm of the clinical strain reduced the number of bacterial cell 4400 times compared with control.

Keywords: minimal inhibitory concentrations (MIC); plankton; clinical strain; control strain

Введение

На современном этапе развития в медицинской микробиологии происходят качественные изменения в интерпретации процессов, происходящих при хронических инфекциях. Исследования механизмов развития инфекционного процесса, включая образование персистирующих форм микроорганизмов, должны учитывать наличие особого биологического явления – формирования бактериальных биопленок (Gostev and Sidorenko, 2010; Chernjavsky, 2013).

Биопленки – подвижные, непрерывно изменяющиеся гетерогенные сообщества, в составе которых бактерии локализованы на какой-либо поверхности внутри сложноорганизованного внеклеточного матрикса, имеющего белковую либо полисахаридную природу (Carpentier, 1993; Donlan and Costerton, 2002; Hall-Stoodley, 2009; Afinogenova et al., 2010; Darovskaya, 2011; Golub, 2012). Они могут состоять из одного вида бактерий или грибов или, что встречается чаще, могут быть полимикробными, например, содержать различные виды микроорганизмов (Шуина et al., 2004; Yelinov, 2009). Экзополимерный матрикс выполняет роль пленочного барьера и защищает микроорганизмы от внешних воздействий (Afinogenova and Darovskaya, 2011).

Бактериальная биопленка образуется в результате сложных координированных взаимодействий микроорганизмов с поверхностью. Формирование биопленки состоит из следующих этапов: начальное прикрепление к поверхности, образование монослоя, движение по поверхности с образованием микроколоний, созревание биопленки и формирование трехмерной структуры (Lemon and Earl, 2003; Monroe, 2007; Nikolaev and Plakunov, 2007; Smirnova et al., 2010).

Способность бактерий существовать в виде биопленок создает большие проблемы в медицинской практике (Smirnova et al., 2008; Qu et al., 2010; Gomes et al., 2011). По данным разных авторов (Шуина et al., 2004; Tets et al., 2004), не менее 60% инфекций вызывается возбудителями, локализованными в биопленках. В этой связи наибольшее внимание исследователей привлекает устойчивость биопленок к антибиотикам и биоцидам, что усугубляется способностью микроорганизмов в инфицированном макроорганизме, а также на поверхности различных приборов, имеющих медицинское назначение (катетеров, глазных линз, искусственных клапанов сердца и т.д.) формировать биопленки. Есть данные (Olson et al., 2002; Lewis, 2005) о том, что микроорганизмы, входящие в состав биопленок, в отличие от планктонных культур, в 100–1 000 раз менее чувствительны к большинству антибиотиков и других биоцидных веществ, к факторам иммунной защиты организма, а также более устойчивы к неблагоприятным воздействиям окружающей среды, таким как изменение температуры, pH среды, осмотического давления (Nikolaev and Plakunov, 2007).

Природе этой устойчивости посвящено много работ. Наибольшее распространение получили представления о том, что значительную роль в приобретаемой устойчивости играет способность экзополисахаридного матрикса связывать антибиотики (Mah et al., 2003). Также существенный вклад в устойчивость вносит наличие генов

устойчивости и обмен ими у микроорганизмов (Nikolaev and Plakunov, 2007). Изучение влияния антибиотиков на развитие биопленки патогенными и условно-патогенными микроорганизмами является необходимым условием понимания как биологических основ формирования биопленки, так и поиска препаратов, эффективно подавляющих пленкообразующие бактерии, вызывающие инфекционные осложнения. Поэтому крайне необходимым является исследование влияния антибиотиков на развитие и структуру биопленок с целью выбора антибактериальных препаратов, способных к подавлению их возникновения, с одной стороны, и деструкция уже сформированной биопленки – с другой.

Цель работы – установить МПК цефтриаксона и тетрациклина для планктонных и биопленочных культур *S. epidermidis*, а также определить концентрации этих антибиотиков, подавляющих формирование биопленки *S. epidermidis*.

Материал и методы исследований

Выделены 122 изолята *Staphylococcus spp.* в лаборатории микробиологии и иммунологии ГУ Института гастроэнтерологии НАМН Украины. Идентификацию коагулазоотрицательных штаммов стафилококков проводили в соответствии с признаками, приведенными в (Holt et al., 1994): рост на солевом агаре (содержание NaCl 10%), ферментирование глюкозы, лактозы, чувствительность к новобиоцину (МПК < 1,6 мкг/мл), отсутствие коагулазы, восстановление нитратов, отсутствие образования кислоты из маннита при анаэробном культивировании, образование кислоты в аэробных условиях из сахарозы и мальтозы. Дифференциацию стафилококков на коагулазоположительные и коагулазоотрицательные проводили с использованием сухой цитратной плазмы кролика в реакции плазмокоагуляции (ЗАО «Биолик», Украина).

Для последующих исследований взят один из штаммов *S. epidermidis*, полученный из отделяемого носоглотки, который обозначили как *S. epidermidis* C1 (клинический штамм), и контрольный, который предоставлен С.Н. Козицкой из коллекции культур Института молекулярной инфектологии Вюрцбургского университета (ФРГ) – *S. epidermidis* C. В дальнейших экспериментах проводили сравнительное изучение свойств клинического и контрольного изолятов *S. epidermidis*.

Изучение способности к пленкообразованию проводили в экспресс-тесте: в лунки стерильного иммунологического планшета вносили 0,2 мл мясо-пептонного бульона (МПБ), засеивали 0,1 мл суспензии, содержащей $3,5 \times 10^6$ клеток/мл суточной культуры выделенного штамма *S. epidermidis* C1. За пленкообразованием наблюдали на протяжении 72 часов. По окончании инкубации остатки среды удаляли при помощи микропипетки. Оставшаяся на стенках луночки пленка была свидетельством способности штамма к пленкообразованию.

Следующим этапом было изучение чувствительности к антибиотикам методом дисков (About unification..., 1985) *S. epidermidis* C1 и *S. epidermidis* C. Для этого из суточной культуры готовили суспензию ($2,1 \times 10^7$ клеток/мл), которую засеивали по 0,1 мл на чашки Петри с

МПА. В каждую чашку помещали не более шести дисков с антибиотиками. Всего использовали 12 антибиотиков: цефтриаксон, цефуроксим, цефтазидим, тетрациклин, доксициклина гидрохлорид, сизомицин, амоксициллин, олеандомицин, оксациллин, азтреонам, гентамицин, эритромицин (диски производства Himedia Laboratories Pvt. Limited, Индия).

После определения антибиотиков, к которым чувствительны изучаемые штаммы, определяли МПК этих антибиотиков методом серийных разведений. Через 24 часа проводили учет результатов. Для определения наличия роста микроорганизмов пробирки с посевами просматривали в проходящем свете.

Следующим шагом было определение МПК антибиотиков, действующих на биопленкообразование на планшете. Для получения биопленок на планшете в лунки 96-луночного иммунологического планшета вносили по 0,2 мл МПБ. Из основного разведения антибиотика (1 г антибиотика в 10 мл изотонического раствора 0,5% натрия хлорида) отбирали 0,05 мл и вносили в первую лунку планшета, затем делали серийные разведения антибиотиков в питательной среде. В каждую лунку вносили по 0,05 мл бактериальной суспензии, которая содержала $3,3 \times 10^6$ клеток/мл. Планшет инкубировали при +37 °С. Учет результатов проводили через 72 часа. Последняя лунка планшета, в которой не происходило образование биопленки на протяжении 72 часов, соответствовала МПК антибиотика.

После определения МПК антибиотиков, действующих на пленкообразование на планшете, изучали влияние этих антибиотиков на биопленки разного срока формирования. Для получения биопленок во флаконах на дно флаконов помещали покровное стекло, вносили 0,4 мл ночной бульонной культуры ($3,5 \times 10^6$ КОЕ/мл), инкубировали 3 ч в термостате при +37 °С. После этого добавляли свежую среду 1,6 мл до общего объема 2,0 мл. Флаконы выдерживали 3 ч при +37 °С (Smirnova et al., 2010). До добавления антибиотиков пленки выращивали одни и двое суток. Антибиотики вносили в указанное время в среду к образовавшейся биопленке. В качестве контроля использовали культуры, выращенные на среде без антибиотиков.

Цефтриаксон и тетрациклин для изучаемых штаммов *S. epidermidis* вносили в концентрациях, которые в 10 и 50 раз превышали МПК для инициации пленкообразования на планшете, так как известно, что бактерии в составе биопленки в 10 и более раз устойчивы к действию антибиотиков.

После внесения антибиотиков биопленки еще сутки инкубировали при +37 °С, после чего проводили высеv. Влияние антибиотиков на формирование биопленки оценивали по количеству выросших на агаре КОЕ. Динамику прироста биопленки изучали в среде без антибиотиков. Высеv проводили на вторые, третьи и четвертые сутки.

Для определения количества КОЕ/мл смьютую с покровного стекла в стерильную пробирку биопленку гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в 1 мл изотонического раствора (0,5% натрия хлорида). Затем проводили высеv на МПА для учета КОЕ.

Эксперименты проводили в пяти повторностях. Статистическая обработка полученных результатов прово-

дилась по стандартной методике с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Из полученных 122 штаммов стафилококков к коагулазоположительным относится 67, к коагулазоотрицательным – 55. После проводили идентификацию коагулазонегативных стафилококков, среди которых 37 штаммов были идентифицированы как *S. epidermidis*. Из них к биопленкообразованию способны 20 штаммов. Биопленка образовывалась на дне и стенках лунок иммунологического планшета.

Общая характеристика биопленкообразующих штаммов. Прирост биопленки проводили в среде без антибиотиков. Основной прирост биопленки для обоих штаммов наблюдался в первые трое суток, при этом в среднем количество жизнеспособных клеток для выделенного штамма увеличилось в $5,6 \times 10^8$ раз, а для контрольного штамма *S. epidermidis* количество КОЕ/мл увеличивалось в $5,2 \times 10^8$ раз. Начиная с четвертых суток инкубации наблюдали деградацию биопленки и отмирание клеток, что объясняется истощением питательной среды, поэтому дальнейшее культивирование биопленки не проводили.

При определении чувствительности штаммов *S. epidermidis* Cl и *S. epidermidis* C антибиотики выбирали из наиболее часто используемых в клинической практике и имеющих различные мишени действия. Устойчивость к антибиотикам исследовали методом дисков. Клинический штамм *S. epidermidis* оказался чувствительным к цефтриаксону и тетрациклину. Контрольный штамм *S. epidermidis* C чувствителен к цефтриаксону, тетрациклину и сизомицину. Штаммы оказались чувствительными к антибиотикам, подавляющим синтез белка за счет взаимодействия с 30S-субъединицей рибосомы (сизомицин и тетрациклин) и синтез клеточной стенки (цефтриаксон). Таким образом, для дальнейших исследований взяли тетрациклин и цефтриаксон.

Определение МПК антибиотиков для планктонных и биопленочных культур. МПК цефтриаксона для планктонной культуры *S. epidermidis* Cl составила 10 мкг/мл, для контрольного штамма МПК цефтриаксона – 12 мкг/мл. МПК тетрациклина, предотвращающая развитие планктонной культуры клинического штамма *S. epidermidis* Cl, составила 1 мкг/мл, для контрольного штамма МПК тетрациклина – 0,7 мкг/мл.

По данным литературы (Tetz, 1996; Olson et al., 2002), МПК антибиотиков для планктонной и биопленочной культур одного и того же штамма могут различаться в 10–100 и более раз. Изучали МПК, предотвращающие биопленкообразование. МПК цефтриаксона для биопленкообразования клинического штамма составила 20 мкг/мл, для контрольного штамма – 24 мкг/мл. МПК тетрациклина, предотвращающая биопленкообразование клинического штамма, равна 2 мкг/мл, для контрольного штамма – 1,5 мкг/мл. При добавлении цефтриаксона и тетрациклина независимо от их концентрации во время засева бактериальной суспензии ни формирования биопленки, ни роста планктонной культуры не наблюдается,

что подтверждается данными литературы (Tetz, 1996; Smirnova et al., 2008).

Влияние повышенных концентраций цефтриаксона и тетрациклина. Изучали влияние цефтриаксона в концентрациях, которые в 10 и 50 раз превышают МПК инициации и биопленкообразования. Для клинического штамма это 200 и 1 000 мкг/мл, а для контрольного – 240 и 1 200 мкг/мл. При добавлении цефтриаксона концентрацией 200 мкг/мл в питательную среду с суточной биопленкой клинического штамма происходило снижение количества клеток в 33 раза. При внесении антибиотика к двусуточной биопленке количество клеток снижалось в 35 раз по сравнению с контролем. При добавлении цефтриаксона (240 мкг/мл) в питательную среду с суточной пленкой контрольного штамма наблюдалось снижение количества клеток в 34 раза, к двусуточной – в 33 раза по сравнению с культурой, которая развивалась в среде без добавления антибиотиков.

По данным литературы (Tetz, 1996; Tets et al., 2004), существует зависимость эффективности подавления роста биопленки от дозы антибиотика. Использование концентраций антибиотиков, которые превышают МПК, приводит к еще большему снижению числа КОЕ/мл биопленки. При внесении к суточной биопленке выделенного штамма цефтриаксона концентрацией 1 000 мкг/мл происходило снижение количества клеток в 780 раз, к двусуточной биопленке – в 590 раз по сравнению с контролем. При внесении цефтриаксона (1 200 мкг/мл) к суточной биопленке контрольного штамма происходило снижение количества клеток в 580 раз, к двусуточной пленке – в 450 раз по сравнению с контролем.

Для изучения влияния на биопленки использовали тетрациклин в концентрациях, которые в 10 и 50 раз превышают МПК инициации и биопленкообразования. Для клинического штамма – это 20 и 100 мкг/мл, а для контрольного – 15 и 75 мкг/мл.

При внесении тетрациклина в концентрации 20 мкг/мл к суточной культуре выделенного штамма происходило снижение количества клеток в 590 раз, добавление антибиотика к двусуточной биопленке – в 580 раз по сравнению с контролем. При внесении тетрациклина (15 мкг/мл) к суточной культуре контрольного штамма количество клеток падало в 690 раз, к двусуточной биопленке – количество клеток снижалось в 480 раз по сравнению с контролем.

При повышении концентрации тетрациклина до 100 мкг/мл при внесении к суточной биопленке выделенного штамма отмечали снижение количества клеток в 4 400 раз, при добавлении к двусуточной биопленке количество КОЕ/мл снижалось в 2900 раз по сравнению с контролем. При повышении концентрации тетрациклина до 75 мкг/мл в суточной биопленке контрольного штамма наблюдалось снижение количества клеток в 4200 раз, в двусуточной пленке количество клеток снижалось в 3300 раз по сравнению с контролем. Таким образом, более эффективно на суточную стафилококковую биопленку воздействовал тетрациклин по сравнению с цефтриаксоном.

Наши данные согласуются с данными исследований (Tetz, 1996; Tets et al., 2004) по изучению влияния антибиотиков на суточные биопленки разных видов микро-

организмов. Внесение антибиотиков к суточным биопленкам имитирует процесс их действия в естественных условиях, поскольку к моменту появления патологических изменений, которые фиксируют как симптомы болезни, и назначении лечения бактерии уже находятся в сформированных биопленках. При таком взаимодействии, по данным литературы, происходит снижение числа КОЕ в 10–100 раз, а в результате наших исследований снижение в среднем происходило в 330 раз. Добавление антибиотиков к суточным биопленкам в концентрациях, превышающих МПК, не вызывало полного блокирования их образования, но у всех тестированных штаммов вызывало значительное снижение числа жизнеспособных клеток.

Использование концентраций антибиотиков (Tetz, 1996; Olson et al., 2002; Smirnova and Didenko, 2010), превышающих МПК, приводит к еще большему снижению жизнеспособных клеток биопленки и, таким образом, эффективно влияет на ее деструкцию. Цефтриаксон и тетрациклин в дозах, которые превышают в 50 раз МПК, останавливают развитие биопленки штаммов *S. epidermidis* Cl и *S. epidermidis* C и приводят к деструкции уже сформировавшуюся суточную биопленку, что имеет особое значение для терапии инфекционных осложнений, вызванных биопленкообразующими штаммами бактерий.

Выводы

Из 122 изученных штаммов к *S. epidermidis* относятся 37 штаммов, из них к биопленкообразованию способны 20 штаммов. Биопленкообразующие штаммы *S. epidermidis* чувствительны к цефтриаксону, тетрациклину и устойчивы к амоксициллину, олеандомицину, цефуросиму, цефтазидиму, оксациллину и азтреонаму. При изучении прироста биопленки в среднем количество клеток для *S. epidermidis* Cl увеличилось в $5,6 \times 10^8$ раз, а для *S. epidermidis* C – в $5,2 \times 10^8$ раз. Начиная с четвертых суток инкубации наблюдали деграцию биопленки и отмирание клеток.

Для планктонной культуры штамма *S. epidermidis* Cl МПК цефтриаксона составляла 10 мкг/мл, МПК тетрациклина – 1 мкг/мл. МПК цефтриаксона для штамма *S. epidermidis* C – 12 мкг/мл, тетрациклина – 0,7 мкг/мл. МПК цефтриаксона, останавливающая возникновение биопленки *S. epidermidis* Cl на иммунологическом планшете, составляла 20 мкг/мл, а МПК тетрациклина – 2 мкг/мл; МПК цефтриаксона для контрольного штамма – 24 мкг/мл, тетрациклина – 1,5 мкг/мл.

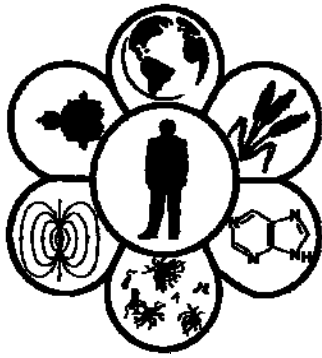
При использовании концентрации цефтриаксона, в 10 раз превышающей МПК, препятствовавшей возникновению биопленки, происходило снижение количества клеток в суточной пленке клинического штамма в 33 раза, в контрольном штамме – в 34 раза по сравнению с биопленкой, которая развивалась в среде без добавления антибиотиков. При использовании концентрации тетрациклина, в 10 раз превышающей МПК, препятствовавшей возникновению биопленки, происходило снижение количества клеток в суточной биопленке выделенного штамма в 589 раз, для штамма *S. epidermidis* C – в 690 раз по сравнению с контролем.

При концентрации цефтриаксона, в 50 раз превышающей МПК для формирования биопленки на планшете, происходило снижение количества клеток в 580 раз штамма *S. epidermidis* C, для штамма *S. epidermidis* CI – в 780 раз по сравнению с контролем. При концентрации тетрациклина, превышающей в 50 раз МПК для развития биопленки, происходило снижение количества клеток для штамма *S. epidermidis* CI в суточной пленке в 4 400 раз, для штамма *S. epidermidis* C – в 4 200 раз по сравнению с контролем.

Библиографические ссылки

- About the unification of microbiological (bacteriological) research methods used in clinical diagnostic laboratories of medical institutions: the order № 535 (1985). MOZ USSR, Moscow (in Russian).
- Afinogenova, A.G., Darovskaya, E.N., 2011. Mikrobnye bioplenki ran: Sostoyanie voprosa [Microbial biofilms of wounds: status of the issue]. *Travmatologia i Ortopedia Rossii* 61(3), 119–125 (in Russian).
- Carpentier, B., Cerf, O., 1993. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J. Appl. Bacteriol.* 75, 499–511.
- Chebotar, I.V., Talanin, E.A., Konchackova, E.D., 2010. Noviy metod kolichestvennogo ucheta kokkov v nadkлетochnih obrazovaniyah – klasterah i bioplenke [New method of the coccus quantitative consideration in the supracellular formations – clusters and biofilm]. *Microbiology* 3, 11–17 (in Russian).
- Chernjavsky, V.I., 2013. Bacterialnie bioplenki i infekcii (lekcii) [Bacterial biofilms and infection (lecture)]. *Annals of Mechnikov Institute* 1, 86–90 (in Russian).
- Donlan, R.M., Costerton, J.W., 2002. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15(2), 167–193.
- Golub, A.V., 2012. Bacterial biofilms – a new therapeutic target? *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy* 14(1), 23–29.
- Gomes, F., Teixeira, P., Cerca, N., Azeredo, J., Oliveira, R., 2011. Effect of farnesol on structure and composition of *Staphylococcus epidermidis* biofilm matrix. *Curr. Microbiol.* 63(4), 564–578.
- Gostev, V.V., Sidorenko, S.V., 2010. Bacterialnie bioplenki i infekcii [Bacterial biofilms and infections]. *Jurnal Infekologii* 3(2), 4–15 (in Russian).
- Hall-Stoodley, L., Hall-Stoodley, P., 2009. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell. Microbiol.* 11(7), 1034–1043.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T. (Eds.), 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Ilyina, T.S., Romanova, Y.M., Hinzburh, A.L., 2004. Bioplenki kak sposob sushchestvovaniya bakterii v okruzhaiushei srede i orhanisme hoziaina: Fenomen, heticheskii control i sistemi rehuliacii ih razvitiia [Biofilms as a way of existence of bacteria in the environment and the host organism: The phenomenon, the genetic control system and the regulation of their development]. *Genetica* 40, 1–12 (in Russian).
- Lemon, K.P., Earl, A.M., Vlamakis, H.C., Aguilar, C., Kolter, R., 2003. Biofilm development with an emphasis on *Bacillus subtilis*. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 322(5), 11–16.
- Lewis, K., 2005. Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry* 70(2), 327–336.
- Mah, T.F., Pitts, B., Pellock, B., Walker, G.C., Stewart, P.S., O'Toole, G.A., 2003. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* 426(5), 306–310.
- Monroe, D., 2007. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilm. *PLOS Biol.* 5, 1–4.
- Nikolaev, Y.A., Plakunov, V.K., 2007. Bioplenka – “gorod mikrobov” ili analog mnogokletochnogo organizma? [Biofilm – “city of microbes” or an analogue of multicellular organisms?]. *Microbiology* 76(2), 149–163 (in Russian).
- Olson, M.E., Ceri, H., Morck, D.W., Buret, A.G., Read, R.R., 2002. Biofilm bacteria: Formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can. J. Vet. Res.* 66(5), 86–92.
- Qu, Y., Daley, J.A., Istivan, S.T., Garland, M.S., Deighton, A.M., 2010. Antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from very low birth weight babies: Comprehensive comparisons of bacteria at different stages of biofilm formation. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 9(16), 345–367.
- Smirnova, T.A., Didenko, L.V., Andreev, A.L., Alekseeva, N.V., Stepanova, T.V., Romanova, Y.M., 2008. Elektronno-mikroskopicheskoe izuchenie bioplenok, obrazuemikh bakteriyami *Burkholderia cepacia* [Electron microscopic study of *Burkholderia cepacia* biofilms]. *Microbiology* 77(1), 63–70 (in Russian).
- Smirnova, T.A., Didenko, L.V., Azizbekyan, R.R., Romanova, Y.M., 2010. Strukturno-funkcionalnaya harakteristika bacterialnih bioplenok [Structural and functional characteristics of bacterial biofilms]. *Microbiology* 79(4), 435–446 (in Russian).
- Tets, V.V., Knorring, G.Y.U., Artemenko, N.K., Zaslavskaya, N.V., Artemenko, K.L., 2004. Vlianie ekzogennih proteoliticheskikh fermentov na bakterii [Impact of exogenic proteolytic enzymes on bacteria]. *Antibiotics and Chemotherapy* 9, 12–13 (in Russian).
- Tetz, V.V., 1996. The effect of antimicrobial agent and mutagen on bacterial cells in colonies. *Med. Microbiol. Lett.* 5, 426–436.
- Yelinov, N.P., 2009. Strukturirovannye i nestrukturirovannye formy syhestvovaniya mikromicetov v iskystvennih i estestvennih usloviyah [The structural and non-structural forms of existence of micromycetes in artificial and natural conditions]. *Problems in Medical Mycology* 3(11), 3–9 (in Russian).

Надійшла до редколегії 21.04.2014



УДК 577.125:591.436

Інтенсивність окисних процесів у мікросомній фракції печінки щурів за умов різного забезпечення поліненасиченими жирними кислотами

О.В. Кеца, М.В. Зазулик, М.В. Хімчак

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича, Чернівці, Україна

Досліджено вплив жирних композицій раціону з різним умістом поліненасичених жирних кислот (ПНЖК) родин ω -6 і ω -3 на інтенсивність окисних процесів у мікросомній фракції печінки щурів. Чотиритижневе додавання до раціону тварин лише ω -6 ПНЖК зумовлює підвищення пероксидного окислення ліпідів і окислювальної модифікації протеїнів у мікросомній фракції печінки щурів порівняно з контрольною групою тварин. Використання високих доз ω -3 ПНЖК (ейкозапентаєнової (ЕРА) та докозагексаєнової кислот (ДНА)) не впливає на інтенсивність вільнорадикального окислення ліпідів і протеїнів. Відсутність у раціоні тварин ПНЖК сприяє підвищенню інтенсивності вільнорадикальних процесів у мікросомній фракції печінки щурів.

Ключові слова: поліненасичені жирні кислоти; ліпопероксидація; окислювальна модифікація білків; мікросомна фракція; печінка

Oxidation process intensity in microsomal fraction of rat liver under conditions of different supplementation with polyunsaturated fatty acids

O.V. Ketsa, M.V. Zazulyk, M.V. Himchak

Yuri Fedkovich Chernivtsy National University, Chernivtsy, Ukraine

The effect of fat compositions with the varying ratio of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) of families ω -3 and ω -6 on oxidation process intensity in microsomal fraction of rat liver has been investigated. The aim of the study was to investigate the level of markers of oxidative modification of lipids and proteins in microsomal fraction of rat liver. Fat components in the experiment diets were presented by sunflower oil, soybean oil and fish oil. Rats were fed using one of the following 5 diets for the period of 4 weeks: 1) AIN-93 diet with 7% sunflower oil and fish oil, with the inclusion of linoleic acid, eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in the ratio of ω -6: ω -3 – 7:1 (control diet); 2) AIN-93 diet with 7% soybean oil, with the inclusion of linoleic acid and α -linolenic acid in the ratio of 7:1; 3) the diet containing only ω -6 PUFAs; 4) the diet containing only ω -3 PUFAs; 5) the diet without PUFAs. The fatty acid compositions of the diets were analysed by gas chromatography. We measured the primary and secondary lipoperoxidation products, proteins carbonyl derivatives and SH-groups of proteins. It was shown that inclusion of linoleic acid and α -linolenic acid in the ratio of 7:1 or ω -6 PUFAs into the animal diet increased lipid peroxidation in microsomal fraction of the rat liver as compared with the control group. Only ω -6 PUFAs increased the oxidative modification of proteins in microsomal fraction of the rat liver as compared with the control rat group. High dose of ω -3 PUFAs – eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid had no influence on free radical oxidation of lipids and proteins. Using the diet without PUFAs increased oxidation process intensity in microsomal fraction of rat liver. According to our study, ω -6 PUFAs increased the oxidative modification of lipids and proteins in microsomal fraction of the rat liver. ω -3 PUFAs, in particular, eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid, increased lipid and protein resistance to oxidative modification in microsomal fraction of the rat liver.

Keywords: fatty acids; lipoperoxidation; oxidative modification of proteins; microsomal fraction; liver

Поліненасичені жирні кислоти (ПНЖК) в організмі відіграють важливу роль у реалізації численних фізіологічних і біохімічних процесів. Організм використовує властивості ненасичених зв'язків під час синтезу важливих регуляторних сполук, що робить ПНЖК незамінними компонентами їжі (Jump et al., 2012; Roberts and Milne, 2009; Lawson et al., 2006). Серед ПНЖК треба окремо виділити родини омега-6 (ω -6) та омега-3 (ω -3). Біологічно активні речовини, що утворюються при метаболізмі ω -6 і ω -3 ПНЖК, відіграють важливу роль у фізіологічних процесах організму, проте нерідко володіють протилежними властивостями (Simopoulos, 2008; Gillies et al., 2012). Враховуючи, що харчові джерела ω -3 ПНЖК досить обмежені, а співвідношення ω -6/ ω -3 ПНЖК у раціоні людини складає 20:1, порівняно з рекомендованим від 7:1 до 1:1 (Simopoulos, 2006; Wertz, 2009), необхідно збагачувати раціон ω -3 ПНЖК. Невивченими залишаються питання впливу різних доз і видів ПНЖК на організм, а також термін їх уживання та уникнення небажаних наслідків.

ПНЖК в організмі у першу чергу піддаються атаці активними формами кисню, що викликає утворення різноманітних первинних і вторинних продуктів, які виконують важливі фізіологічні функції в організмі: активують процеси проліферації та диференціації клітин, беруть участь у регуляції проникливості клітинних мембран, транспорті іонів, підтриманні гомеостазу, формуванні резистентності організму (Chernyavsky et al., 2006; Guillou et al., 2010; Liu et al., 2013). Проте надлишкова інтенсифікація ланцюгових вільнорадикальних реакцій пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ) супроводжується вивільненням жирних кислот, збільшенням проникливості мембран, загибеллю органел і клітин (Tanito et al., 2009; Bazan et al., 2011; Wu et al., 2011).

Процеси метаболізму ПНЖК в організмі значною мірою залежать від ензиматичних систем, локалізованих в ендоплазматичному ретикулумі (ЕПР) (Bryzgina et al., 2001; Yumino et al., 2002). ПНЖК, що входять до складу фосfolіпідів, є основою ліпідного матриксу біомембран і зумовлюють структурно-функціональні властивості протеїнових компонентів мембран внутрішньоклітинних органел (Hardman et al., 2002; Simopoulos, 2006). Зміни жирнокислотного складу мембран можуть впливати на конформацію протеїнів і, як наслідок, на їх функціональні властивості. З іншого боку, введення в організм різних видів ПНЖК може бути ланкою вільнорадикальних процесів, які виражатимуться в ініціації окислювальної модифікації протеїнів (Mitic-Oka et al., 2001; Feillet-Coudray et al., 2013; Lee et al., 2013). Сьогодні залишаються недостатньо вивченими характер та механізми змін структурних компонентів мембран ЕПР за умов диференційного застосування ω -6 і ω -3 ПНЖК.

Мета роботи – з'ясувати інтенсивність вільнорадикального окислення ліпідів і протеїнів у мікросомній фракції печінки щурів за умов різної забезпеченості ω -6 та ω -3 поліненасиченими жирними кислотами.

Дослідження проводили на білих безпородних щурах масою 90–110 г, які протягом 4 тижнів перебували на напівсинтетичному раціоні віварію, складеному на основі дієти AIN-93 (Reeves et al., 1993).

Тварин поділено на такі групи: I – щури, які отримували ω -6 і ω -3 ПНЖК у співвідношенні 7:1 (контроль). При цьому джерелом лінолевої кислоти (LA) слугувала соняшникова олія, а ейкозапентаєнної (ЕРА) та докозагексаєнної (ДНА) – риб'ячий жир; II – тварини, до раціону яких додавали соєву олію, що містила LA і α -ліноленову кислоту (α -LNA) у співвідношенні 7:1 (Reeves et al., 1993); III – тварини, які отримували лише ω -6 ПНЖК; IV – щури, які отримували високі дози ω -3 ПНЖК (ЕРА – 600 і ДНА – 400 мг/кг маси тварин на добу); V – тварини, які перебували на раціоні, позбавленому ПНЖК.

Евтаназію тварин здійснювали під легким ефірним наркозом на 28-му добу з початку дієти. Виділення мікросомної фракції проводили методом диференційного центрифугування. Інтенсивність процесів ПОЛ у мікросомній фракції печінки оцінювали за визначенням первинних (кетодієнів і спряжених трієнів) і вторинних (ТБК-активних) продуктів за методикою (Volchegorsky et al., 1989) та (Gavrilov et al., 1987), відповідно. Вміст первинних продуктів ПОЛ виражали у E_{278} /мг білка. Визначення вмісту ТБК-активних продуктів у мікросомній фракції проводили за розрахунком вмісту основного складового – малонового альдегіду (МА) та виражали в ммоль/мг білка.

Процеси окислювальної модифікації протеїнів досліджували за визначенням вмісту карбонільних похідних і вільних SH-груп. Вміст карбонільних похідних у суспензії мікросом визначали за методикою (Zaytseva and Shardenko, 2012). Визначення кількості вільних SH-груп протеїнів мікросом проводили методом, заснованим на їх взаємодії з 5,5'-дитіобіс-2-нітробензойною кислотою. Інтенсивність забарвлення реєстрували спектрофотометрично при 412 нм (Murphy and Kehrer, 1989). Вміст карбонільних похідних і вільних протеїнових SH-груп виражали в нмоль/мг білка. Порівняння вибірок проводили з використанням *t*-критерію Стьюдента, достовірними вважали відмінності при $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення

У мікросомній фракції печінки щурів, до раціону яких протягом 4 тижнів додавали LA: α -LNA вміст кетодієнів і спряжених трієнів (рис. 1) та ТБК-активних продуктів (рис. 2) збільшувався в 1,4 та 1,3 рази, відповідно, порівняно з контрольною групою тварин, які поряд з LA отримували ЕРА і ДНА ПНЖК.

Інтенсифікація процесів ліпопероксидації в мікросомній фракції печінки щурів за умов застосування ω -6 ПНЖК, зокрема LA, може викликати порушення цілісності мембран ЕПР та зміну функціонування компонентів електронтранспортного ланцюга мікросом, наслідком чого може бути посилення генерації активних форм кисню компонентами монооксигеназної системи (Marchenko and Ketsa, 2012). У нормі α -LNA шляхом

подовження та десатурації перетворюється на EPA і DHA, а LA – на арахідонову кислоту. Одночасне введення LA та α -LNA може викликати конкуренцію цих ПНЖК за ензиматичні системи їх метаболізму, зокрема за Δ -6 десатуразу, яка бере участь в утворенні подвійних зв'язків у молекулі жирної кислоти (Guillou et al., 2010; Serhiyenko et al., 2011). Отже, одночасне застосування LA і α -LNA викликає підвищення процесів ліпопероксидації в мітосомній фракції печінки, а заміна в дієті α -LNA на EPA і DHA зумовлює нормальний перебіг протікання процесів ПОЛ.

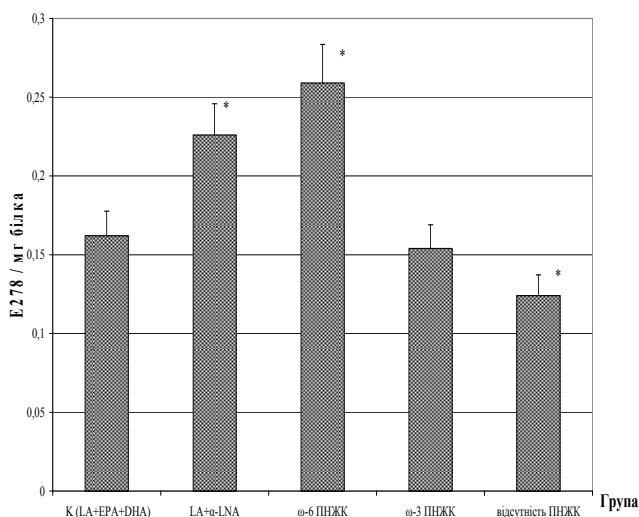


Рис. 1. Вміст кетодієнів і спряжених трієнів у мітосомній фракції печінки щурів за умов різного забезпечення поліненасиченими жирними кислотами:

К (LA+EPA+DHA) – контрольна група тварин, які отримували лінолеву, ейкозапентаєнову та докозагексаєнову кислоти; LA+ α -LNA – щури, які отримували лінолеву та α -ліноленову кислоти; ω -6 ПНЖК – щури, які отримували лише ω -6 ПНЖК; ω -3 ПНЖК – щури, які отримували високі дози ω -3 ПНЖК; * – статистично достовірна різниця порівняно з контрольними показниками ($P < 0,05$)

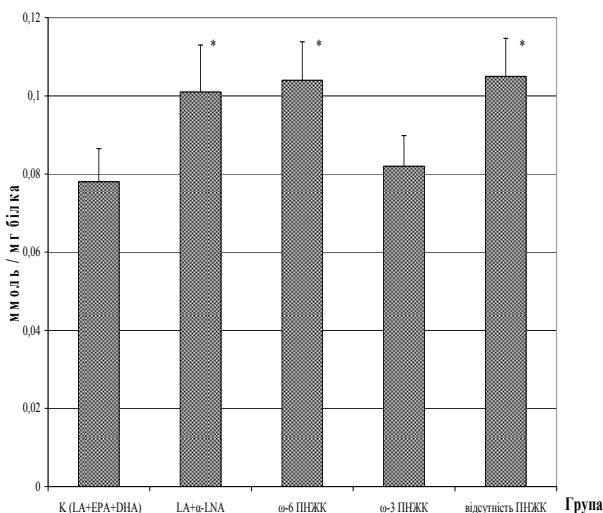


Рис. 2. Вміст ТБК-активних продуктів у мітосомній фракції печінки щурів за умов різного забезпечення поліненасиченими жирними кислотами: назви груп див. рис. 1

Аналіз даних групи тварин, до раціону яких додавали тільки ω -6 ПНЖК, показав посилення процесів ліпопероксидації у мітосомній фракції печінки. Вміст кетодієнів і спряжених трієнів підвищувався у 1,6 раза (рис. 1), а ТБК-активних продуктів – у 1,4 раза (рис. 2) порівняно з показниками, характерними для контрольної групи тварин. Утримання щурів на раціоні, збагаченому ω -3 ПНЖК (зокрема EPA і DHA), не викликає змін вмісту первинних і вторинних продуктів ПОЛ у мітосомній фракції печінки щурів порівняно з контролем (див. рис. 1 і 2).

Імовірно, збагачення раціону щурів ω -3 ПНЖК зумовлює модифікацію жирнокислотного складу фосфоліпідів клітинних мембран у бік збільшення в них ПНЖК із родини ω -3 та зменшення ω -6 ПНЖК, що сприяє підвищенню стійкості до окислення через пригнічення вільнорадикальних процесів і посилення ферментативної ланки антиоксидантного захисту (Kukoba et al., 2005). Наслідком такої зміни у жирнокислотному складі фосфоліпідів може бути стабілізація мембран ЕПР.

Отже, збагачення дієти ω -6 ПНЖК викликає збільшення вмісту первинних та вторинних продуктів ПОЛ, тоді як ω -3 ПНЖК тваринного походження проявляють антиоксидантний ефект у мітосомній фракції печінки, стабілізуючи процеси ПОЛ.

У групи щурів, які протягом 4 тижнів не отримували взагалі ПНЖК, вміст кетодієнів і спряжених трієнів у мітосомній фракції печінки зменшувався в 1,3 раза, а ТБК-активних продуктів підвищувався у 1,4 раза порівняно з контрольною групою. Одна із причин зниження первинних продуктів ПОЛ – дефіцит субстрату для процесів ліпопероксидації. Водночас, підвищення ТБК-активних продуктів може бути наслідком окислення жирних кислот, що входять до складу мембран, які відразу ж перетворюються на вторинні продукти (Murthy et al., 2002).

Вільнорадикальне окислення ліпідів мембран ЕПР може викликати окислювальну модифікацію мембранних протеїнів і ензимів, оскільки саме фосфоліпіди стабілізують їх у структурно-функціональній конформації. ПОЛ, як модифікатор мітосомних фосфоліпідів, може виступати в ролі фактора, який викликає зміни конформації мембран, і регулювати тим самим активність ряду мембранозв'язаних ензимів мітосом (Marchenko and Ketsa, 2012).

Результати проведених досліджень показали, що вживання ω -3 ПНЖК рослинного походження – α -LA поряд із введенням LA (ω -6) не спричиняє зміни вмісту карбонільних похідних (рис. 3) і сульфгідрильних груп (рис. 4) протеїнів у мітосомній фракції печінки щурів порівняно з показниками контрольної групи. Імовірно, процеси окислювальної модифікації протеїнів у мітосомній фракції печінки щурів не залежать від виду ω -3 ПНЖК в умовах чотиририжневого введення в організм комплексу ω -6/ ω -3 ПНЖК у співвідношенні 7:1. З іншого боку, до 15% α -LA, що потрапляє до організму, може перетворитися на EPA і DHA (Simopoulos, 2006; Guillou et al., 2010), що можливо і є причиною однакового ефекту досліджуваних ω -3 ПНЖК на процеси окислювальної модифікації протеїнів.

Аналіз результатів досліджень групи тварин, які отримували лише ω -6 ПНЖК, показав підвищення вмісту протеїнових карбонільних похідних в 1,4 раза (рис. 3)

і зниження рівня сульфгідрильних груп протеїнів в 1,7 раза (рис. 4) в мікросомній фракції печінки щурів порівняно з показниками, характерними для контрольної групи. Імовірно, ініціація вільнорадикальних процесів в організмі відбувається під час окислення ω -6 ПНЖК у реакціях, які каталізуються циклооксигеназами, ліпоксигеназами та цитохромом P₄₅₀. Субстратом для цих ензимів є неестерифікована арахідонова кислота, під час ензиматичного окислення якої утворюються пероксидні та вільнорадикальні ейкозаноїди, що генерують активні форми кисню (Roberts and Milne, 2009; Wertz, 2009).

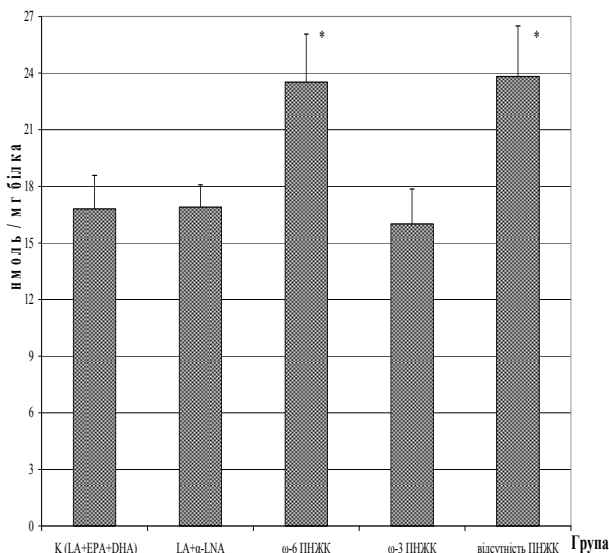


Рис. 3. Вміст карбонільних похідних протеїнів мікросомної фракції печінки щурів за умов різного забезпечення поліненасиченими жирними кислотами

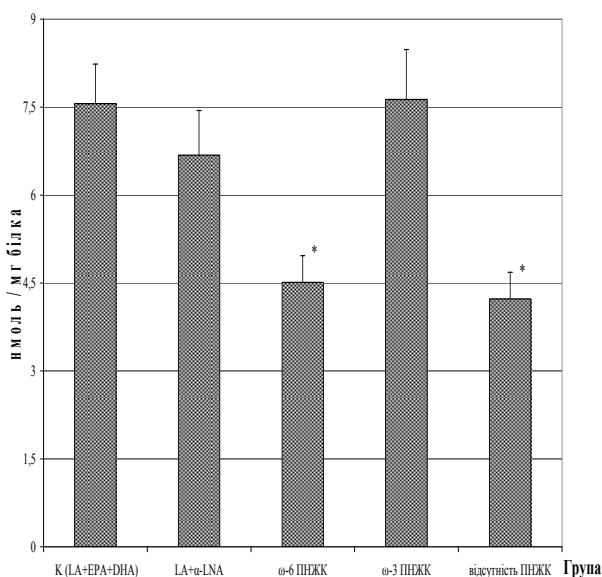


Рис. 4. Вміст сульфгідрильних груп протеїнів мікросомної фракції печінки щурів за умов різного забезпечення поліненасиченими жирними кислотами

Окислення протеїнів мікросомної фракції печінки може викликати інактивацію цитохрому P₄₅₀ – ензиму, що бере участь не лише в біотрансформації ксенобіотиків, а й у метаболізмі ПНЖК. Відхилення в роботі монооксигена-

зної системи може зумовити додаткову генерацію активних форм кисню (Marchenko and Ketsa, 2012).

Чотиририжневе додавання до раціону препаратів, збагачених ω -3 ПНЖК, не викликає змін вмісту карбонільних похідних і SH-груп протеїнів мікросомної фракції печінки порівняно з показниками контрольної групи щурів (див. рис. 3 та 4). Стабілізація окислювальної модифікації протеїнів за дії ω -3 ПНЖК може бути наслідком стабілізації мембран ЕПР та пригнічення утворення вільних радикалів клітинними генераторами (Kukoba et al., 2005).

Повна відсутність у раціоні щурів ПНЖК викликає підвищення в 1,4 раза протеїнових карбонільних похідних (див. рис. 3) і зниження в 1,8 раза сульфгідрильних груп протеїнів (див. рис. 4) у мікросомній фракції печінки щурів порівняно з показниками контрольної групи тварин на 28-му добу експерименту. Імовірно, нестача в раціоні ПНЖК зумовлює дестабілізацію та дисфункцію мембран ЕПР не тільки за рахунок зміни жирнокислотного складу мембран, а і за рахунок зміни їх фізико-хімічних властивостей – мікрів'язкості, текучості, мембранного потенціалу. Вказані зміни мембран викличуть інтенсифікацію окислення протеїнів, а це, у свою чергу, – зміну активностей мембранозв'язаних ензимів (Marchenko and Ketsa, 2012).

Висновки

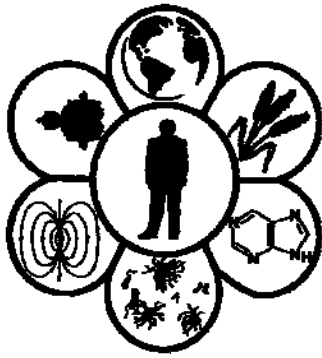
ω -6 ПНЖК ініціюють процеси вільнорадикального окислення ліпідів і протеїнів мікросомної фракції печінки щурів, що виражається у підвищенні рівня первинних і вторинних продуктів ПОЛ, протеїнових карбонільних похідних і зниженні вмісту SH-груп протеїнів. Збагачення раціону щурів ω -3 ПНЖК підвищує стійкість ліпідів і мембранозв'язаних протеїнів мікросомної фракції печінки щурів до вільнорадикального окислення.

Бібліографічні посилання

- Bazan, N.G., Musto, A.E., Knott, E.J., 2011. Endogenous signaling by omega-3 docosahexaenoic acid-derived mediators sustains homeostatic synaptic and circuitry integrity. *Mol. Neurobiol.* 44, 216–222.
- Bryzgina, T.M., Alekseyuk, L.I., Martinova, T.V., Sukhina, V.S., Alexeyeva, I.N., 2001. Vplyv blokatoriv cyklooksygenaznogo ta lipooksygenaznogo shljahiv metabolizmu arahidonovoi' kysloty na imunnu vidpovid', aktyvnist' monoooksygenaznoi' systemy i perekysnogo okyslennja lipidiv u selezinci ta pechinci myshej [The effects of inhibitors of cyclooxygenase and lipoxygenase pathways of oxidation of arachidonic acid on the immune response, and the activity of monoxygenase system and lipid peroxidation in mice]. *Physiol. J.* 47, 46–52 (in Ukrainian).
- Chernyavsky, P.V., Datsenko, Z.M., Moiseyeva, L.G., Kanivets, N.V., Kozulina, O.P., Boroda, A.M., Abakumova, O.S., 2006. Reguljacija vnutrishn'oklitynnogo obminu lipidiv preparatom ω -3-fosfolipidiv iz mors'kyh organizmiv pry deficyti esenci-jnyh zhyrnyh kyslot u shhuriv [Regulation of intracellular lipid metabolism by the preparation of ω -3 phospholipids from marine organisms under deficit of essential fatty acid in rats]. *Ukr. Biochem. J.* 78, 101–114 (in Ukrainian).
- Feillet-Coudray, C., Aoun, M., Fouret, G., Bonafos, B., Ramos, J., Casas, F., Cristol, J.P., Coudray, C., 2013. Effects of

- long-term administration of saturated and n-3 fatty acid-rich diets on lipid utilization and oxidative stress in rat liver and muscle tissues. *Br. J. Nutr.* 110(10), 1789–1802.
- Gavrilov, V.B., Gavrilova, A.R., Mazhul, L.M., 1987. Analiz metodov opredelenija produktov perekysnogo oksylenija lypidov v syvorotke krovi po testu s tyobarbuturovoj kyslotoj [Analysis of the procedures for estimation of lipid peroxidation products using thiobarbituric acid test]. *Quest. Med. Chem.* 33, 118–122 (in Russian).
- Gillies, P.J., Bhatia, S.K., Belcher, L.A., Hannon, D.B., Thompson, J.T., Heuvel, J.P.V., 2012. Regulation of inflammatory and lipid metabolism genes by eicosapentaenoic acid-rich oil. *J. Lipid Res.* 53, 1679–1689.
- Guillou, H., Zdravec, D., Martin, P.G., Jacobsson, A., 2010. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Prog. Lipid Res.* 49, 186–199.
- Hardman, W.E., Munoz, J. Jr, Cameron, I.L., 2002. Role of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in omega-3 fatty acids induced suppression of breast cancer xenograft growth in mice. *Cancer Cell Int.* 2, 10–19.
- Jump, D.B., Depner, C.M., Tripathy, S., 2012. Omega-3 fatty acid supplementation and cardiovascular disease. *J. Lipid Res.* 53, 2525–2545.
- Kukoba, T., Shysh, A., Moibenko, A.A., Kotsjuruba, A., Kharченко, O., 2005. Vplyv ω -3 polinenasychenykh zhyrnykh kyslot na perekysne oksylenija lipidiv [The effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids on lipid peroxidation]. *Physiol. J.* 51, 26–32 (in Ukrainian).
- Lawson, J.A., Kim, S., Powell, W.S., FitzGerald, G.A., Rokach, J., 2006. Oxidized derivatives of ω -3 fatty acids: Identification of IPF3 α -VI in human urine. *J. Lipid Res.* 47, 2515–2524.
- Lee, L.K., Shahar, S., Rajab, N., Yusoff, N.A.M., Jamal, R.A., Then, S.M., 2013. The role of long chain omega-3 polyunsaturated fatty acids in reducing lipid peroxidation among elderly patients with mild cognitive impairment: A case-control study. *J. Nutr. Biochem.* 24, 803–808.
- Liu, X., Xue, Y., Liu, C., Lou, Q., Wang, J., Yanagita, T., Xue, C., Wang, Y., 2013. Eicosapentaenoic acid-enriched phospholipid ameliorates insulin resistance and lipid metabolism in diet-induced-obese mice. *Lipids Health Dis.* 12, 109–119.
- Marchenko, M.M., Ketsa, O.V., 2012. Functional activity of the NADH-dependent reductase system in liver and Guerin's carcinoma microsomal fraction in rats exposed to preliminary irradiation. *Biochem. (Mosc.)* 6B, 321–327.
- Marchenko, M.M., Ketsa, O.V., 2012. Generacija superoksydnogo radykala komponentamy monooksygenaznoi systemy pechinky poperedn'o oprominyenykh shhuriv-puhlynonosii'v [Generation of superoxide anion-radical in the liver monooxygenase system of preliminary radiation-exposed tumor-bearing rats]. *Ukr. Biochem. J.* 84, 95–102 (in Ukrainian).
- Mitic-Oka, J., Simic, T., Pljesa, M., Stupar, N., Turkovic, S., 2001. Oxidative modification of plasma proteins in different stages of chronic renal failure. *Med. Biol.* 8, 1–5.
- Murphy, M.E., Kehrer, J.P., 1989. Oxidation state of tissue thiol groups and content of protein carbonyl groups in chickens with inherited muscular dystrophy. *Biochem. J.* 260, 359–364.
- Murthy, M., Hamilton, J., Greiner, R.S., Moriguchi, T., Salem, N., Kim, H.-Y., 2002. Differential effects of ω -3 fatty acid deficiency on phospholipids molecular species composition in the rat hippocampus. *J. Lipid Res.* 43, 611–617.
- Reeves, P.G., Nielsen, F.H., Fahey, G.C., 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* 123, 1939–1951.
- Roberts, L.J., Milne, G.L., 2009. Isoprostanes. *J. Lipid Res.* 50, 219–223.
- Serhiyenko, V.A., Serhiyenko, A.A., Efimov, A.S., 2011. Dovgolancjugovi ω -3 polunenasycheni zhyrni kysloty: Sercevo-sudynni zahvorjuvannja i cukrovij diabet [Long-chain ω -3 polyunsaturated fatty acids: Cardiovascular diseases and type 2 diabetes mellitus]. *J. NAMN Ukr.* 17, 353–367 (in Ukrainian).
- Simopoulos, A.P., 2006. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: Nutritional implications for chronic diseases. *Biomed. Pharmacother.* 60, 502–507.
- Simopoulos, A.P., 2008. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic disease. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 233, 674–688.
- Tanito, M., Brush, R.S., Elliott, M.H., Wicker, L.D., Henry, K.R., Anderson, R.E., 2009. High levels of retinal membrane docosahexaenoic acid increase susceptibility to stress-induced degeneration. *J. Lipid Res.* 53, 807–819.
- Volchegorsky, I.A., Nalimov, A.G., Yarovinsky, B.G., Lifshitz, R.I., 1989. Sopotavlenie razlichnykh podhodov k opredeleniju produktov perekysnogo okislenija lipidov v heptan-izopropanol'nykh jekstraktah krovi [Different means of lipid peroxidation products estimation in heptane-isopropanol extracts of blood]. *Quest. Med. Chem.* 35, 127–131 (in Russian).
- Wertz, P.W., 2009. Essential fatty acids and dietary stress. *Toxicol. Ind. Health.* 25, 279–283.
- Wu, J.H., Lemaitre, R.N., Imamura, F., King, I.B., Song, X., Spiegelman, D., Siscovick, D.S., Mozaffarian, D., 2011. Fatty acids in the *de novo* lipogenesis pathway and risk of coronary heart disease: The cardiovascular health study. *Am. J. Clin. Nutr.* 94, 431–438.
- Yumino, K., Kawakami, I., Tamura, M., Hayashi, T., Nakamura, M., 2002. Paraquat- and diquat-induced oxygen radical generation and lipid peroxidation in rat brain microsomes. *J. Biochem.* 131, 565–570.
- Zaytseva, O.V., Shardenko, S.G., 2012. Modyfikacija spektrofotometrychnogo metodu vyznachennja karbonil'nykh grup protei'niv. [Modification of spectrophotometric method of determination of protein carbonyl groups]. *Ukr. Biochem. J.* 84, 112–116 (in Ukrainian).

Надійшла до редколегії 18.02.2014



УДК 611.013+575

Доімплантаційний розвиток ембріонів жінок старшого репродуктивного віку

О.В. Чапля^{1,2}, Ю.В. Гонтар², Н.М. Білько¹

¹Центр молекулярних та клітинних досліджень

Національного університету «Києво-Могилянська академія», Київ, Україна

²ТОВ «Інститут генетики репродукції», Київ, Україна

Досліджували морфокінетичні характеристики еуплоїдних і хромосомно незбалансованих ембріонів, отриманих у випадку запліднення *in vitro* ооцитів 58 молодих жінок і 28 пацієток старшого репродуктивного віку. Частка ембріонів із нормальним хромосомним набором із віком жінки зменшувалася до 39,9% у групі ембріонів молодих пацієток і 25,2% у когорті зразків жінок старшого репродуктивного віку. За результатами оцінки темпів розвитку нормальних та аберантних ембріонів встановлено, що еуплоїдні ембріони розвивалися швидше, а в разі пролонгованого культивування формують бластоцисти у півтора раза частіше. Однак суттєвих відмінностей за морфокінетичними характеристиками зразків з аналогічними хромосомними наборами між досліджуваними віковими групами не виявлено. Зростання відносної кількості хромосомно незбалансованих ембріонів на фоні сталої дії природного добору на доімплантаційному етапі розвитку може бути однією з передумов підвищення вірогідності народження дитини з генетичними аномаліями у жінок старшого репродуктивного віку.

Ключові слова: доімплантаційний розвиток; хромосомна аномалія; ембріон; старший репродуктивний вік

Preimplantation development of embryos in women of advanced maternal age

O.V. Chaplia^{1,2}, J.V. Gontar², N.M. Bilko¹

¹Centre of Molecular and Cell Research, National University of Kyiv-Mohyla Academy, Kyiv, Ukraine

²Reproductive Genetics Institute, Kyiv, Ukraine

In order to reveal the influence of genetic component on the early embryo development, the retrospective study of morphokinetic characteristics of 717 embryos subjected to preimplantation genetic testing was conducted. Blastomere biopsy for FISH-based preimplantation genetic screening of 7 chromosomes was performed on the third day of culture, while embryo developmental potential and morphological features at the cleavage and blastulation stage were studied regarding maternal age particularly in the group of younger women and patients older than 36. Results of genetic testing revealed that euploid embryos rate gradually decreased with maternal age comprising 39.9% in young women group and 25.3% of specimen belonging to elder patients. At the cleavage stage, morphological characteristics of aneuploid and euploid embryos didn't differ significantly regardless of the age of patients that could be accounted for the transcriptional silence of embryo genome till the third day of its development. However, in case of prolonged culture chromosomally balanced embryos rarely faced developmental arrest (in 7.9%) and formed blastocysts half more frequently compared to aberrant embryos (respectively 75.6 versus 49.8%). Nevertheless, no substantial difference was found between blastocyst formation rate among embryos with similar genetic component regardless of the maternal age. Taking into consideration high rate of chromosomally unbalanced embryos specific to patients of advanced maternal age, the relative proportion of aneuploid blastocysts was significantly higher in this group of embryos. Thus, without genetic screening there is a possibility of inaccurate selection of embryos for women of advanced reproductive age for transfer procedure even in case of prolonged culture. Consequently, increase of aneuploid embryos frequency associated with permanent preimplantation natural selection effectiveness along with the postimplantation natural selection failure may be the cause of elevated risk of chromosomally abnormal child birth for advanced age women after natural conception, as well as after assisted reproduction therapy.

Keywords: preimplantation development; chromosome abnormality; embryo; advanced maternal age

Вступ

Численні дослідження доімплантаційного розвитку тварин дозволили встановити ключові етапи раннього онтогенезу ссавців, однак видоспецифічні особливості перебігу даних процесів суттєво обмежують екстраполяцію отриманих даних на ранній онтогенез людини (Niakan, 2012). Розробка методики запліднення *in vitro* та її наступне широке застосування в клінічній практиці з метою подолання безпліддя дали можливість спостерігати за найбільш ранніми етапами доімплантаційного ембріогенезу людини. Сингамія материнського та батьківського проядер у процесі запліднення супроводжується їх генетичним і епігенетичним репрограмуванням до ембріонального стану, після чого відбувається серія клітинних поділів із формуванням однакових за розміром бластомерів. Паузи між окремими мітозами дуже короткі, кількість клітин швидко зростає без збільшення їх розмірів, а відтак перші три доби розвитку ембріона називають дробленням (Niakan, 2012; Sudheer, 2007). На даній стадії ембріон перебуває у стані транскрипційного спокою, адже активація новосформованого геному відбувається лише на третій день розвитку, на стадії 4–8 клітин (Taylor, 1997; Tesarik, 2004). Відтак, раннє дробіння ембріона людини цілковито залежить від запасів ооцита, і від початку синтезу білків новоствореного організму здійснюється на матриці материнських мРНК, присутніх у цитоплазмі яйцеклітини (Sudheer, 2007).

Успішна активація ембріонального геному – обов'язкова передумова процесу компактизації, при якому клітини ембріона тісно взаємодіють завдяки формуванню численних щільних контактів. У результаті контури окремих бластомерів поступово зникають, а ембріон переходить до стадії морули (Prados, 2012). На наступному етапі (112–144 год розвитку) всередині скупчення клітин формується заповнена рідиною порожнина – бластоцель, яка позначає перехід до первинного клітинного диференціювання ембріона. У процесі бластуляції частина клітин ембріона утворює внутрішньоклітинну масу (ВКМ), яка у майбутньому сформує власне плід, тоді як інші клітини, що сплющуються та огортають бластоцель, відносять до трофектодерми – предтечі екстраембріональних тканин (Wennekamp, 2013). Перехід до наступних етапів розвитку ембріона відбувається у чітко визначені часові інтервали й, у разі молекулярних чи клітинних аномалій, перехід до наступної стадії розвитку ембріона блокується. Імплантація ембріона людини відбувається на сьому добу і лише за умови вилуплення бластоцисти з оболонки запліднення (Macklon, 2002). При цьому ВКМ поділяється на ранні епібласт і ендодерму, однак спостерігати за даними процесами *in vitro* уже неможливо.

Описаний перебіг подій у ранньому, доімплантаційному ембріогенезі людини сталий і в нормі не зазнає впливу індивідуальних батьківських факторів (Munne, 2007). Тобто послідовність ключових етапів раннього ембріогенезу людини не залежить від віку батьків і є однаковою для ембріонів, отриманих у разі запліднення ооцитів пацієток молодшого та старшого репродуктивного віку. У той же час вірогідність настання вагітності у жінок, старших 36 років, суттєво знижена у зв'язку з

поступовим зменшенням оваріального резерву та порушенням рецептивності ендометрію матки (Liu, 2012). Окрім того, віковозалежне виснаження яєчникового пулу може стати причиною підвищеної частоти формування анеуплоїдних ооцитів та, як наслідок, ембріонів із кількісними хромосомними аномаліями у жінок старшого репродуктивного віку (Munne, 2005; Christopikou, 2013). Деякі вчені (Niakan, 2012) припускають, що з віком також порушуються процеси міжклітинних взаємодій і контролю мітотичного поділу, що може спричинити аномалії раннього ембріогенезу та послаблення негативної селекції аномальних ембріонів на доімплантаційних етапах розвитку. Таким чином, вивчення морфокінетичних характеристик ранніх ембріонів жінок, старших 36 років, дозволило б оцінити ефективність реалізації програми їх доімплантаційного розвитку, його залежність від хромосомного набору ембріонів і встановити передумови високого ризику народження дітей із хромосомними патологіями зростанням віку материнства.

Мета даної роботи – встановити частоти формування та особливості доімплантаційного розвитку хромосомно незбалансованих ембріонів, отриманих у разі запліднення ооцитів жінок старшого репродуктивного віку.

Матеріал і методи досліджень

У межах проведеного дослідження аналізували морфокінетичні та генетичні характеристики ембріонів, отриманих із липня 2010 по грудень 2012 року на базі клініки «Інститут генетики репродукції» (м. Київ) за умов застосування методу запліднення *in vitro* для лікування безпліддя. Протягом указанного періоду доімплантаційний генетичний скринінг хромосомних аномалій проведений для 717 ембріонів із 84 лікувальних циклів. Ембріони поділено на дві групи відповідно до віку обстежених пацієток. Порівняльну вибірку склали 558 зразків, отриманих у межах 58 процедур запліднення *in vitro* ооцитів молодих жінок, середній вік яких складав $29,8 \pm 2,3$ року (варіювання в межах 26–35 років). До основної групи дослідження віднесли 159 ембріонів жінок старшого репродуктивного віку (> 36 років). Середній вік пацієток в основній групі, що включала 28 лікувальних циклів, становив $39,26 \pm 2,5$ року та перебував у діапазоні 37–46 років. Усі обстежені пацієтки мали задовільний стан соматичного здоров'я та нормальний каріотип і для отримання більшої кількості ооцитів проходили гормональну стимуляцію суперовуляції.

Запліднення зрілих ооцитів, отриманих при пункції оваріальних фолікулів, здійснювали методом інтрацитоплазматичної ін'єкції сперматозоїда. Успішність проведеної процедури запліднення оцінювали через 16–18 год за формуванням другого полярного тільця у первітєльному просторі та наявністю двох пронуклеусів у цитоплазмі зиготи. Ембріони культивували у маркованих краплях живильного середовища (MediCult, Данія) протягом 120–144 год за 37°C та насичення повітря вуглекислим газом на рівні 6,0%.

На стадії дробіння, коли всі клітини ембріона є тотипотентними, а відтак здатні компенсувати втрачений матеріал (De Vos, 2009), один із бластомерів вилучали для проведення генетичного аналізу. Отримані клітини

обробляли гіпотонічним розчином (0,3% бичачий альбумін, 1% цитрат натрію), і після руйнування оболонки бластомера фіксували його ядро на скельці за допомогою суміші етанолу та оцтової кислоти у співвідношенні 3:1 (Velilla, 2002). Діагностику хромосомних аномалій ембріонів здійснювали методом флюоресцентної *in situ* гібридизації. Зразки денатурували за 69 °С та інкубували щонайменше 4 год у вологій камері за температури 37 °С. Постгібридаційна обробка передбачала промивання в 0,7 x SSC/0,4% NP-40 при 73 °С та 2 x SSC/0,1% NP-40 за кімнатної температури. Протокол дослідження включав два послідовні цикли гібридизації з використанням набору багатоклітинних проб до аутосом 13, 16, 18, 21, 22 (PB Multivision, Vysis, США) та суміші центромерних зондів до статевих хромосом X та Y (CEPX/CEPY, Vysis, США) (Munne, 1998). Оцінку сигналів проводили мікроскопіюванням у флюоресцентному світлі з використанням комп'ютерного забезпечення ISIS (MetaSystems, Німеччина) згідно з вимогами Європейської асоціації репродукції людини (Thornhill, 2005). Якщо чітко встановити кількість сигналів, що відповідали певній хромосомі, було неможливо, проводили додатковий третій раунд гібридизації з використанням проб до альтернативних локусів досліджуваних хромосом.

Контроль розвитку ембріонів проводили за збільшення x400 з періодичністю 24 год, починаючи з моменту оцінки успішності запліднення. Протягом перших трьох днів культивування оцінювали темпи їх поділу та відмічали наявність аномалій будови (Bączkowski, 2004; Fragouli, 2014). На четвертий день культивування відмічали ознаки компактизації клітин ембріона: завдяки утворенню численних щільних контактів, чіткість контурів окремих бластомерів втрачалася, що візуально нагадувало злиття клітин. Дане явище досягало максимуму на стадії морули, коли вирізнити окремі клітини ембріона було вже неможливо (Тао, 2004).

На стадії первинної клітинної диференціації, через 120–144 год культивування, імплантаційний потенціал ембріона оцінювали за класифікацією Gardner (табл. 1). Згідно з установленими морфологічними характеристиками зразка його відносили до відповідного класу якості. На п'ятий день культивування не більше ніж три еуплоїдні ембріони з найвищим морфологічними показниками переносили до порожнини матки реципієнтки за допомогою спеціального катетера. За умов значної кількості зразків, визнаних нормальними за результатами проведеної діагностики, їх решту кріоконсервували та зберігали у рідкому азоті до моменту наступного ембріотрансферу.

Таблиця 1

Морфологічна класифікація ембріонів людини на стадії бластоцисти (Gardner, 1999)

Параметри оцінки бластоцисти	Клас якості	Опис будови бластоцисти відповідного класу якості
Етап розвитку бластоцисти	1	Бластоцель кавітованого ембріона за розмірами не перевищує половини його об'єму
	2	Бластоцель займає більше половини об'єму ембріона
	3	Бластоцель остаточно заповнює зародок і починає його розтягувати
	4	Експандована бластоциста, що має великі розміри та тонку, розтягнену блискучу оболонку
	5	Бластоциста, що розпочала вихід із блискучої оболонки
	6	Ембріон залишив блискучу оболонку
Морфологія внутрішньоклітинної маси	A	Багато щільно упакованих клітин, чітка форма ембріобласта
	B	Невелика кількість безсистемно згрупованих клітин
	C	Дуже мало клітин
Будова трофектодерми	A	Багато щільно прилеглих одна до одної клітин
	B	Невелика кількість клітин із порушенням щільної організації
	C	Дуже мало клітин великого розміру, між ними можуть виникати проміжки

Достовірність виявлених відмінностей між двома проаналізованими групами ембріонів підтверджували порівнянням вибірових долей за критерієм Фішера (для якісних ознак) та оцінкою розходжень центральних тенденцій двох вибірок за критерієм Манна – Уїтні (для кількісних ознак) за умов $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення

За результатами проведеного генетичного скринінгу по дві копії усіх досліджуваних хромосом несли лише 33,1% обстежених ембріонів. При цьому частка еуплоїдних зразків у порівняльній групі становила 39,9%, тоді як серед ембріонів жінок старшої вікової групи хромосомно збалансованими були визнані лише 25,2 % (різниця є статистично достовірною, $P < 0,05$). Отримані дані узгоджуються з висновками інших дослідників: за даними Munne (2007), частка нормальних ембріонів, отриманих у жінок віком < 38 років, становить 38,5%, а

для пацієнток, старших 38 років, цей показник не перевищує 24%. У когорті ембріонів молодих жінок на кожну процедуру запліднення *in vitro* припадало в середньому 3,4 \pm 2,8 еуплоїдних ембріона. В основній групі дослідження середня кількість хромосомно збалансованих зразків, виявлених в окремому лікувальному циклі, становила лише 1,61 \pm 1,30, що достовірно нижче показників порівняльної групи ($P < 0,05$).

Хромосомний скринінг ембріонів, отриманих у випадку застосування допоміжних репродуктивних технологій у жінок різних вікових категорій, виявив тенденцію до зниження відносної кількості хромосомно збалансованих зразків за зростання репродуктивного віку пацієнток. Вірогідність виявлення еуплоїдного ембріона в окремому циклі лікування для жінок, старших 36 років, у 2,5 рази нижча за показники порівняльної групи. В основній групі майже удвічі зростає частка лікувальних циклів, у яких під час проведення генетичної діагностики не виявлено ембріонів, придатних для перенесення до порожнини матки. Для жінок старшого репродук-

тивного віку 15,3% процедур завершилися відміною ембріотрансферу у зв'язку з патологічним хромосомним набором усіх обстежених ембріонів, тоді як у групі порівняння еуплоїдні зразки не виявлено тільки в 6,8% випадків. Проводячи доімплантаційний генетичний скринінг під час лікування безпліддя у жінок, старших 36 років, урахували також ризик відміни ембріотрансферу у зв'язку з відсутністю серед проаналізованої когорти еуплоїдних ембріонів.

Оцінку морфологічних характеристик ембріонів, у тому числі встановлення темпів їх дробіння, розглядають як прогностичний параметр для виокремлення зразків із найвищим імплантаційним потенціалом (Magli, 2007; Mastenbroek, 2011). Аналіз морфологічних характеристик ембріонів показав, що, всупереч очікуванням, зразки з порівняльної та основної груп дослідження на стадії дробіння розвивалися з однаковою швидкістю (табл. 2). На 40–42-гу годину культивування середня кількість клітин в аномальних і еуплоїдних ембріонів обох груп статистично не відрізнялася та становила в середньому $3,7 \pm 1,0$ бластомера. На третю добу розвитку аномальні ембріони порівняльної та основної груп містили $7,1 \pm 1,8$ та $7,2 \pm 1,3$ клітин відповідно, тоді як хромосомно збалансовані ембріони молодих і старших пацієнок склалися з $7,3 \pm 1,5$ та $7,3 \pm 1,2$ бластомера. Частка ембріонів, що на другу та третю добу культиву-

вання містили оптимальну кількість клітин, не відрізнялася між когортами жінок різних вікових категорій. Через 64–66 годин після запліднення частка анеуплоїдних ембріонів, що склалися із 7 чи 8 бластомерів, була достовірно нижчою у порівняльній групі. Можливо, це спричинено дією природного добору проти хромосомно незбалансованих ембріонів, тиск якого лише посилюватиметься протягом наступних днів культивування.

Аномалії будови (присутність без'ядерних фрагментів, неспіврозмірність клітин, багатоядерність і вакуолізацію) розглядають як негативний прогностичний фактор [12], адже вони можуть бути спричинені порушеннями функціонування генетичного апарату чи окремих органел бластомерів. Частка ембріонів із морфологічними відхиленнями на другу добу розвитку була співставною у порівняльній і основній групах і не залежала від хромосомного компонента ембріона (див. табл. 2). Через 64–66 годин культивування аномалії будови виявляли достовірно частіше серед анеуплоїдних ембріонів, причому дана тенденція спостерігалася в обох групах. Вірогідно, активація ембріонального геному, що проходить на третю добу розвитку, могла виступати передумовою накопичення зразків із помітними недоліками будови серед хромосомно незбалансованих ембріонів жінок старшої та молодшої вікових груп.

Таблиця 2

Темпи дробіння та особливості будови еуплоїдних і аномальних ембріонів жінок різних вікових груп

Частка ембріонів, які відповідають наведеним характеристикам	Основна група дослідження		Порівняльна група дослідження	
	ембріони з аномаліями хромосомного набору, %	еуплоїдні зразки, %	ембріони з аномаліями хромосомного набору, %	еуплоїдні зразки, %
Друга доба розвитку (40–42-га година культивування)				
Оптимальний темп дробіння (4 бластомери)	62,0	63,2	51,83	62,6
Прискорений розвиток (> 5 клітин)	8,3	10,5	13,8	9,9
Аномалії будови	12,4	10,5	19,2	16,3
Третя доба розвитку (64–66-та година культивування)				
Оптимальний темп дробіння (7–8 бластомерів)	60,3	55,3	48,2	62,6
Прискорений розвиток (> 8 клітин)	11,6	13,2	14,1	9,9
Аномалії будови	46,3	29,0	53,5	16,3

На п'яту добу розвитку до зразків високої якості відносять ті ембріони, що змогли успішно пройти первинну диференціацію та сформувати бластоцисту (Gardner, 1999; Wączkowski, 2004), при цьому перевага віддається експандованим бластоцистам, які вже почали процес вилуплення з оболонки запліднення, а відтак готові імплантуватися у порожнині матки. Аналіз результатів пролонгованого культивування ембріонів показав, що близько 36,0% зразків з аномаліями хромосомного набору зупиняються у розвитку на стадії первинної диференціації, тоді як блокування росту нормальних зразків спостерігається лише у 7,9% випадків. Тенденція до припинення розвитку анеуплоїдних зразків на стадії бластуляції з одночасним збільшенням питомої ваги хромосомно збалансованих ембріонів серед сформованих бластоцист спостерігалася у порівняльній та основній групах дослідження. При цьому частота успішної бластуляції еуплоїдних ембріонів перевищувала відповідні показники

аномальних зразків приблизно у півтора раза: 72,9 та 78,4% серед ембріонів молодих і старших пацієнок, тоді як серед анеуплоїдних ембріонів первинну клітинну диференціацію успішно пройшли 49,2 та 50,4% відповідно. Таким чином, розвиток ембріонів жінок старшого репродуктивного віку проходив за правилами, яким підкорялися й ембріони молодших пацієнок, причому механізми негативної селекції анеуплоїдних ембріонів працювали в основній групі так само ефективно, як і в порівняльній когорті. Власне на стадії первинної диференціації єдиною відмінністю ембріонів жінок старшої вікової групи було уповільнення темпів виходу еуплоїдних ембріонів з оболонки запліднення (рис.). Ефективність вилуплення експандованих бластоцист жінок старшого репродуктивного віку була співрозмірною з показниками хромосомно незбалансованих зразків і становила лише 13,5%, тоді як нормальні ембріони молодих жінок на п'яту добу залишали оболонку достовірно частіше (33,3%).

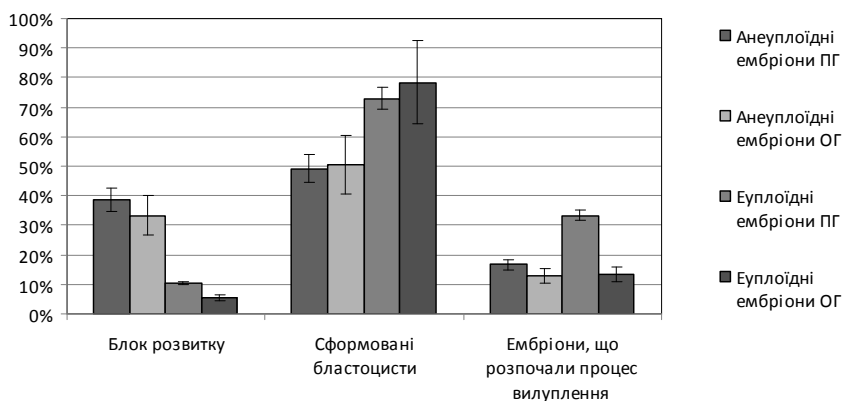


Рис. Морфокінетичні особливості хромосомно збалансованих і аномальних ембріонів жінок порівняльної (ПГ) та основної групи (ОГ) дослідження на 112–114-ту годину культивування

Стабільна ефективність дії природного добору на фоні високої частоти анеуплоїдних ембріонів у жінок старшого репродуктивного віку викликала накопичення бластоцист з аномаліями хромосомного набору у групі дослідження. У порівняльній групі хромосомно незбалансованими були лише 33,0% бластоцист, тоді як у старших пацієнток аномалії хромосомного набору несли 46,5% ембріонів, що пройшли первинну диференціацію ($P < 0,05$). Таким чином, вірогідність імплантації у порожнину матки аномального ембріона була вищою у пацієнток старшого репродуктивного віку, а з урахуванням віковозалежного зниження ефективності постімплантаційної елімінації анеуплоїдних зразків власне й формувався високий ризик настання та збереження патологічної вагітності.

Висновки

Перебіг подій доімплантаційного розвитку ембріонів жінок старшого репродуктивного віку суттєво не відрізняється від показників молодих жінок, а відтак навряд чи виступає однією з основних причин опосередкованого віковим фактором зниження фертильності. На фоні виснаження оваріального резерву виявлене підвищення частоти формування хромосомно незбалансованих ембріонів старших жінок може значно знижувати вірогідність настання вагітності природним шляхом, навіть за умови застосування допоміжних репродуктивних технологій. Зростання кількості анеуплоїдних ембріонів за умови збереження сталої ефективності елімінації аномальних зразків на доімплантаційному етапі ембріогенезу може бути однією з передумов підвищення вірогідності народження дитини з хромосомними аберациями у жінок старшого репродуктивного віку.

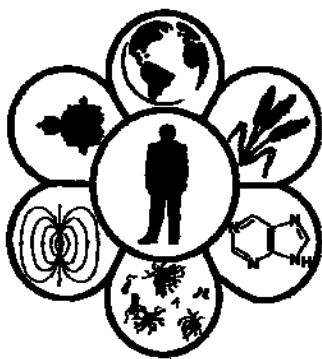
Бібліографічні посилання

Bączkowski, T., Kurzawa, R., Głabowski, W., 2004. Methods of embryo scoring in *in vitro* fertilization. *Reprod. Biol.* 4(1), 5–22.
 Christopikou, D., Tsorva, E., Economou, K., Shelley, P., Davies, S., Mastrominas, M., Handyside, A.H., 2013. Polar body analysis by array comparative genomic hybridization accurately predicts aneuploidies of maternal meiotic origin in cleavage stage embryos of women of advanced maternal age. *Hum. Reprod.* 28(5), 1426–1434.

De Vos, A., Staessen, C., De Rycke, M., Verpoest, W., Haentjens, P., Devroey, P., Liebaers, I., Van de Velde, H., 2009. Impact of cleavage-stage embryo biopsy in view of PGD on human blastocyst implantation: A prospective cohort of single embryo transfers. *Hum. Reprod.* 24, 2988–2996.
 Fragouli, E., Alfarawati, S., Spath, K., Wells, D., 2014. Morphological and cytogenetic assessment of cleavage and blastocyst stage embryos. *Mol. Hum. Reprod.* 20(2), 117–126.
 Gardner, D.K., Schoolcraft, W.B., 1999. *In vitro* culture of human blastocysts. Toward reproductive certainty: Fertility and genetics beyond. Jansen, R., Mortimer, D. (eds.). Parthenon Publishing, Carnforth, UK.
 Liu, J., Wang, W., Sun, X., Liu, L., Jin, H., Li, M., Witz, C., Williams, D., Griffith, J., Skorupski, J., Haddad, G., Gill, J., 2012. DNA microarray reveals that high proportions of human blastocysts from women of advanced maternal age are aneuploid and mosaic. *Biol. Reprod.* 87(6), 148.
 Macklon, N., Geraedts, J., Fauser, B., 2002. Conception to ongoing pregnancy: The ‘black box’ of early pregnancy loss. *Hum. Reprod. Update.* 8, 333–343.
 Magli, M.C., Gianaroli, L., Ferraretti, A.P., Lappi, M., Ruberti, A., Farfalli, V., 2007. Embryo morphology and development are dependent on the chromosomal complement. *Fertil. Steril.* 87(3), 534–541.
 Mastenbroek, S., van der Veen, F., Aflatoonian, A., Shapiro, B., Bossuyt, P., Repping, S. Embryo selection in IVF. *Hum. Reprod.* 26(5), 964–966.
 Munne, S., Chen, S., Colls, P., Garrisi, J., Zheng, X., Cekleniak, N., Lenzi, M., Hughes, P., Fischer, J., Garrisi, M., Tomkin, G., Cohen, J., 2007. Maternal age, morphology, development and chromosome abnormalities in over 6000 cleavage-stage embryos. *Reprod. Biomed. Online* 14(5), 628–634.
 Munné, S., Chen, S., Fischer, J., Colls, P., Zheng, X., Stevens, J., Escudero, T., Oter, M., Schoolcraft, B., Simpson, J.L., Cohen, J., 2005. Preimplantation genetic diagnosis reduces pregnancy loss in women aged 35 years and older with a history of recurrent miscarriages. *Fertil. Steril.* 84, 331–335.
 Munné, S., Márquez, C., Magli, C., Morton, P., Morrison, L., 1998. Scoring criteria for preimplantation genetic diagnosis of numerical abnormalities for chromosomes XY, 13, 16, 18 and 21. *Mol. Hum. Reprod.* 4, 863–870.
 Niakan, K.K., Han, J., Pedersen, R.A., Simon, C., Pera, R.A., 2012. Human pre-implantation embryo development. *Development.* 139(5), 829–841.
 Prados, F.J., Debrock, S., Lemmen, J.G., Agerholm, I., 2012. The cleavage stage embryo. *Hum. Reprod.* 27(Suppl 1), i50–71.
 Sudheer, S., Adjaye, J., 2007. Functional genomics of human pre-implantation development. *Funct. Genomic Proteomic.* 6(2), 120–132.

- Tao, J., Craig, R.H., Johnson, M., Williams, B., Lewis, W., White, J., Buehler, N., 2004. Cryopreservation of human embryos at the morula stage and outcomes after transfer. *Fertil. Steril.* 82(1), 108–118.
- Taylor, D.M., Ray, P.F., Ao, A., Winston, R.M., Handyside, A.H., 1997. Paternal transcripts for glucose-6-phosphate dehydrogenase and adenosine deaminase are first detectable in the human preimplantation embryo at the three-to-four-cell stage. *Mol. Reprod. Dev.* 48, 442–448.
- Tesarik, J., Greco, E., Mendoza, C., 2004. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum. Reprod.* 19(3), 611–615.
- Thornhill, A.R., de Die-Smulders, C.E., Geraedts, J.P., Harper, J.C., Harton, G.L., Lavery, S.A., Moutou, C., Robinson, M.D., Schmutzler, A.G., Scriven, P.N., Sermon, K.D., Wilton, L., 2005. ESHRE PGD Consortium 'Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS)'. *Hum. Reprod.* 20(1), 35–48.
- Velilla, E., Escudero, T., Munné, S., 2002. Blastomere fixation techniques and risk of misdiagnosis for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reprod. Biomed. Online* 4(3), 210–217.
- Wennekamp, S., Mesecke, S., Nédélec, F., Hiiragi, T., 2013. A self-organization framework for symmetry breaking in the mammalian embryo. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14(7), 452–459.

Надійшла до редколегії 02.04.2014



УДК 578.82/83:619

Моніторинг розповсюдження вірусів серед домашніх котів і собак у м. Дніпропетровськ

О.В. Ящук, Н.В. Черевач, А.І. Вінніков

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпропетровськ, Україна

Проаналізовано сезонне поширення вірусних інфекцій серед домашніх котів і собак, вплив статеві та породної належності на частоту прояву захворювань. За 2012 та 2013 роки у Дніпропетровську спостерігається збільшення захворюваності домашніх тварин на вірусні інфекції. Серед тварин, що потрапили до трьох ветеринарних клінік міста, в 2012 році зареєстровано 219 хворих тварин, а у 2013 – 272. Випадки захворювання котів на вірусні інфекції реєструються частіше, ніж собак. Віруси ринотрахеїту та каліцивірозу – основні агенти патології верхніх дихальних шляхів кішок: у 2011 р. зумовлювали 56,1%, а у 2012 р. – 59,3% загальної кількості хворих на вірусні інфекції котів. У собак з усіх зареєстрованих вірусних захворювань частіше зустрічаються хвороби шлунково-кишкового тракту: вірусний ентерит, гепатит, гастроентерити нез'ясованої етіології (60,0%). Аденовірус виявлено у 30,5% загальної кількості обстежених собак. З аденовірусних захворювань собак найчастіше зустрічаються інфекційний гепатит CAV-1 – 21,9% і аденовіроз CAV-2 – 8,5%. Останнім часом набуло поширення респіраторне захворювання, так званий «вольєрний кашель собак»: 13,0% загальної кількості хворих собак.

Ключові слова: антигени; антитіла; ІФА; ІХА; каліцивіроз; ринотрахеїт; ентерит; гепатит

Monitoring of viruses spread among domestic cats and dogs in Dnipropetrovsk

L.V. Yashchuk, N.V. Cherevach, A.I. Vinnikov

Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Dnipropetrovsk, Ukraine

Cats and dogs kept at home, as well as other animals, are susceptible to infectious diseases caused by pathogenic microorganisms, including viruses. Viral infections in urban environments are extremely common and cause severe diseases in domestic animals which often lead to death, resulting in high material and moral damages to owners of animals. Therefore, investigation of the prevalence of pathogens of viral diseases is very important in our time. The aim of this work is to define the indicators of spreading viral diseases of animals in Dnipropetrovsk, to analyze the seasonal spread of viral infections in animals, and influence of sex and breed on the frequency of disease manifestations. Materials for research were obtained on the basis of three veterinary clinics in Dnipropetrovsk. During the study, we used serological methods of diagnostics of clinical materials, namely ELISA and IHA. Immunosorbent assay was performed using the thermostatic shaker ST-3 and strip immunoassay analyzer Stat Fax 303 Plus. Also we used commercial test systems VetExpert CAV Ag and Feline VacciCheck ImmunoComb[®], based on the immuno-chromatographic method. During clinical studies of 491 animals (268 cats and 223 dogs) it was found that the most common respiratory viral infections in cats were calicivirus infection and rhinotracheitis, while in dogs there were viral diseases of gastrointestinal tract, i.e. enteritis and hepatitis. Using IHA method, we revealed the antibodies to respiratory viruses in the blood of diseased cats: to calicivirus – in 95 cats, to rhinotracheitis – in 60 cats; by ELISA method we identified antigens of parvovirus, enteritis pathogen, in biological material of 61 dogs, by IHA we found antibodies to virus of infectious hepatitis in 49 individuals. Based on these data, it has been revealed that during the winter months the animals suffered mostly the respiratory viral infections (60%), and in spring there were increased occurrence of enteritis, observed in all age groups of animals. From May, hepatitis started to appear and prevailed for all summer months, mixed with enteritis (about 50% of total number of cases). Hepatitis was recorded both in cats and dogs. By the fall, recurrence was observed for calicivirus and herpes virus infections in cats, and the cases of enteritis decreased, while hepatitis was recorded until mid-October. Such statistics is kept relatively constant. The research results can be applied in the practice of veterinary laboratories for the development of diagnostic measures and prevention of viral diseases in domestic animals, as well as in the prediction of dissemination of viral infections in animals in the near future.

Keywords: antigens; antibodies; IFA; IChra; calicivirus infection; rhinotracheitis; enteritis; hepatitis

Вступ

Вірусні захворювання домашніх тварин у міських умовах надзвичайно поширені, нерідко вони призводять до їх загибелі (Boomkens et al., 2004; Watson, 2004; Jeddi et al., 2005; Gosmanov et al., 2006; Swenson et al., 2012). Тварини всюди контактують із різними паразитичними організмами, але інвазія настає не завжди (Pedersen et al., 1995; Sjurin et al., 1998; Jushhuk et al., 2003; Karen et al., 2006). Це залежить від специфічності паразито-хазяїнних відносин, віку тварин, стану природної резистентності, способу інвазії, вірулентності збудника, його чисельності тощо (Bakulov et al., 2002). Джерелом вірусних часток є не тільки хворі тварини, а і тварини-вірусоносії (Richter et al., 2009). Поширенню вірусів сприяють такі чинники як скупчене утримання (особливо на виставках тварин), недотримання елементарних гігієнічних заходів, схильність кішок до бродяжництва, а також такі стресові фактори як тривале транспортування, відвідування ветлікарні, неправильне живлення, переохолодження (Fomina, 1995; Meyer et al., 2001; Kate, 2004).

Захворювання домашніх кішок і собак можуть викликати такі відомі віруси як реовіруси, каліцивіруси, ретровіруси, парвовіруси, параміксовіруси, лейкозосаркоматозні віруси, коронавіруси, віруси герпесу, синціалний вірус, рабдовіруси, паповавіруси, аденовіруси (Gaskell et al., 1999; Richter et al., 2009; Grant, 2010; Thomas et al., 2010).

Діагностика вірусних захворювань може бути як індивідуальною (щодо кішок і собак в умовах міст), так і великомасштабною (стосовно великих партій тварин). Діагностика відіграє одну з вирішальних ролей у системі заходів із боротьби з хворобами тварин вірусної етіології (Knowles et al., 1991). Для встановлення діагнозу потрібні збирання, вивчення, аналіз і співставлення комплексу різних даних (Sjurin et al., 1998; Kondrahin et al., 2004; Baryshnikov, 2006). Методи лабораторної діагностики вірусних інфекцій мають свою специфіку, враховуючи особливості біології вірусів (Schmitz et al., 2009; Bulut et al., 2013). Для лабораторної діагностики вірусних інфекцій застосовують три основні методичні підходи: вірусологічний, серологічний, молекулярно-біологічний (McArdle et al., 1996).

Лікування вірусних захворювань досить трудомістке і, на жаль, недостатньо ефективне (Knowles, 1991; Watson, 2004; Evermann, 2005). Велике значення мають своєчасне звернення до лікаря та правильна діагностика, на підставі даних якої підбирається адекватне лікування (Vasil'ev et al., 2004). Виходячи з вищенаведеного, актуальними є дослідження, присвячені біології збудників вірусних інфекцій, шляхів зараження, особливостей патогенезу, способів діагностики та профілактики вірусних інфекцій.

Мета цієї роботи – визначення показників розповсюдження вірусних захворювань домашніх котів і собак у м. Дніпропетровськ.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проводили на базі трьох ветеринарних клінік Дніпропетровська у 2012 та 2013 роках. Результа-

ти клінічного обстеження 491 тварини підтверджені даними диференційної та лабораторної діагностики, для проведення якої застосовували серологічні методи діагностики клінічного матеріалу (ІФА та ІХА). Об'єктом досліджень служили біологічні матеріали: сироватка (у тому числі сира) або плазма крові, фекалії, сеча, слина, назальні виділення або кон'юнктивальна рідина. Вибір матеріалу як пріоритетного для того чи іншого дослідження відповідав специфіці розвитку патологічного процесу при певному захворюванні (Richter, 1995; Bulut, 2013).

Антигени до парвовірусу – збудника ентериту собак виявлено за допомогою ІФА – універсального методу виявлення вірусних білків (McArdle, 1996). Аналіз проводили за допомогою термостатного шейкера ST-3 та стрипового імуноферментного аналізатора Stat Fax 303 Plus. Антитіла до аденовірусу – збудника гепатиту собак, а також каліцивірозу та ринотрахеїту кішок виявляли у біологічному матеріалі від хворих тварин за допомогою комерційних тест-систем VetExpert та ImmunoComb® імунохроматографічним методом. Лабораторні тести застосовували також для підтвердження діагнозу у випадку, коли деякі клінічні ознаки є загальними відразу до двох або трьох захворювань. Процедури та інтерпретуючі критерії, які застосовуються для тестування антимікробної сприйнятливості патогенів тварин, засновані на тих принципах, що і для патогенів людини (McArdle, 1996; Schmitz, 2009). Для експрес-діагностики аденовірозу собак (вірусного гепатиту, вірусного ларинготрахеїту) застосовані тест-системи VetExpert CAV Ag – імунохроматографічний аналіз (ІХА), пряме однокрокове дослідження (Kondrahin, 2004). Для визначення титру антитіл у сироватці крові кішок до вірусного ринотрахеїту (герпес-вірусу) та каліцивірозу застосовані тест-набори Feline VacciCheck ImmunoComb®. Тест ImmunoComb® є модифікованим імуноферментним аналізом, який може бути описаний як точковий аналіз із використанням вторинних антитіл, мічених ферментом, за допомогою якого визначається рівень антитіл у сироватці або цільній крові.

Результати та їх обговорення

Клінічно обстежено 268 кішок різного віку (від 2 тижнів до 18 років), порід і статі. Виявлено 155 особин із різними ураженнями слизової рота та носа, а також із проявами респіраторної патології. Результати клінічного обстеження показали, що в кішок відмічали переважно ерозивні ураження слизової ротової порожнини та язика, рясне слиновиділення, риніти, кон'юнктивіти, загальну слабкість, зниження або відсутність апетиту, підвищення температури тіла до 40–41 °С, зниження маси тіла. Враховували наявність хвороб, що перебігають у кішок із подібною симптоматикою: каліцивіроз, ринотрахеїт і хламідіоз.

Здатність вірусу каліцивірозу до мутаційної мінливості має велике значення для клінічної різноманітності проявів хвороби та її контролю (Knowles, 1991). Вірус викликає ряд клінічних проявів від безсимптомної інфекції, уражень слизової ротової порожнини та очей, верхніх відділів органів дихання різної тяжкості до системної інфекції. Часто зустрічаються ураження слизової оболонки очей і носа. Найхарактернішими є ураження слизо-

вої рота у вигляді виразок, які нерідко залишаються непоміченими та незареєстрованими.

У результаті діагностичних досліджень проб крові у 95 особин виявлено антитіла до вірусу каліцивірозу, у 60 – до вірусу ринотрахеїту.

Випадки захворювань на респіраторні вірусні інфекції реєстрували у тварин різних порід та вікових груп. Найчастіше випадки захворювання каліцивірозом і ринотрахеїтом реєстрували у кошенят віком від одного до шести місяців. У цій віковій групі тварин часто виявляли гостру форму інфекції. У віці від одного до шести років частіше спостерігається безсимптомне носійство. Особливо важко хворіють тварини старше семи років (табл. 1).

Таблиця 1

Поширення каліцивірозу та ринотрахеїту у кішок різних вікових груп у м. Дніпропетровськ за 2012–2013 рр.

Вікова група тварин	Каліцивіроз, % (n = 95)	Ринотрахеїт, % (n = 60)
1–6 міс.	33,7	40,0
7–12 міс.	27,4	21,6
1–5 років	12,6	8,4
6–10 років	16,8	18,3
Понад 10 років	9,5	11,7

Випадки респіраторних захворювань у кішок реєстрували приблизно рівномірно протягом усього року (табл. 2), найчастіше у нещеплених, у деяких випадках також і в імунізованих тварин. Найбільшу кількість хворих реєстрували навесні, найменшу – влітку, починаючи з осені випадки захворюваності частішали.

Таблиця 2

Сезонність прояву каліцивірозу та ринотрахеїту у кішок у м. Дніпропетровськ за 2012–2013 рр.

Вірусна інфекція	Пора року				Усього
	зима	весна	літо	осінь	
Каліцивіроз	26	32	13	24	95
Ринотрахеїт	16	18	9	17	60

Дослідження випадків виявлення вірусу від тварин, що поступили в клініку у 2012–2013 рр. з клінічним проявом каліцивірозу, показало, що у 50% випадків була моноінфекція, у 22,1% клінічні прояви хвороби у тварин були викликані асоціацією трьох збудників (вірусу каліцивірозу, ринотрахеїту кішок, хламідій), у 14,7% – асоціацією вірусу каліцивірозу та ринотрахеїту кішок, у 13,7% випадків виявили вірус каліцивірозу та хламідії (табл. 3). Найчастіше каліцивіроз кішок виявляли як моноінфекцію, а також в асоціації з ринотрахеїтом і хламідіозом.

Таблиця 3

Виявлення збудників інфекційних хвороб у пробах біоматеріалу від кішок (n = 95) у м. Дніпропетровськ за 2012–2013 рр.

Найменування хвороби	Частка від кількості позитивних проб, %
Каліцивіроз	50,0
Ринотрахеїт і каліцивіроз	14,5
Ринотрахеїт, каліцивіроз і хламідіоз	22,1
Каліцивіроз і хламідіоз	13,4

У ході виконання роботи обстежено 223 собаки різного віку (від 2 тижнів до 15 років), порід і статі. Виявлено 110 тварин із різними ураженнями шлунково-кишкового тракту, із них 49 – із симптомами ураження печінки, і 61 – з ураженням кишечника. Антигени вірусу ентериту виявлено у 61 особини, антитіла до вірусу гепатиту – у 49 особин.

Епізоотії інфекційного гепатиту мають сезонний характер – наростання випадків захворювання на гепатит спостерігається з настанням теплої пори року (близько 30% загальної кількості хворих). Влітку зареєстровано найбільшу кількість хворих, узимку – найменшу (табл. 4).

Таблиця 4

Сезонність прояву гепатитів та ентеритів собак у м. Дніпропетровськ за 2012–2013 рр.

Вірусна інфекція	Пора року				Усього
	зима	весна	літо	осінь	
Гепатит	12	15	18	16	61
Ентерит	8	12	15	14	49

Дослідження поширення гепатиту та ентериту серед собак різних вікових груп показало, що найуразливішими є тварини віком 7–12 місяців – 24,6 та 26,5% загальної кількості реєстрацій хвороби відповідно. У віці 1–6 міс. та 1–5 років частота гепатитів була близько 20%. Після 5 років показники захворюваності дещо знижуються (тварини вже мають необхідні щеплення). Низькі показники захворюваності серед тварин вікової групи понад 10 років пояснюються відносно невеликим відсотком собак, які досягають подібного віку; до того ж, доживають до такого віку тварини, яких утримували у відмінних умовах і яким робили всі необхідні щеплення.

Таблиця 5

Поширення гепатиту та ентериту у собак різних вікових груп у м. Дніпропетровськ за 2012–2013 рр.

Вікова група	Гепатит, % (n = 61)	Ентерит, % (n = 49)
1–6 міс.	20,8	16,3
7–12 міс.	24,7	26,5
1–5 років	23,1	22,6
6–10 років	18,3	20,4
Понад 10 років	13,1	14,2

Гепатити та ентерити частіше зустрічаються у собак віком до 5 років (66% загальної кількості хворих). Підсисні цуценята при матері хворіють рідко, оскільки захищені материнським імунітетом. Особливо важко переносять захворювання молодняк, позбавлений природного вигодовування або рано відлучений від матері.

Ознайомлення з результатами клінічних досліджень показало, що частіше відмічався підгострий перебіг хвороби з неясково вираженою симптоматикою. Гострий, найважчий перебіг хвороби спостерігається у цуценят віком 2–8 тижнів, а також у невакцинованих собак. Дрібні породи сприйнятливіші до інфекції через невелику кількість жирового прошарку та менш стійкий організм. Тривалість хвороби за гострої форми залежить від багатьох факторів: стану імунної системи, віку, наявності змішаних інфекцій, своєчасності та ефективності лікування тощо.

Перелік вірусних інфекцій, на які хворіють домашні тварини, достатньо різноманітний. У котів перше місце

за поширенням вірусних інфекцій посідають респіраторні хвороби: каліцивіроз і ринотрахеїт. Випадки захворювань на вірусні респіраторні інфекції котів у 2012 р. становили 56,1%, у 2013 р. – 59,3% загальної кількості хворих на вірусні інфекції котів. Друге та третє місце мають відповідно коронавірусна інфекція та панлейкопенія. Останніми роками ресструються випадки захворювання кішок на вірусний імунодефіцит (котячий СНІД): 19 випадків захворювання за дослідний період.

Більшість клінічних симптомів, що проявляються у ВІК-інфікованих кішок, викликані не безпосередньо ВІК, а вторинними захворюваннями. У багатьох випадках симптоми викликані вторинною інфекцією, яку необхідно ідентифікувати та провести відповідне лікування. Імунодефіцит і / або імуностимуляція у кішок найчастіше виявляються у формі хронічного гінгівітостоматиту, хронічного риніту, лімфаденопатії, вільно-опосередкованого гломерулонефриту та втрати ваги. ВІК-інфікованих кішок вражають численні вірусні, бактеріальні, грибкові та протозойні захворювання, що перебігають одночасно. Незвичайні клінічні прояви деяких хвороб, наприклад, нетипові або важкі форми паразитарних захворювань шкіри (демодекоз, педикульоз) або пухлини також можуть свідчити про присутність ВІК (Willett, 1995).

Таблиця 6

Розповсюдженість вірусних захворювань у котів у м. Дніпропетровськ за 2012–2013 рр.

Вірусна інфекція	2012 р.		2013 р.	
	абс.	%	абс.	%
Каліцивірусна	43	34,9	52	35,9
Герпесвірусна	26	21,1	34	23,4
Коронавірусна	24	19,5	25	17,2
Панлейкопенія	22	17,9	23	15,9
Імунодефіцит	8	6,5	11	7,6
Усього	123	100,0	145	100,0

У собак за частотою зустрічальності вірусних інфекцій на першому місці парвовірусний ентерит, друге та третє посідають аденовірусна інфекція та «вольєрний кашель собак» відповідно.

Таблиця 7

Розповсюдженість вірусних захворювань серед домашніх собак у м. Дніпропетровськ за 2012–2013 рр.

Вірусна інфекція	2012 р.		2013 р.	
	абс.	%	абс.	%
Герпесвірусна	10	10,0	13	10,2
Чума м'ясоїдних	7	7,3	11	8,7
Парвовірусна (ентерит)	23	23,9	38	29,9
Аденовірусна (гепатит і аденовіроз)	32 (23; 9)	33,3 (23,9; 9,4)	36 (26; 10)	28,3 (20,5; 7,8)
Коронавірус	11	11,5	13	10,2
«Вольєрний кашель собак»	13	13,5	16	12,6
Усього	96	100	127	100

Останнім часом набув поширення так званий «вольєрний кашель собак». Хворіють переважно собаки, що містяться в розплідниках. Викликатися це захворювання може одним або навіть цілим комплексом вірусів (реовірусом собак, вірусом парагрипу собак, герпесвірусом, аденовірусами I і II типів), а також може мати бактеріальну природу (*Bordetella bronchiseptica*) (Sherding, 2006).

Моніторинг вірусних захворювань домашніх котів і собак у Дніпропетровську показав, що найпоширеніші вірусні захворювання кішок – респіраторні (зокрема, каліцивірусна інфекція), а у собак – захворювання шлунково-кишкового тракту (гепатити та ентерити). Результати досліджень інших авторів підтверджують, що подібна тенденція спостерігається повсюдно (Kate, 2004). Довгостроковий аналіз показав, що поширення каліцивірусів у природно інфікованих колоніях кішок, що утримуються груповим методом, коливається у середніх межах 6–75%, в окремих випадках – 0–91%. У кішок, що містяться індивідуально, показники захворюваності набагато нижчі – приблизно 10%. Широкому поширенню каліцивірусу (FCV) у популяції кішок сприяє його висока контагіозність і стабільність, схильність вірусу до мутацій, виникнення внаслідок цього особливо вірулентних штамів, стійких до існуючих вакцин (Meuer, 2001). Згідно з останніми дослідженнями, до 50% штамів каліцивірусів стійкі до найчастіше вживаних вакцин, що захищають лише від двох або трьох перехресно реагуючих штамів вірусу (Kate, 2004). Між штамми вірусу, які виділені від захворілих кішок у вогнищах захворюваності у Франції, США та Великобританії, існують суттєві відмінності (Brice, 2009).

Кішки, заражені каліцивірусом, як правило, стають хронічними його носіями та виділяють вірус постійно або з перервами протягом тривалого часу або протягом усього життя (Richter, 1996; Karen, 2006). Це сприяє підтриманню постійної циркуляції каліцивірусів у популяціях домашніх кішок. Існує невеликий відсоток кішок, стійких до постійного впливу вірусу. Подібна стійкість, мабуть, пояснюється генетичними особливостями. До каліцивірусу сприйнятливі всі кішки, незалежно від віку, статі та породи, у тому числі вакциновані. Висока чисельність сприйнятливих тварин є живильним середовищем для поширення, реплікації та мутації вірусу. У більшості випадків захворювань прогноз сприятливий, проте у кошенят віком до 6 місяців смертність може досягати 30% (Meuer, 2001; Karen, 2006; Richter, 2009).

Кишкові вірусні захворювання собак також дуже поширені у світі: в основному у розплідниках і притулках для тварин (Bulut, 2013). Для інфекційного гепатиту (CAV-1) характерне тривале вірусноносійство (протягом ряду років), що підтверджується неодноразовими випадками занесення інфекції до благополучних розплідників під час закупівлі племінних самців і самок, до груп яких потрапили хронічно хворі тварини. Клінічні прояви вірусного гепатиту варіюють залежно від породи та загального стану здоров'я тварини (Voornken, 2004). Згідно з дослідженнями, проведеними у Великобританії, визначено породи з підвищеним ризиком розвитку гепатиту: американський кокер спаніель, керн-терер, далматин, доберман-пінчер, англійський кокер-спаніель, англійський спрингер-спаніель, дог, лабрадор ретривер. Середній вік хворих собак усіх порід – 8 років, кількість самок дещо переважує (Bexfield, 2012).

Парвовірусним ентеритом (CPV-2) найчастіше хворіють молоді собаки: вірус має вибіркочну спорідненість до молодих клітин, які активно діляться (слизової оболонки кишечника, міокарда, лімфатичної системи та кісткового мозку). Інфекція характеризується

високою захворюваністю та низькою смертністю. Однак у поєднанні з іншими агентами вірусної бактеріальної та мікоплазмозної природи інфекція може викликати загибель тварини (Fomina, 1995; Watson, 2004). У зимові місяці тварини хворіють переважно на респіраторні вірусні інфекції (близько 61%), навесні збільшуються звернення до клінік з ентеритами, причому хворіють усі вікові групи тварин. Із травня з'являються гепатити, вони превалюють усе літо (разом з ентеритами) – близько 50% загальної кількості хворих. Гепатити реєструються як у котів, так і у собак. До осені у котів загострюються каліцивірози та герпесвірусні ринотрахеїти, кількість ентеритів знижується, гепатит реєструється до середини жовтня. Така статистика тримається відносно постійно.

Висновки

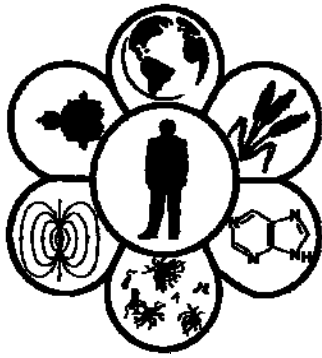
У 155 хворих кішок виявлено антитіла до вірусів каліцивірозу (95) та ринотрахеїту (60). У 61 собаки виявлено антигени парвовірусу – збудника ентериту, у 49 особин – антитіла до інфекційного гепатиту. У котів найрозповсюдженіші вірусні інфекції – респіраторні (каліцивіроз і ринотрахеїт), у собак – вірусні захворювання шлунково-кишкового тракту (ентерит і гепатит). Визначено тенденцію щодо наростання захворюваності домашніх тварин (котів і собак) на вірусні інфекції: у 2012 році серед пацієнтів базових клінік зареєстровано 219, у 2013 році – 272 хворі тварини. Більша частина хворих тварин – нещеплені тварини, віком від 4 місяців до 5 років, у деяких випадках – імунізовані. Сприйнятливість до вірусних інфекцій залежить від віку тварини: найуразливіші молоді тварини віком до року (понад 50%). Породні тварини найуразливіші до вірусних захворювань і перебіг хвороби у них важчий. Резервуар вірусних інфекцій – бродячі тварини, а фактор – в основному власники тварин, які не можуть забезпечити належне виховання та необхідні умови утримання.

Бібліографічні посилання

Bakulov, I.A., Kotljarov, V.M., Danchenko, A.S., 2002. Osobo opasnye bolezni zhyvotnyh. Novosibirsk, Pokrov (in Russian).
 Baryshnikov, P.I., 2006. Veterinarnaja virusologija [Veterinary virology]. AGAU, Barnaul (in Russian).
 Bessarabov, B.F., Vashutin, A.A., Voronin, E.S., 2007. Infekcionnye bolezni zhyvotnyh [Infectious animal diseases]. Kolos, Moscow (in Russian).
 Bexfield, N.H., Buxton, R.J., Vicek, T.J., Day, M.J., Bailey, S.M., Haugland, S.P., Morrison, L.R., Else, R.W., Constantino-Casas, F., Watson, P.J., 2012. Breed, age and gender distribution of dogs with chronic hepatitis in the United Kingdom. *Vet. J.* 193(1), 124–128.
 Boomkens, S.Y., Penning, L.C., Egberink, H.F., van den Ingh, T.S., Rothuizen, J., 2004. Hepatitis with special reference to dogs. A review on the pathogenesis and infectious etiologies, including unpublished results of recent own studies. *Vet. Q.* 26(3), 107–114.
 Brice, R.S., Poulet, H., Pingret J.-L., Jas, D., Brunet, S., Lemeter, C., Etievant, M., Boucraut-Baralon, C., 2009. A nosocomial outbreak of feline calicivirus associated virulent systemic disease in France. *J. Feline Med. Surg.* 11(8), 633–644.
 Bulut, O., Yapici, O., Avci, O., Simsek, A., Atli, K., Dik, I., Yavru, S., Hasircioglu, S., Kale, M., Mamak, N., 2013. The

serological and virological investigation of canine adenovirus infection on the dogs. *Sci. World J.* (in Press).
 Evermann, J.F., Abbott, J.R., Han, S., 2005. Canine coronavirus-associated puppy mortality without evidence of concurrent canine parvovirus infection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17(6), 610–614.
 Fomina, N.V., 1995. Adenovirusnaja infekcija zhyvotnyh [Adenoviral infection of animals]. Kolos, Moscow (in Russian).
 Gaskell, R., Willoughby, K., 1999. Herpesviruses of carnivores. *Vet. Microb.* 69(1), 73–88.
 Gosmanov, R.G., Kolychev, N.M., 2006. Veterinarnaja virusologija [Veterinary virology]. Kolos, Moscow (in Russian).
 Hansman, G.S., Jiang, X.J., Green, K.Y., 2010. Caliciviruses: Molecular and cellular virology. Caister Academic Press, Poole.
 Jedd, D., Rjems, J.K., Tennant, B., 2005. Infekcionnye bolezni sobak i koshek [Infectious diseases of dogs and cats]. Akvarium-Print, Moscow (in Russian).
 Jushuk, N.D., Vengerov, J.J., 2003. Infekcionnye bolezni [Infectious diseases]. Medicina, Moscow (in Russian).
 Karen, P., Coyne, D.S., Radford, A.D., Cripps, P.J., Porter, C.J., McCracken, C.M., Gaskell, R.M., 2006. Long-term analysis of feline calicivirus prevalence and viral shedding patterns in naturally infected colonies of domestic cats. *Vet. Microbiol.* 118(1), 12–25.
 Kate, H.F., Pesavento, P.A., Pedersen, N.C., Poland, A.M., Wilson, E., Foley, J.E., 2004. An outbreak of virulent systemic feline calicivirus disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 224(2), 241–249.
 Knowles, J.O., MacArdle, F., Dawson, S., Carter, S.D., Gaskell, C.J., Gaskell, R.M., 1991. Studies on the role of feline calicivirus in chronic stomatitis in cats. *Vet. Microbiol.* 27(3), 205–219.
 Kondrahin, I.P., Arhipov, A.V., Levchenko, I.P., 2004. Metody veterinarnoj klinicheskoy laboratornoj diagnostiki [Methods of veterinary clinical laboratory diagnostics]. Kolos, Moscow (in Russian).
 McArdle, F., Dawson, S., Carter, M.J., Milton, I.D., Turner, P.C., Meanger, J., Bennett, M., Gaskell, R.M., 1996. Feline calicivirus strain differentiation using monoclonal antibody analysis in an enzyme-linked immuno-flow-assay. *Vet. Microbiol.* 51(3), 197–206.
 Mettenleiter, T.C., Sobrino, F., 2008. Animal viruses: Molecular biology. Caister Academic Press, Poole.
 Meyer, A., Kershaw, O., Klopffleisch, R., 2011. Feline calicivirus-associated virulent systemic disease: Not necessarily a local epizootic problem. *Vet. Rec.* 168(22), 589.
 Richter, M., Schudel, L., Tobler, K., Matheis, F., Vöggtlin, A., Vanderplasschen, A., Costes, B., Spiess, B., Ackermann, M., 2009. Clinical, virological, and immunological parameters associated with superinfection of latently with FeHV-1 infected cats. *Vet. Microbiol.* 138(3), 205–216.
 Schmitz, S., Coenen, C., Matthias, K., Heinz-Jürgen, T., Neiger, R., 2009. Comparison of three rapid commercial canine parvovirus antigen detection tests with electron microscopy and polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.* 21(3), 344–345.
 Sjurin, V.N., Solov'ev, B.V., Fomina, N.V., 1998. Virusnye bolezni zhyvotnyh [Viral diseases of animals]. VNITIBL, Moscow (in Russian).
 Vasil'ev, M.F., Voronin, E.S., Dugin, G.A., 2004. Praktikum po klinicheskoy diagnostike boleznej zhyvotnyh. Kolos, Moscow (in Russian).
 Watson, P.J., 2004. Chronic hepatitis in dogs: A review of current understanding of the aetiology, progression, and treatment. *Vet. J.* 167(3), 228–241.
 Willett, B.J., Jarrett, O., 1995. Feline immunology and immunodeficiency. Oxford University Press, New York, Oxford.

Надійшла до редколегії 12.04.2014



УДК 612.017.1:612.118:796.072.2

Роль системи Hp в адаптації показників специфічного імунітету до впливу помірних фізичних навантажень

В.Л. Соколенко, С.В. Соколенко

Черкаський національний університет імені Богдана Хмельницького, Черкаси, Україна

Досліджували роль фенотипу гаптоглобіну у реалізації адаптивних реакцій показників клітинної та гуморальної ланок імунітету на помірні фізичні навантаження, зумовлені заняттями фізичною культурою. У студентів після занять фізичною культурою незалежно від фенотипу гаптоглобіну достовірно знижується відносне та загальне число лімфоцитів, що є типовою ознакою початкових стадій стресової реакції. Виявили статистично достовірне зниження загального числа всіх аналізованих субпопуляцій Т-лімфоцитів у студентів, які мають фенотип Hp2-2, абсолютного числа Т-лімфоцитів із фенотипами CD3+ та CD4+ у обстежених із фенотипом Hp2-1. У обстежених із фенотипом Hp2-2, після помірних фізичних навантажень вірогідно знижується відносне число хелперних Т-лімфоцитів із фенотипом CD4+, що зумовлює зниження у них імунорегуляторного індексу CD4+/CD8+, та рівень сироваткового IgG. Вірогідні зміни рівня В-лімфоцитів із фенотипом CD72+ в обстежених відсутні, незалежно від фенотипу гаптоглобіну. Підтверджено, що у формування адаптивних реакцій показників імунної системи на помірні фізичні навантаження може включатися сироваткова система гаптоглобінів. Найбільш пресинговий за таких умов фенотип – Hp2-2.

Ключові слова: гаптоглобін; імунна система; фізичні навантаження

Role of Hp system in adaptation of specific immunity indices to the influence of moderate physical activity

V.L. Sokolenko, S.V. Sokolenko

Bohdan Khmelnytsky Chercasy State University, Chercasy, Ukraine

The aim of this study is to determine the role of haptoglobin phenotype in realization of adaptive responses of cellular and humoral immunity indices to moderate exercise caused by physical training. The study was implemented in the group of second-year students aged 18–20 who lived in the same climatic and geographical conditions for a long period of time. The students didn't have any acute or chronic diseases and attended the main group of physical training. 60 persons were investigated. Immune system indices analysis was carried out in September before and after physical training lessons. Leukocyte level was calculated using hemocytometer, lymphocyte level was determined on the base of blood smear (dyeing for Romanowsky–Giemsa). Expression of surface antigens by peripheral blood lymphocyte was determined by immuno-fluorescence method with the use of monoclonal antibodies. The level of immunoglobulin in plasma was determined by radial immunodiffusion or Mancini method. To assess the phenotype of haptoglobin (Hp) we used the method of electrophoresis in starch gels. In the course of research we have detected the reduction of the relative and total number of lymphocytes regardless of haptoglobin phenotype in the group of students after physical training; this is a typical feature of the initial stages of stress response. We observed statistically reliable decrease in total number of analyzed subpopulations of T-lymphocyte in the group of students with phenotype Hp2-2 which was obviously the result of changes in the general level of lymphocytes in the peripheral blood. In the group of students with phenotype Hp1-1 absolute number of T-lymphocyte with phenotype CD3+ and CD4+ is reduced. In the group of students with phenotype Hp2-1 we have seen only the tendency to decrease in functional mature T-lymphocyte and their helper subpopulation. In the group of students with phenotype Hp2-2 the relative number of helper T-lymphocyte with the phenotype of CD4+ was reduced after moderate physical activity and it caused the decline in immune regulating index CD4+/CD8+. Changes of the level of B-lymphocyte with CD72+ phenotype were not found regardless of the haptoglobin phenotype. Analysis of the impact of moderate physical activity on major classes of serum immunoglobulin revealed the reduction of IgG level in the group of students with phenotype Hp2-2. Thus, we draw the conclusion that serum haptoglobin system shares the adaptive reactions of immune system to moderate physical activity. The most pressing phenotype is Hp2-2. Even in the group of

*Черкаський національний університет імені Богдана Хмельницького, бульвар Шевченка, 81, Черкаси, 18031, Україна.
Chercasy State University of Bohdan Khmelnytsky, Shevchenko str., 81, Chercasy, 18031, Ukraine.
Tel.: +38-067-869-17-91. E-mail: sokolenko@ukr.net*

students with immune pressing haptoglobin phenotypes, the analyzed parameters do not go beyond the homeostatic regulations after physical activity and it indicates satisfactory level of immune system adaptation to performed physical activity.

Keywords: haptoglobin; immune system; physical training

Вступ

Рівень рухової активності – важливий чинник формування стану здоров'я молоді, у тому числі осіб, які навчаються у вищих навчальних закладах. Про тісний зв'язок здоров'я та фізичної працездатності зі способом життя, обсягом і характером повсякденної діяльності повідомлялось у численних дослідженнях, які свідчать про те, що оптимальне фізичне навантаження разом із раціональним харчуванням і правильним способом життя є найефективнішим засобом подолання різноманітних відхилень у стані здоров'я, сприяють попередженню розвитку передпатологічних і патологічних станів (Gani et al., 2003). Стандартизувати такі умови досить складно, особливо у разі проживання студентів у гуртожитках. Вагому роль оптимізатора фізичних навантажень можуть виконувати заняття фізичною культурою. Ефективна система фізичного виховання студентів здатна істотно поліпшити здоров'я та фізичну підготовленість. Вона може бути забезпечена за рахунок такого використання засобів і методів, за якого формується довготривалий адаптаційний ефект до навантажень різної природи та інтенсивності (Suzdalnitskiy and Levando, 2003). У той же час не можна забувати про негативний вплив надмірних фізичних зусиль на природну резистентність (Chimenti et al., 2010; Сувиńska at al., 2010). Стан імунної системи, що формується у випадку фізичних перенавантажень і при порушенні процесів адаптації організму до них, можна охарактеризувати як виражений і стійкий вторинний імунодефіцит (Suzdalnitskiy and Levando, 2003; Moreira et al., 2006). Важливо сформулювати належні критерії адаптації організму молоді до фізичних навантажень (Gleeson, 2006).

До процесів імунорегуляції за умов екзогенних впливів включаються генетичні маркери крові, роль більшості з яких вивчена недостатньо. Зокрема, це стосується системи гаптоглобінів (Sadrzadeh and Bozorgmehr, 2004). Гаптоглобіни (Hr) – фракція білків гострої фази сироватки крові, найхарактернішою властивістю яких є здатність зв'язуватися з гемоглобіном. Гаптоглобін працює як антиоксидант і важливий захисник ендотелію судин. У 1955 році Smithies показав існування трьох типів гаптоглобінів, які позначають як Hr1-1, Hr2-1, Hr2-2. Пізніше було відкрито інші типи гаптоглобінів, але вони зустрічаються рідко (Sadrzadeh and Bozorgmehr, 2004; Quaye, 2008). Тобто система гаптоглобіну характеризується генетичним поліморфізмом. Досліджено функціональні відмінності між окремими фенотипами гаптоглобіну, що мають важливі біологічні та клінічні наслідки. Поліморфізм гаптоглобіну пов'язаний із клінічним розвитком багатьох інфекційних захворювань, атеросклерозом, цукровим діабетом, аутоімунними розладами. Ці явища пояснюються фенотипічно-залежною модуляцією оксидативного стресу та синтезу простагландинів (Levy et al., 2002; Niedowicz and Daleke, 2005; Alegranci et al., 2009). Підтверджена роль гаптоглобінів в імунній відповіді (Quaye, 2008; Mohieldein et al., 2012; Huntoon et

al., 2013). Спостерігаються відмінності за чутливістю осіб із різними фенотипами гаптоглобіну до екстремальних факторів середовища, зокрема, радіаційного впливу (Telnov and Zhuntova, 2002).

Вагомим критерієм адаптаційних процесів до фізичних навантажень може бути динаміка показників системи імунітету під час занять фізичною культурою, яка, у свою чергу, певною мірою залежить від імуногенетичних факторів крові. Це зумовило актуальність наших досліджень і визначило мету: з'ясувати роль фенотипу гаптоглобіну у реалізації адаптивних реакцій показників клітинної та гуморальної ланок імунітету на помірні фізичні навантаження, зумовлені заняттями фізичною культурою.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження показників клітинного та гуморального специфічного імунітету проводили у студентів другого курсу віком 18–20 років, які тривалий час проживали в однакових клімато-географічних умовах. Усі студенти на час обстеження не мали гострих чи хронічних захворювань і відвідували основну групу для занять фізичною культурою. Кількість обстежених – 60 осіб: із фенотипом Hr2-1 – 24, Hr1-1 – 21 і з фенотипом Hr2-2 – 15 осіб.

Аналіз показників імунної системи проводили у вересні, до та після занять фізичною культурою. Основною формою проведення навчально-тренувальних занять був 80-хвилинний оздоровчо-тренувальний процес, побудований за традиційною структурою, що включав вправи, передбачені державною програмою. Контрольний забір крові проводили за добу до навантаження. Другий забір здійснювали відразу після закінчення заняття. Рівень лейкоцитів підраховували в камері Горяєва, лімфоцитів – на основі кров'яного мазка (фарбування барвником Романовського – Гімза). Експресію поверхневих антигенів лімфоцитами периферичної крові визначали імунофлуорисцентним методом із застосуванням моноклональних антитіл до поверхневих маркерів клітин імунної системи LT3, LT4, LT8, 3F3 та F(ab)₂ – фрагментів овежих антитіл до IgG миші, мічених FITC («Сорбент», Москва). Рівень імуноглобулінів у плазмі крові визначали методом радіальної імунодифузії за Манчіні з використанням моноспецифічних сироваток проти IgG(H), IgM(H), IgA(H). Для оцінки фенотипу гаптоглобіну (Hr) застосовували метод електрофорезу в крохмальному гелі, для порівняння вибірок – однофакторний дисперсійний аналіз.

Результати та їх обговорення

У студентів після занять фізичною культурою незалежно від фенотипу гаптоглобінів достовірно знижувалося відносно та загальне число лімфоцитів (табл.). Згідно з даними літератури (Khaitov and Leskov, 2001; Shirinsky, 2001), зниження рівня лімфоцитів – типова ознака початкових стадій стресової реакції. Таку законо-

мірність можна узгодити з публікаціями, у яких обґрунтовується положення про фізичний і психоемоційний стрес як головну причину зриву адаптації у спортсменів, що знаходять своє безпосереднє відображення в імунних реакціях організму (Suzdalnitskiy and Levando, 2003).

Останнім часом у спортивних імунодефіцитах виділяють «компенсаторну» групу, що характеризується наростаючою різноспрямованістю імунологічних показників: зниженням одних і компенсаторним підвищенням інших (Suzdalnitskiy and Levando, 2003; Cywińska et al., 2010). Такий ефект схожий з отриманими нами результатами, проте у нашому випадку аналізовані показники як до, так і після фізичних навантажень перебували у межах фізіологічної гомеостатичної норми (табл.). Можна говорити, що наслідок занять фізичною культурою – фізіологічна компенсаторна реакція, яка, на відміну від тривалих і потужних стресових впливів, закінчується простим перерозподілом імунокомпетентних клітин. За даних умов імунітет зберігає здатність захищати організм на досить задовільному рівні за рахунок можливої активації механізмів його неспецифічної ланки (Khaïtov and Leskov, 2001; Suzdalnitskiy and Levando, 2003).

Аналіз показників Т-клітинної ланки імунітету включав оцінку експресії Т-лімфоцитами антигенів CD3, CD4, CD8 та імунорегуляторного індексу CD4+/CD8+. Функціональна роль молекули CD3 полягає в тому, що вона бере участь у передачі сигналу від Т-клітинного рецептора (ТКР) всередину клітини, стимулюючи процес її активації та проліферації. Комплекс ТКР-CD3 – найбільш специфічний маркер функціонально зрілих Т-лімфоцитів (Drannik, 1999; Yarilin, 1999). Антигени CD4 та CD8 є маркерами основних субпопуляцій Т-лімфоцитів. Хелперні Т-лімфоцити з фенотипом CD4+ – головні регуляторні клітини, що продукують різні типи цитокінів і стимулюють клітинну цитотоксичну або гуморальну відповідь (Drannik, 1999; Yarilin, 1999). Цитотоксичні Т-лімфоцити з фенотипом CD8+ спричинюють загибель інфікованих клітин та діють безпосередньо на інфекційні агенти. Частина з них може виконувати регуляторні функції. Зокрема, їм властиві імуносупресорні функції, тобто здатність обмежувати імунну відповідь, запобігати аутоагресії, визначати шляхи розвитку імунних процесів у бік гуморальної чи клітинної відповіді (Drannik, 1999; Yarilin, 1999).

Таблиця

Показники клітинного імунітету в обстежених із різними фенотипами гаптоглобіну до та після занять фізичним вихованням

Показники		Нр2-1	Нр1-1	Нр2-2
Лейкоцити, $\times 10^9/\text{л}$	до навантаження	6,64 \pm 0,105	6,71 \pm 0,231	6,72 \pm 0,144
	після навантаження	6,75 \pm 0,845	6,86 \pm 0,775	6,84 \pm 0,478
Лімфоцити, %	до навантаження	27,24 \pm 0,346	26,94 \pm 0,245	26,32 \pm 0,378
	після навантаження	25,17 \pm 0,444*	23,14 \pm 0,312*	20,12 \pm 0,425*
Лімфоцити, $\times 10^9/\text{л}$	до навантаження	1,82 \pm 0,089	1,78 \pm 0,102	1,74 \pm 0,099
	після навантаження	1,61 \pm 0,044*	1,51 \pm 0,051*	1,44 \pm 0,038*
CD3+, %	до навантаження	65,75 \pm 0,245	65,35 \pm 0,212	65,12 \pm 0,289
	після навантаження	65,17 \pm 0,415	64,99 \pm 0,387	63,45 \pm 0,215*
CD3+, $\times 10^9/\text{л}$	до навантаження	1,17 \pm 0,034	1,15 \pm 0,045	1,14 \pm 0,089
	після навантаження	1,12 \pm 0,035	0,99 \pm 0,024*	0,91 \pm 0,021*
CD4+, %	до навантаження	36,41 \pm 0,412	35,87 \pm 0,512	35,45 \pm 0,412
	після навантаження	35,64 \pm 0,345	34,99 \pm 0,415	33,41 \pm 0,289*
CD4+, $\times 10^9/\text{л}$	до навантаження	0,65 \pm 0,028	0,62 \pm 0,035	0,62 \pm 0,045
	після навантаження	0,60 \pm 0,024	0,52 \pm 0,014*	0,49 \pm 0,010*
CD8+, %	до навантаження	25,09 \pm 0,421	25,99 \pm 0,421	26,12 \pm 0,465
	після навантаження	25,34 \pm 0,312	25,45 \pm 0,312	27,09 \pm 0,415
CD8+, $\times 10^9/\text{л}$	до навантаження	0,43 \pm 0,021	0,45 \pm 0,034	0,47 \pm 0,045
	після навантаження	0,41 \pm 0,018	0,39 \pm 0,015	0,35 \pm 0,010*
CD4+/CD8+	до навантаження	1,48 \pm 0,034	1,41 \pm 0,084	1,40 \pm 0,065
	після навантаження	1,42 \pm 0,045	1,36 \pm 0,045	1,21 \pm 0,025*
CD72+, %	до навантаження	9,91 \pm 0,171	9,64 \pm 0,215	10,15 \pm 0,287
	після навантаження	10,12 \pm 0,132	9,99 \pm 0,315	10,01 \pm 0,145
CD72+, $\times 10^9/\text{л}$	до навантаження	0,18 \pm 0,008	0,16 \pm 0,015	0,19 \pm 0,098
	після навантаження	0,17 \pm 0,009	0,15 \pm 0,008	0,17 \pm 0,045
IgG, мг/мл	до навантаження	10,01 \pm 0,213	9,97 \pm 0,314	9,91 \pm 0,478
	після навантаження	9,45 \pm 0,312	9,15 \pm 0,315	8,45 \pm 0,245*
IgM, мг/мл	до навантаження	1,62 \pm 0,112	1,57 \pm 0,214	1,65 \pm 0,514
	після навантаження	1,61 \pm 0,099	1,59 \pm 0,113	1,62 \pm 0,215
IgA, мг/мл	до навантаження	1,81 \pm 0,093	1,84 \pm 0,105	1,84 \pm 0,214
	після навантаження	1,82 \pm 0,123	1,81 \pm 0,088	1,80 \pm 0,097

Примітка: * – $P < 0,05$.

У випадку розвитку дисбалансу між кількістю та активністю CD4+ та CD8+ клітин механізми імунної відповіді будуть порушені. Тому ці субпопуляції Т-лімфоцитів відносяться до імунорегуляторних клітин, співвід-

ношення яких визначає силу імунної відповіді (Drannik, 1999; Yarilin, 1999).

Згідно з даними літератури, фізичні навантаження високої інтенсивності пригнічують переважно Т-систему імунітету. Це виражається у зниженні відносної та

абсолютної кількості Т-лімфоцитів, їх метаболічної та функціональної активності. При імунodefіциті, що виникає у разі фізичного перенавантаження та перетренованості, разом із загальним пригніченням Т-системи імунітету спостерігається порушення взаємозв'язків між різними субпопуляціями імунокomпетентних клітин (Suzdalnitskiy and Levando, 2003; Moreira et al., 2006). У наших дослідженнях після занять фізичним вихованням спостерігається достовірне зниження загального числа всіх аналізованих субпопуляцій Т-лімфоцитів (без виходу за межі норми) у студентів, які мають фенотип Нр2-2, що, очевидно, є наслідком змін загального рівня лімфоцитів у периферичній крові. В обстежених із фенотипом Нр1-1 знижується абсолютне число Т-лімфоцитів із фенотипами CD3+ та CD4+. В обстежених із фенотипом Нр2-1 спостерігається лише тенденція до зниження рівня функціонально зрілих Т-лімфоцитів та їх хелперної субпопуляції (табл. 1).

Аналіз відносного числа показників, який, по суті, відображає функціональний стан Т-клітинної ланки імунітету, продемонстрував відсутність статистично достовірних змін в обстежених із фенотипами Нр1-1 та Нр2-1. Спостерігається тенденція до зниження відносного числа функціонально зрілих Т-лімфоцитів із фенотипом CD3+ та їх регуляторної субпопуляції з фенотипом CD4+ на фоні практично відсутніх змін відсотка Т-клітин із фенотипом CD8+ (див. табл.). Це, у свою чергу, викликало тенденцію до зниження індексу імунореактивності (не має статистично достовірної значимості). Після занять фізичним вихованням стан Т-клітинної ланки імунітету в цих обстежених залишається на задовільному рівні.

В обстежених із фенотипом Нр2-2, після помірних фізичних навантажень, вірогідно знижується відносне число хелперних Т-лімфоцитів із фенотипом CD4+, що зумовило зниження у них імунорегуляторного індексу CD4+/CD8+ (див. табл.).

Ми проаналізували вплив помірних фізичних навантажень на сироватковій імуноглобуліні. За даними літератури, надмірні навантаження викликають накопичення в крові великих кількостей проміжних продуктів обміну, внаслідок чого відбувається значний зсув кислотно-лужної рівноваги у кислий бік та істотне підвищення температури. Це викликає активацію ряду ферментів, у тому числі протеаз, здатних руйнувати на дрібні фрагменти структуру імуноглобулінових молекул, що викликає зниження їх рівня. Паралельно зі зміною *pH* відбувається посилений викид імунотропних гормонів, які можуть зв'язуватися з альбуміном і глобулінами. Цей процес супроводжується подальшим зниженням рівня імуноглобулінів. Повна елімінація імуноглобулінів із сироватки відбувається у результаті їх сорбції (фіксації) численними рецепторами, у тому числі Fc на клітинах крові та багатьох інших клітинах організму (Gleeson, 2006).

Зниження рівня всіх класів імуноглобулінів – законoмірний наслідок інтенсивних фізичних навантажень. В окремих дослідженнях є дані про можливе підвищення рівня IgA на фоні зниження рівня інших класів (Suzdalnitskiy and Levando, 2003; Moreira et al., 2006).

IgG – головний клас сироваткових антитіл за вторинної імунної відповіді. Володіє здатністю проникати через плацентарний бар'єр, тому у перші тижні життя

новонароджених є головним засобом їх захисту від інфекцій. Має велике значення для опсонізації бактеріальних токсинів та мікроорганізмів. Концентрація IgG найвища серед імуноглобулінів у сироватці крові. Володіючи високою специфічністю, IgG бере активну участь в імунній відповіді і, одночасно, регулює її, впливаючи на активність інших механізмів імунної відповіді (клітинного та гуморального), визначаючи, в кінцевому результаті, повноцінність імунної відповіді (Drannik, 1999; Yarilin, 1999).

IgA – присутній у сироватці крові у мономерній формі, димерна форма міститься переважно в секретах слизових оболонок і захищає їх від проникнення інфекції. Сироватковий IgA здатний знешкоджувати мікроби та токсини, що циркулюють у крові, проте його дія слабкіша, ніж секреторного IgA (Drannik, 1999; Yarilin, 1999).

IgM – перший бар'єр на шляху інфекції. Еволюційно він з'явився раніше, ніж інші класи імуноглобулінів. На мембрані В-лімфоциту існує у вигляді мономера, є типовим антигенспецифічним рецептором цих клітин. Після активації В-лімфоцити секретують спочатку пентамерний IgM, а потім переключаються на IgG або інші класи імуноглобулінів. Зі збільшенням синтезу IgG та зростанням його титру різко гальмується синтез малоспецифічних IgM, який регулюється лише рівнем відповідного за специфічністю IgG. Синтез IgM, оскільки в ньому не беруть участі Т-лімфоцити, резистентний до дії імунодепресантів і опромінення (Drannik, 1999; Yarilin, 1999).

У нашому випадку після помірних фізичних навантажень вірогідні зміни рівня імуноглобулінів виявлені лише для IgG: в обстежених із фенотипом Нр2-2 показник знижується. В обстежених з іншими фенотипами демонструє лише тенденцію до зниження (див. табл.).

Ми проаналізували також вплив помірних фізичних навантажень на рівень В-лімфоцитів, що експресують антиген CD72. Молекула CD72 є рецептором для IgM і лігандом для молекул CD5, розміщених на Т-клітинах, забезпечує ефективний контакт із хелперними Т-лімфоцитами. Функціонально зрілі В-лімфоцити є попередниками антитілопродукувальних плазматичних клітин, і, відповідно, клітинним фактором гуморального специфічного імунітету (Drannik, 1999; Yarilin, 1999). Виявлено відсутність вірогідних змін відсотка та абсолютного числа клітин із фенотипом CD72+, незалежно від фенотипу гаптоглобіну (див. табл. 1). Відповідно, ще раз підтверджуються дані літератури, згідно з якими фізичні навантаження високої інтенсивності пригнічують переважно Т-систему імунітету та практично не впливають на В-ланку у початковій стадії адаптаційного процесу (Suzdalnitskiy and Levando, 2003; Moreira et al., 2006).

Отримані результати узгоджуються з більшістю сучасних досліджень, які демонструють пресинг гомозиготних фенотипів Нр (особливо фенотипу Нр2-2) на фізіологічні процеси. Вплив гаптоглобіну на регуляцію імунної відповіді можна пояснити його включенням у різні функції імунокomпетентних лімфоцитів, гранулоцитів і моноцитів (Sadzadeh and Bozorgmehr, 2004; Mogarekar and Hampe, 2013).

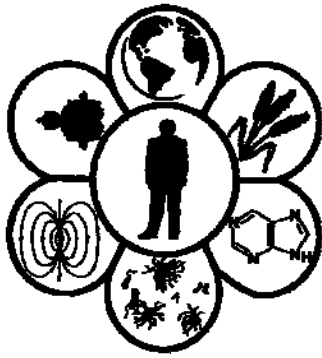
Висновки

Сироваткова система гаптоглобінів Hp може включатися в адаптивні реакції показників імунної системи на помірні фізичні навантаження. Найбільш пресингровим для імунної системи за умов фізичних навантажень є фенотип Hp2-2. Навіть в осіб з імунопресингровими фенотипами гаптоглобіну аналізовані показники після занять фізичним вихованням не виходять за межі гомеостатичної норми. Це свідчить про задовільний рівень адаптації імунної системи до виконаного обсягу фізичних навантажень.

Бібліографічні посилання

- Alegranci, P., de Mattos, L.C., de Godoy, M.F., Moreira, H.W., 2009. Haptoglobin polymorphism correlated with coronary artery disease. *Arch. Med. Sci.* 5, 32–37.
- Chimenti, L., Morici, G., Patern, A., Santagata, R., Bonanno, A., Riccobono, L., Bellia, V., Bonsignore, M., 2010. Bronchial epithelial damage after a half-marathon in nonasthmatic amateur runners. *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.* 298(6), 857–862.
- Цувіńska, А., Wyszynska, Z., Gyrecka, R., Szarska, E., Witkowski, L., Dziekan, P., Winnicka, A., Schollenberger, A., 2010. The effect of the 162 km endurance ride on equine peripheral blood neutrophil and lymphocyte functions. *Pol. J. Vet. Sci.* 13(2), 279–285.
- Drannik, G.N., 1999. Clinical immunology and allergology [Klinicheskaja immunologija i allergologija]. Astroprint, Odessa (in Russian).
- Gani, F., Passalacqua, G., Senna, G., Mosca Frezet, M., 2003. Sport, immune system and respiratory infections. *Eur. Ann. Allergy Clin. Immunol.* 35(2), 41–46.
- Gleeson, M., 2006. Immune system adaptation in elite athletes. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 9(6), 659–965.
- Huntoon, K., Russell, L., Tracy, E., Barbour, K., Li, Q., Shrikant, P., Berger, F., Garrett-Sinha, L., Baumann, H., 2013. A unique form of haptoglobin produced by murine hematopoietic cells supports B-cell survival, differentiation and immune response. *Mol. Immunol.* 55(3), 345–354.
- Khaitov, R.M., Leskov, V.P., 2001. Immunity and stress [Immunitet i stress]. *Ros. Fiziol. Zh.* 87(8), 1060–1072 (in Russian).
- Levy, A.P., HocHperg, I., Jablonski, K., Resnick, H.E., Lee, E.T., Best, L., 2002. Haptoglobin phenotype is an independent risk factor for cardiovascular disease in individuals with diabetes the strong heart study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 40(11), 1984–1990.
- Mogarekar, M.R., Hampe, M.H., 2013. Haptoglobin2-2 phenotype is an additional risk factor of retinopathy in type 2 diabetes mellitus. *Ind. J. Hum. Genet.* 19(2), 154.
- Mohieldein, A., Alzohairy, M., Hasan, M., Khan, A., 2012. Inflammatory markers and haptoglobin polymorphism in Saudi with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Glob. J. Health Sci.* 5(1), 135.
- Moreira, A., Kekkonen, R., Delgado, L., Fonseca, J., Korpela, R., Haahtela, T., 2006. Nutritional modulation of exercise-induced immunodepression in athletes: A systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Clin. Nutr.* 61(4), 443–460.
- Niedowicz, D., Daleke, D., 2005. The role of oxidative stress in diabetic complications. *Cell Biochem. Biophys.* 43(2), 289–330.
- Quaye, I.K., 2008. Haptoglobin, inflammation and disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102(8), 735–742.
- Sadrzadeh, S.H., Bozorgmehr, J., 2004. Haptoglobin phenotypes in health and disorders. *Am. J. Clin. Pathol. Patter. Rev.* 121(1), 97–104.
- Shirinsky, I., 2001. Social stress disorders and immunity. *Russ. J. Immunol.* 6(2), 207–214.
- Suzdalnitskiy, R.S., Levando, V.A., 2003. Novye podhody k ponimaniju sportivnyh stressovyh immunodeficitov [New approaches to understanding of sports and stress immune deficiency]. *Teorija i Praktika Fizicheskoy Kul'tury* 1, 26–31 32 (in Russian).
- Tel'nov, V.I., Zhuntova, G.V., 2002. Genotipicheskij analiz biohimicheskogo statusa u ljudej, obluchennyh v znachitel'nyh dozah [Genotypic analysis of biochemical status of people received radioactive irradiation]. *Voprosy Med. Himii* 44(5), 56–60 (in Russian).
- Yarilin, A.A., 1999. Immunology fundamentals [Osnovy immunologii]. Medicina, Moscow (in Russian).

Надійшла до редколегії 24.04.2014



УДК 579.842.1

Механізми стійкості до антибіотиків представників родини Enterobacteriaceae

К.Р. Коцюба, О.С. Воронкова, А.І. Вінніков, Т.М. Шевченко

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпропетровськ, Україна

Наведено характеристику ентеробактерій та показано їх роль у патології людини. Проаналізовано відомості про головні напрями антибіотикотерапії уражень, зумовлених представниками родини Enterobacteriaceae, подано матеріали про проблеми антибіотикотерапії, пов'язані з поширенням серед них детермінант резистентності до антибіотиків. Лікування ентеробактеріальних інфекцій здійснюється із використанням бета-лактамів, хінолонів, аміноглікозидів і ряду препаратів вузьконаправленої дії. Лікуванню обов'язково повинні передувати ідентифікація збудника, бо серед ентеробактерій існує феномен природної стійкості до ряду препаратів, та дослідження рівня чутливості кожного конкретного ізоляту до антибіотиків через значне поширення стійкості до багатьох із них. Таке дослідження необхідне для розробки схеми раціональної антибіотикотерапії та недопущення подальшого поширення детермінант резистентності всередині та поза межами групи. У зв'язку з цим особливого значення набуває питання контролю за рівнем розповсюдження антибіотикостійких ізолятів у лікарнях і лікувально-профілактичних закладах, що потребує постійного контролю з боку відповідних органів.

Ключові слова: ентеробактерії; антибіотикотерапія; стійкість до антибіотиків

Mechanisms of antibiotic resistance of Enterobacteriaceae family representatives

K.R. Kotsyuba, O.S. Voronkova, A.I. Vinnikov, T.M. Shevchenko

Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Dnipropetrovsk, Ukraine

The paper deals with the basic medical scheme of antibiotics use for treatment of lesions caused by enterobacteria and mechanisms of resistance of Enterobacteriaceae to different classes of antibiotics. It is known that the main mechanisms of resistance to antibiotics are enzymatic inactivation, modification of the target, efflux, violation of conduct through the membrane and formation of metabolic shunt. The most common cases of resistance to beta-lactams among Enterobacteriaceae relate to production of plasmid and chromosomal beta-lactamases, violation of the permeability of the outer membrane, and modification of target penicillin binding proteins. Active release of antibiotics from the cell, or efflux, in Enterobacteriaceae is used for maintaining resistance to tetracyclines, macrolides, carbapenems. Genes of efflux system are localized on plasmids and contribute to rapid spreading among Enterobacteriaceae. Mutations are the basis of resistance to novobiocinum and rifampicinum. Enzymatic inactivation by modifying is typical for resistance to aminoglycosides. Three groups of enzymes are engaged in the process, by adding the molecule of acetic acid, phosphate or adenine. Joining of these groups is irreversible and leads to complete loss of biological activity of the antibiotic. Resistance to aminoglycosides appears also due to inhibition of drug penetration, that is associated with genetically determined mechanisms of electron transport through the membrane. Resistance to quinolones and fluoroquinolones is associated with the modification of topoisomerase II and IV which are targets of these groups of antibiotics. Resistance is possible as a result of changes in the structure of the target, breaching of penetration into the cell, and active release from the cell. The highest level of resistance is developed in the case of two- or three-stage mutations in one or the other, or both, subunits in different genes. At the same time, for breaching of the bacterial cell it is enough to suppress the activity of only one enzyme associated with different functions of both topoisomerases. Another mechanism of resistance to quinolones is the reduction of permeability through bacterial outer membrane, that is possible due to decreasing of permeability of porine channels. In this case, decreasing of permeability efficacy takes place not only for quinolones, but also for other classes of antibiotics. In addition, reduced sensitivity to quinolones efflux may play the significant role. For clinical strains of microorganisms, cross-resistance to various drugs, associated with simultaneous production of various enzymes that inactivate antibiotics, is typical.

Keywords: enterobacteria; antibiotic therapy; antibiotic resistance

Вступ

Структура інфекційної патології людини останніми десятиліттями суттєво змінюється не лише через зміну в ній питомої частки захворювань, зумовлених добре відомими збудниками, а і завдяки ролі, яку стали відігравати нові інфекційні агенти, кількість яких невпинно зростає за рахунок умовно-патогенних мікроорганізмів (Sidorenko, 2003; Tsiganenko and Girich, 2009). Представники родини Enterobacteriaceae – невід’ємна складова біосфери. Завдяки полібіотрофії та адаптаційній пластичності вони широко розповсюджені в об’єктах навколишнього середовища абіотичної природи, в організмах рослин і тварин. Життєдіяльність цих бактерій суттєво впливає на різні сфери діяльності людини. Упродовж усього періоду розвитку медичної мікробіології ентеробактерії постійно були об’єктом підвищеної уваги фахівців наукових установ і практичних закладів охорони здоров’я. Причина цього – надзвичайний поліморфізм клінічного перебігу інфекційного процесу (можуть уражатись усі системи та органи людського організму) та постійно високий рівень захворюваності, спричинений цією групою бактерій, у тому числі внутрішньогоспітальних інфекцій (Pozdeev, 2001; Vorobyov, 2004).

Різноманіття біологічних властивостей ентеробактерій значно ускладнює етіологічну лабораторну діагностику зумовлених ними захворювань. Найбільші труднощі становлять нові (вперше описані) та маловивчені види через обмеженість відомостей про біоекотопи та ареали їх циркуляції, біологічні властивості (у тому числі їх патогенний потенціал і санітарно-бактеріологічне значення), недостатню розробленість методів виділення та ідентифікації цих мікроорганізмів (Pozdeev, 2001; Bao et al., 2013).

Enterobacteriaceae – велика родина бактерій, що включає такі відомі патогенні бактерії як *Salmonella*, *Escherichia coli* (ентеропатогенні), *Yersinia pestis* тощо. Безліч представників родини є частиною нормальної мікрофлори людей і тварин, тоді як інші мешкають у ґрунті, воді або паразитують на різних рослинах і тваринах. Більшість симбіотичних (зокрема паразитичних) видів родини використовують численні ворсинки I типу для адгезії до клітин хазяїна (Decousser et al., 2003; Bonelli et al., 2014).

Протягом останніх 15–20 років зросло значення різних ентеробактерій у патології людини. Насамперед це пов’язано з набуттям ентеробактеріями значної кількості детермінант резистентності до антибіотиків, якими вони активно обмінюються між штамми (Sidorenko, 2003; Bao et al., 2013).

Сучасний етап розвитку медичної науки та практики характерний виникненням проблеми умовно-патогенних мікроорганізмів та їх ролі у патології людини. За певних умов у так званих групах ризику етіологічного значення можуть набувати найрізноманітніші опортуністичні бактерії. У виникнення умовно-патогенних мікроорганізмів виявились втягнутими численні роди кишкових бактерій – *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Yersinia* тощо. Це пред’являє суттєво більші вимоги до діяльності медичних бактеріологів, до їх роботи з ідентифікації та диференціальної діагностики

численних членів родини Enterobacteriaceae. Великого значення ця група бактерій останнім часом також набуває через значне поширення серед її представників детермінант резистентності до антибіотиків, що значно ускладнює терапію певних типів уражень (Pozdeev, 2001; Shapiro, 2002).

Мета роботи полягає в огляді відомостей про проблему антибіотикорезистентності ентеробактерій, що мають клінічне значення.

Лікування уражень, зумовлених ентеробактеріями

Основа хіміотерапії ешерихіозів складає призначення ефективних антимікробних засобів (ампіцилін, котримоксазол, норфлоксацин тощо). Для лікування інфекцій сечовивідних шляхів також використовують цефалоспоринони та аміноглікозиди. Засобів специфічної імунoproфілактики немає. Профілактика колі-інфекції спрямована на дотримання санітарно-гігієнічних правил, попередження інфікування продуктів харчування та розмноження в їжі мікроорганізмів, знищення прониклих мікробів за допомогою термічної обробки (Shapiro, 2002; Sidorenko, 2003).

Лікування тяжких ентеробактеріальних інфекцій ґрунтується на застосуванні бета-лактамів, хінолонів, аміноглікозидів і ряду препаратів вузьконаправленої дії (у зв’язку з особливостями фармакокінетики окремих антибіотиків у шлунково-кишковому тракті та сечовивідних шляхах, а також із відмінностями їх клінічної ефективності). Окрім даних про чутливість збудників, під час вибору конкретних препаратів необхідно орієнтуватися також на особливості нозологічної форми та тяжкості перебігу процесу (Beloborodova et al., 2000; Stratchounski et al., 2007). Практично в усіх представників родини Enterobacteriaceae, за винятком сальмонел, до складу хромосом входять гени бета-лактамаз. Схема природної чутливості ентеробактерій до бета-лактамічних антибіотиків є фундаментом сучасної хіміотерапії інфекцій, викликаних цими мікроорганізмами. Проте слід мати на увазі, що набута резистентність може повністю змінити цю картину. Саме з метою визначення набутої стійкості проводяться мікробіологічні дослідження (Greenwood, 1998; Bereznyakov, 2001; Decousser, 2003).

До природних препаратів пеніцилінового ряду, що вважаються найбезпечнішими для людини, чутливі тільки деякі грампозитивні бактерії; кишкова паличка та інші грамнегативні мікроорганізми стійкі. Тому призначення природних пеніцилінів при інфекціях, зумовлених ентеробактеріями, не обґрунтоване. Водночас, амінопеніциліни характеризуються значною природною активністю проти деяких грамнегативних бактерій (*E. coli*, *Proteus mirabilis* тощо). Але їх застосування потребує моніторингу стійкості до них.

Цефалоспоринони I покоління слабо діють на *E. coli*, щодо інших ентеробактерій практично не активні. Цефалоспоринони II покоління за активністю проти кишкової палички та рівня набутої стійкості поступаються фторхінолонам і пероральним цефалоспорином III покоління, тому не розглядаються як засоби вибору для лікування інфекцій, викликаних ентеробактеріями. Препарати III покоління проявляють високу активність проти

грамнегативних мікроорганізмів, тому часто призначаються. Рівень стійкості *E. coli* до цефіксиму та цефтибутену < 5%, тому ці антибіотики можуть вважатися одними з найефективніших. Цефалоспорини IV покоління цікаві при терапії уражень, викликаних госпітальними штамми, серед яких відмічається менший рівень стійкості до них (Gupta and Bhadelia, 2013).

До карбапенемів відмічається найменший рівень стійкості госпітальних штамів Enterobacteriaceae, тому їх використовують лише у разі виділення мультирезистентних грамнегативних збудників.

Аміноглікозиди проявляють високу природну активність проти грамнегативних бактерій, однак їх застосування лімітує потенційна нефротоксичність. Їх використовують у разі виявлення стійкості до безпечніших препаратів, призначення аміноглікозидів в амбулаторній практиці вважається абсолютно не припустимим.

Грамнегативні бактерії мають природну стійкість до макролідів, тому їх призначення для лікування інфекцій, викликаних ентеробактеріями, безглузде. Те ж саме стосується лінкозамідів, які не діють на грамнегативні бактерії.

Доксициклін (препарат із групи доксициклінів) має високу природну активність проти кишкової палички та деяких ентеробактерій. Однак зараз значення доксицикліну обмежене через наявність ефективніших і безпечніших антибіотиків. Доксициклін розглядається здебільшого як препарат вибору.

Нефторовані хінолони проявляють виняткову активність щодо грамнегативних мікроорганізмів і до появи фторованих хінолонів їх розглядали як засоби вибору за багатьох інфекцій, зумовлених грамнегативними мікроорганізмами. У даний час їх значення у практиці обмежене. Фторхінолони I покоління проявляють високу природну активність проти Enterobacteriaceae. Серед ранніх фторхінолонів максимальну активність проти грамнегативних бактерій проявляє ципрофлоксацин. Однак на вибір цих препаратів впливає рівень набуті резистентності. Для позалікарняних штамів рівень стійкості до фторхінолонів невисокий (до всіх препаратів приблизно однаковий), а в госпітальних штамів грамнегативних бактерій він істотно варіює у різних медичних установах. Обмеженням використання фторхінолонів є їх шкідлива дія на зростаючий хрящ, у зв'язку з чим ці препарати не можна призначати вагітним жінкам і дітям до 16 років. Фторхінолони II покоління мають подібну з ранніми фторхінолонами активність проти грамнегативних бактерій (Gupta and Bhadelia, 2013; Yakovlev, 2004).

Нітрофурани мають широкий спектр дії відносно більшості ентеробактерій. До переваг цих препаратів слід віднести невисокий рівень стійкості позалікарняних штамів *E. coli*.

Ко-тримоксазол – позагруповий препарат, що проявляє активність проти Enterobacteriaceae. Однак останнім часом відмічається зростання стійкості позалікарняних і госпітальних штамів *E. coli* та інших ентеробактерій до нього, що знижує його терапевтичну цінність. Крім того, препарат може викликати серйозні побічні ефекти.

Ще один позагруповий препарат фосфоміцин характеризується високою активністю проти *E. coli* та інших ентеробактерій (Yakovlev, 2004).

Лікування уражень, викликаних ентеробактеріями, багато в чому залежить від характеру зараження, а також від ділянки ураження. Спочатку пацієнту потрібно здати аналізи для того, щоб визначити вид збудника, адже серед ентеробактерій поширений феномен природної стійкості до ряду препаратів. Крім того, лабораторне дослідження обов'язково має включати антибіотикограму – аналіз чутливості досліджуваного мікроорганізму до антибіотиків. Нині відома велика кількість різноманітних антибіотиків, і з цієї причини оптимальним варіантом для розробки схеми раціональної терапії ураження може бути перевірка чутливості бактерій до дії певного препарату. Результати антибіотикограми дозволяють обрати з ряду препаратів найефективніший і найменше шкідливий для організму людини (Yakovlev, 2004; Stratchounski et al., 2007).

Механізми антибіотикорезистентності ентеробактерій

Загалом слід зазначити, що ентеробактерії – один із найпроблемніших збудників інфекцій серед умовно-патогенних мікроорганізмів саме через значну поширеність серед них генів резистентності. Як серед позалікарняних, так і серед внутрішньолікарняних інфекцій – кишкової та позакишкової локалізації (інфекції сечовивідних, дихальних шляхів, інтраабдомінальні, шкіри та м'яких тканин, а також генералізовані) доволі часто трапляються випадки, зумовлені множинностійкими ентеробактеріями.

Основними механізмами стійкості до бета-лактамних антибіотиків в ентеробактерій є продукція плазмідних і хромосомних бета-лактамаз, порушення проникності зовнішньої мембрани, модифікація мішені пеніцилінз'язувальних білків – ПЗБ (Beloborodova, 2000; Bereznyakov, 2001; Bao et al., 2013).

Продукція бета-лактамаз зумовлює приблизно 80% випадків стійкості до бета-лактамних антибіотиків серед ентеробактерій. Здатність до продукції цих ферментів виявлена у багатьох представників родини. Нині описано понад 200 ферментів, що розрізняються за субстратним профілем (здатність до переважного гідролізу тих або інших бета-лактамів, наприклад пеніцилінів або цефалоспоринів, або тих і інших рівною мірою), локалізацією генів, що кодують стійкість (плазмідна або хромосомна) (Livermore, 2005; Lee et al., 2013; Pfaller et al., 2014).

У разі плазмідної локалізації генів відбувається швидке внутрішньо- та міжвидове поширення резистентності, хромосомної – спостерігається поширення резистентного клону (Nilsen et al., 2013), чутливість до інгібіторів, що застосовуються в медичній практиці: клавуланової кислоти, сульбактаму та тазобактаму (Stratchounski et al., 2007).

Серед грамнегативних бактерій продукція бета-лактамаз – одна з найчастіших причин резистентності. Бета-лактамази грамнегативних мікроорганізмів поділяють на дві групи: кодовані плазмідними або хромосомними генами. Нині найбільше значення для клінічної практики мають плазмідні бета-лактамази розширеного спектра (БЛРС) грамнегативних бактерій, оскільки вони здатні руйнувати усі бета-лактамні антибіотики, включаючи цефалоспорини III і меншою мірою IV покоління;

винятком є тільки карбапенеми (Stratchounski et al., 2007; Cochard et al., 2014; Pfaller et al., 2014). Розвиток плазмідної резистентності нерідко пов'язаний із використанням ампіциліну та цефалоспоринов III покоління (усі цефалоспоринов III покоління створюють проблеми резистентності, навіть якщо їх призначають у невеликих кількостях) (Thibaut et al., 2014; Veldman et al., 2014). Звичайні лабораторні методи оцінки чутливості до антибіотиків нерідко не виявляють цього механізму стійкості. Частіше усіх БЛРС зустрічаються в мікроорганізмів роду *Klebsiella*, досить часто – у *E. coli* та *Proteus spp.*, рідше – в інших грамнегативних бактерій (Stratchounski et al., 2007; Cochard et al., 2014).

Хромосомні бета-лактамази, як правило, виробляються в невеликих кількостях (Decousser et al., 2003; Grover et al., 2012). Проте під впливом деяких бета-лактамних антибіотиків їх синтез різко зростає. Із цим пов'язаний механізм резистентності до амінопеніцилінів і цефалоспоринов I покоління у *Enterobacter cloacae*, *Serratia spp.*, *Citrobacter spp.*, *Proteus spp.* (Thibaut et al., 2014; Veldman et al., 2014). Вищевказані антибіотики є сильними індукторами ферментів, вони високочутливі до гідролізу. *Enterobacter cloacae* здатний до гіперпродукції хромосомних бета-лактамаз, із чим і пов'язана стійкість до більшості бета-лактамних антибіотиків, за винятком карбапенемів (Lee et al., 2013). Клебсієли продукують бета-лактамази розширеного спектра, чим також зумовлена стійкість до більшості цефалоспоринов (окрім цефаміцинів) при збереженні чутливості до карбапенемів (Nakamura et al., 2014; Veldman et al., 2014). Проте карбапенеми не є винятком із загального правила. До них також можливе формування резистентності, пов'язаної з продукцією карбапенемаз (Liu et al., 2014).

Стійкість до бета-лактамних антибіотиків, пов'язана з порушенням проникності клітинної оболонки, характеризується раповим або поступовим розвитком перехресної резистентності одного виду бактерій до інших антибіотиків. Виникнення цього типу стійкості пов'язане з використанням аміноглікозидів і бета-лактамних антибіотиків для лікування інфекцій, викликаних ентеробактеріями (Greenwood, 1998). Зовнішня мембрана грамнегативних мікроорганізмів є перешкодою для проникнення бета-лактамів усередину клітини. Транспорт антибіотика через зовнішню мембрану до чутливих мішеней здійснюється через воронкоподібні білкові структури, що дістали назву «поринові канали» (Nikaido and Normark, 1987; Nikaido et al., 1991). У результаті мутацій можлива повна або часткова втрата поринів, що спричинює різною мірою виражене зниження чутливості до бета-лактамних антибіотиків (Nikaido et al., 1991).

Антибіотики пеніцилінового ряду мають різну активність до різних видів. У межах родини ентеробактерій виділені три групи мікроорганізмів, які різняться за природною чутливістю до пеніцилінів: I група – *E. coli*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Proteus mirabilis*; II група – *Klebsiella spp.*, *Proteus vulgaris*, *Citrobacter diversus*; III група – *Enterobacter spp.*, *Citrobacter freundii*, *Serratia spp.*, *Morganella morganii*, *Providencia stuartii*, *Providencia rettgeri* (Vorobyov, 2004). На відміну від грампозитивних бактерій, протективні властивості ПЗБ у грамнегативних бактерій виражені слабо (в ентероба-

ктерій вони майже повністю відсутні) (Bereznyakov, 2001). Активне виведення антибіотиків із клітини, або ефлюкс, має місце й у ентеробактерій. Однак активність цього процесу різна в окремих видів. Такий механізм стійкості бактерій має місце відносно тетрациклінів, макролідів, карбапенемів і посідає помітне місце у підвищенні загальної резистентності мікроорганізмів. Гени, відповідні за кодування транспортних систем активного винесення із клітин антибіотиків, звичайно локалізовані на плазмідах, що сприяє їх швидкому поширенню всередині родини, особливо серед мікроорганізмів різних видів, які перебувають у єдиному біотопі (Kohler et al., 1997; Bao et al., 2013).

У результаті різних мутагенних впливів на чутливу до того або іншого антибіотика мікробну клітину можна отримати мутант зі зміненою ферментною системою, що є мішенню для антибіотика. Такий мутант може виявитися резистентним до антибіотика. Аналогічним шляхом отримані резистентні мутанти *E. coli* до таких антибіотиків як новобіоцин, рифаміцин і деякі інші (Drees et al., 2014; Randrianirina et al., 2014).

Подібний до механізмів стійкості до пеніцилінів і механізм стійкості до аміноглікозидів: у клітині відбувається їх ферментативна інактивація шляхом модифікації. Модифіковані молекули аміноглікозидів втрачають здатність зв'язуватися з рибосомами та пригнічувати синтез білка. Описано три групи ферментів, які здійснюють таку інактивацію шляхом зв'язування з різними молекулами: ААС-ферменти приєднують молекулу оцтової кислоти, АРН-ферменти приєднують фосфат, нуклеотид- або АНТ-ферменти приєднують молекулу нуклеотиду аденіну. Приєднання цих груп необоротне, воно спричинює втрату біологічної активності антибіотика (Sidorenko et al., 1998).

Механізми, що визначають стійкість ентеробактерій до аміноглікозидів за рахунок модифікації препаратів, набуті (Miller, 1996). Також існують і природні механізми стійкості, які реалізуються за рахунок гальмування проникнення препарату. В останньому випадку значення мають генетично зумовлені механізми електронного транспорту через мембрану. Проходженню аміноглікозидами цитоплазматичної мембрани сприяє система електронного транспорту. Підтвердженням цього вважають високу резистентність до аміноглікозидів в анаеробних бактерій, дефіцитних по електронтранспортній системі, що може мати місце в ентеробактерій, які зростають в анаеробних умовах (Miller, 1996; Vorobyov, 2004).

Для клінічних штамів мікроорганізмів характерна частково перехресна резистентність до різних препаратів, що пов'язано з можливістю одночасної продукції різних ферментів, які інактивують аміноглікозиди. Резистентність до канаміцину, як правило, сполучається зі стійкістю до мономіцину. Грамнегативні мікроорганізми, що проявляють резистентність до стрептоміцину, у більшості випадків чутливі до всіх інших аміноглікозидів. Бактерії, стійкі до аміноглікозидів I покоління (стрептоміцин, неоміцин, мономіцин, канаміцин), зберігають чутливість до гентаміцину та аміноглікозидів II–III поколінь. У той же час резистентність до гентаміцину супроводжує стійкість до всіх аміноглікозидів I покоління (Miller, 1996; Bereznyakov, 2001).

Провідним механізмом стійкості до хінолонів і фторхінолонів є модифікація мішеней їх дії: топоізомерази II і IV, що опосередковують конформаційні зміни молекул бактеріальної ДНК, необхідні для її нормальної реплікації. В основі розвитку резистентності мікроорганізмів до хінолонів і фторхінолонів лежать три основні механізми: зміна структури ферментів-мішеней (ДНК-гірази та топоізомерази IV), порушення проникнення в клітину, активне виведення із клітини (Drlca, 1997). Найбільшу спорідненість хінолони проявляють до ДНК-гірази, завдяки чому саме цей фермент є первинною мішенню їх дії. Основним механізмом стійкості є зміна структури топоізомерази у результаті мутацій у відповідних генах і амінокислотних замінах у молекулах ферментів. Амінокислотні заміни, у свою чергу, викликають зниження спорідненості хінолонів до ферментів і підвищення мінімальної пригнічувальної концентрації (МПК) цих препаратів. Частота виникнення мутацій, імовірно, мало залежить від впливу хінолонів, однак формування стійких штамів можливе лише в результаті селекції на тлі дії препаратів. У переважній більшості випадків стійкість формується ступінчасто. Після виникнення та селекції мутацій у генах ферменту, що є первинною мішенню дії хінолонів, МПК препаратів звичайно підвищується в 4–8 разів, а антибактеріальний ефект проявляється за рахунок пригнічення активності ферменту, що є вторинною мішенню. Якщо вплив хінолонів на мікроорганізм триває, то можливе виникнення та селекція мутацій у вторинній мішені та, як наслідок, підвищення МПК ще в 4–8 разів. У штамів бактерій із високим рівнем стійкості звичайно виявляють декілька мутацій у генах обох топоізомераз (Drlca, 1997; Yakovlev, 2004). Найвищий рівень резистентності розвивається у випадках дво- чи триступінчастих мутацій по тій або іншій субодиниці або одночасно в різних генах. Для порушення розвитку бактеріальної клітини буває досить пригнічення активності тільки одного ферменту, що пов'язано з різними функціями двох топоізомераз. З огляду на те, що гени обох ферментів локалізовані на бактеріальній хромосомі, резистентність до фторхінолонів має хромосомну природу, яка має перехресний характер у межах групи хінолонів. Однак рівень резистентності до фторхінолонів значно нижчий, що визначає високу клінічну активність фторхінолонів стосовно більшості резистентних до нефторованих хінолонів штамів бактерій (Yakovlev, 2004).

Ще один механізм стійкості до хінолонів – зниження проникності зовнішньої мембрани бактерій за рахунок ушкодження проникності поринових каналів або ліпополісахаридного шару. У цьому випадку знижується проникність мембрани не тільки для хінолонів, а і для антибактеріальних препаратів інших класів (аміноглікозидів, бета-лактамів). Крім того, у зниженні чутливості до хінолонів значну роль може грати й ефлюкс (Kohler et al., 1997).

Широкий спектр клінічних проявів інфекцій, зумовлених ентеробактеріями, потребує інтенсивного вивчення їх ролі у патології людини. Особливого значення ці мікроорганізми набули останніми роками, коли загальна роль умовно-патогенних бактерій у захворюваності людини значно зросла. Особливу увагу ці мікроорганізми привертають через набуття широкого спектра детермінант стійкості до антибіотиків. Багато з них на сьогодні

володіють стійкістю до декількох препаратів різних груп. До того ж, поширення цих детермінант відбувається доволі активно. У зв'язку з цим особливого значення набуває питання контролю за рівнем розповсюдження антибіотикостійких ізолятів у лікарнях і лікувально-профілактичних закладах, що потребує постійного контролю з боку відповідних комітетів при ВООЗ (Yakovlev, 2004).

Деякі антибіотичні препарати застосовують одночасно для посилення ефекту. Зазвичай препарати комбінують у випадку значних інфекційних ускладнень. У досліджах показано, що застосування деяких препаратів поодиночки проти збудників інфекційних уражень не ефективно за звичайних концентрацій препарату, комбінація ж двох антибіотиків давала ефект при дозах, що відповідали одній МПК та менше для кожного. Також синергічна дія антибіотиків часто здійснює імуномодулювальний ефект. Переважно порушуються параметри неспецифічних факторів захисту, змінюється імунна відповідь на бактерійні та тканинні антигени. Таку дію антибіотиків можливо упередити застосуванням імуномодуляторів (левамизол, квадевіт). Установлено, що ці препарати дають позитивний ефект (Beloborodova et al., 2000; Stratchounski et al., 2007).

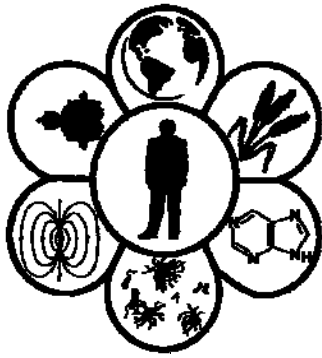
Наслідки впливу антибіотичних речовин у будь-якому разі будуть відрізнятися у сполук, що належать до різних класів або у чомусь збігатимуться. Однак ще недостатньо даних (ані експериментальних, ані клінічних) для однозначних висновків щодо впливу препаратів і питання про перевагу використання тих або інших антибіотиків лишається відкритим, тобто проведення антибіотикограми стає обов'язковим дослідженням (Greenwood, 1998; Shapiro, 2002; Bonelli et al., 2014).

Бібліографічні посилання

- Bao, L., Peng, R., Ren, X., Ma, R., Li, J., Wang, Y., 2013. Analysis of some common pathogens and their drug resistance to antibiotics. *Pak. J. Med. Sci.* 29(1), 135–139.
- Beloborodova, N.V., Bohdanov, M.B., Chernenkaia, T.V., 2000. Algoritmi antibiotikoterapii: Rukovodstvo dlia vrachei [Algorithms of antibiotic therapy: A guide for physicians]. Antea, Moscow (in Russian).
- Bereznyakov, I.G., 2001. Resistentsnost k antibiotikam: Prichini, mehanismi, puti preodoleniia [Antibiotic resistance: Causes, mechanisms and ways to overcome]. *Clin. Antibiotic therapy* 4, 18–22 (in Russian).
- Bonelli, R.R., Moreira, B.M., Picão, R.C., 2014. Antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae in South America: History, current dissemination status and associated socioeconomic factors. *Drug Resist. Updat.* 10 (in Press).
- Cochard, H., Aubier, B., Quentin, R., van der Mee-Marquet, N., 2014. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in french nursing homes: An association between high carriage rate among residents, environmental contamination, poor conformity with good hygiene practice, and putative resident-to-resident transmission. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 35(4), 384–389.
- Decousser, J.W., Pina, P., Picot, F., Delalande, C., Pangon, B., Courvalin, P., Allouch, P., 2003. Frequency of isolation and antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens isolated from patients with bloodstream infections: A French prospective national survey. *J. Antimicrob. Chemother.* 51(5), 1213–1222.

- Drees, M., Pineles, L., Harris, A.D., Morgan, D.J., 2014. Variation in definitions and isolation procedures for multidrug-resistant gram-negative bacteria: A survey of the society for healthcare epidemiology of America Research Network. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 35(4), 362–366.
- Drlica, K., Zhao, X., 1997. DNA gyrase, topoisomerase IV, and 4-quinolones. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 61, 377–392.
- Greenwood, D., 1998. Worldwide prevalence of antimicrobial resistance. *J. Med. Microbiol.* 47(9), 751–755.
- Grover, N., Sahni, A.K., Bhattacharya, S., 2012. Therapeutic challenges of ESBLs and AmpC beta-lactamase producers in a tertiary care center. *Armed Forces Med. J. India* 69(1), 4–10.
- Gupta, K., Bhadelia, N., 2013. Management of urinary tract infections from multidrug-resistant organisms. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 28(1), 49–59.
- Kohler, T., Michehamzhepour, M., Plesiat, P., 1997. Differential selection of multidrug efflux systems by quinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41(11), 2540–2543.
- Lee, B., Kang, S.Y., Kang, H.M., Yang, N.R., Kang, H.G., Ha, I.S., Cheong, H.I., Lee, H.J., Choi, E.H., 2013. Outcome of antimicrobial therapy of pediatric urinary tract infections caused by extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Infect. Chemother.* 45(4), 415–421.
- Liu, P.Y., Shi, Z.Y., Tung, K.C., Shyu, C.L., Chan, K.W., Liu, J.W., Wu, Z.Y., Kao, C.C., Huang, Y.C., Lin, C.F., 2014. Antimicrobial resistance to cefotaxime and ertapenem in Enterobacteriaceae: The effects of altering clinical breakpoints. *J. Infect. Dev. Ctries.* 8(3), 289–296.
- Livermore, D.M., 2005. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 8, 557–584.
- Miller, G.H., 1996. Nature and rate of aminoglycoside resistance mechanisms. *Clin. Drug Invest.* 12(1), 1–12.
- Nakamura, T., Komatsu, M., Yamasaki, K., Fukuda, S., Higuchi, T., Ono, T., Nishio, H., Sueyoshi, N., Kida, K., Satoh, K., Toda, H., Toyokawa, M., Nishi, I., Sakamoto, M., Akagi, M., Mizutani, T., Nakai, I., Kofuku, T., Orita, T., Zikimoto, T., Natsume, S., Wada, Y., 2014. Susceptibility of various oral antibacterial agents against extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J. Infect. Chemother.* 20(1), 48–51.
- Nikaïdo, H., Nikaïdo, K., Harayama, S., 1991. Identification and characterization of porins in enterobacteria. *Biol. Chem.* 266(2), 770–779.
- Nikaïdo, H., Normark, S., 1987. Sensitivity of *Escherichia coli* to various beta-lactams is determined by the interplay of outer membrane permeability and degradation by periplasmic beta-lactamases: A quantitative predictive treatment. *Mol. Microbiol.* 1(1), 29–36.
- Nilsen, E., Haldorsen, B.C., Sundsfjord, A., Simonsen, G.S., Ingebretsen, A., Naseer, U., Samuelsen, O., 2013. Large IncHI2-plasmids encode extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in Enterobacter spp. bloodstream isolates, and support ESBL-transfer to *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Infect.* 19(11), E516–518.
- Pfaller, M.A., Flamm, R.K., Sader, H.S., Jones, R.N., 2014. Ceftaroline activity against bacterial organisms isolated from acute bacterial skin and skin structure infections in United States medical centers (2009–2011). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 17, S0732–8893.
- Pozdeev, D.C., 2001. Medizinskaia mikrobiologhiia [Medical Microbiology]. Geotar-Med, Moscow (in Russian).
- Randrianirina, F., Ratsima, E.H., Ramparany, L., Randremanana, R., Rakotonirina, H.C., Andriamanantena, T., Rakotomanana, F., Rajatonirina, S., Richard, V., Talarmin, A., 2014. Antimicrobial resistance of bacterial enteropathogens isolated from stools in Madagascar. *BMC Infect. Dis.* 14(1), 104.
- Shapiro, A., 2002. Antibiotiki ta ih diia na zbudnikiv oportunistichnih ta nozokomialnih infkzii [Antibiotics and their effects on opportunistic pathogens and nosocomial infections]. *Laboratory Diagnostic.* 3, 23–28 (in Ukrainian).
- Sidorenko, S.V., 2003. Infekzii, vizivaemie mikroorganizmami semeistva Enterobacteriaceae [Infections caused by microorganisms of the family Enterobacteriaceae]. *Clin. Antibiototherapy* 1, 5–9 (in Russian).
- Sidorenko, S.V., Rezvan, S.P., Grudinina, S.A., 1998. Sravnitelnaia aktivnost meropenema i drugih antibiotikov v otnoshenii vzbuditelei nosokomialnih infekzii [Comparative activity of meropenem and other antibiotics against nosocomial infections]. *Antibiotics and Chemotherapy* 1, 4–14 (in Russian).
- Strachounski, L.S., Belousov, Y.B., Kozlov, S.N. (Eds.), 2007. Prakticheskoe rukovodstvo po antiinfekzionnoi terapii [Practical guidance on antiinfective chemotherapy]. Makmakh, Smolensk (in Russian).
- Thibaut, S., Caillon, J., Marquet, A., Grandjean, G., Potel, G., Ballereau, F., 2014. Epidemiology of third-generation cephalosporin-resistant community-acquired Enterobacteria isolated from elderly patients. *Med. Mal. Infect.* 44(2), 57–62.
- Tsiganenko, A.Y., Girich, E.V., 2009. Issledovanie sinerhizma antibakterialnih preparatov, ispolzuemih dlia lecheniia hnoino-vospalitelnih zabolvanii kozhi i miahkih tkanei, vizvannih *E. coli* [Investigation of synergism of antibacterial drugs used for the treatment of inflammatory diseases of the skin and soft tissue caused by *E. coli*]. *Experimental and Clinical Medicine* 3, 25–27 (in Russian).
- Veldman, K., Kant, A., Dierikx, C., van Essen-Zandbergen, A., Wit, B., Mevius, D., 2014. Enterobacteriaceae resistant to third-generation cephalosporins and quinolones in fresh culinary herbs imported from Southeast Asia. *Int. J. Food Microbiol.* 177C, 72–77.
- Vorobyov, A.A. (Ed.), 2004. Medizinskaia mikrobiologhiia, virusologhiia i immunologhiia [Medical microbiology, virology and immunology]. MIA, Moscow (in Russian).
- Yakovlev, S.V., 2004. Mesto fluorhinolonov v lechenii bakterialnih infekzii [Place of fluoroquinolones in treatment of bacterial infections]. *Russian Medical Journal* 11(8), 434–437 (in Russian).
- Yakovlev, S.V., 2004. Kakie antibiotiki deistvitelno nuzhni dlia lecheniia urohenitalnih infekzii? [What antibiotics really need for the treatment of urogenital infections?]. *Consilium-medicum* 6(1), 40–45 (in Russian).

Надійшла до редколегії 02.04.2014



УДК 616.314-74+613.95+504.054

Оцінка якості реставрацій постійних зубів у дітей, які проживають у місцевості, забрудненій солями важких металів

В.В. Аваков, М.М. Рожко

Івано-Франківський національний медичний університет, Івано-Франківськ, Україна

Збільшення кількості солей важких металів – актуальна гігієнічна проблема, що пов'язано з важкістю їх мультиелементного аналізу у мікрооб'єктах, негативним впливом на стан здоров'я дітей, зумовлене тропністю, здатністю до кумуляції, тривалим біологічним напівжиттям в організмі та антагонізмом солей важких металів до ряду мікроелементів. Вплив солей важких металів на розвиток стоматологічних захворювань беззаперечний. Особливу увагу присвячено їх впливу на перебіг карієсу та особливостям його лікування у зв'язку з цим. Незважаючи на те, що сучасна адгезивна стоматологія за останні роки зробила суттєвий прорив в удосконаленні адгезивних систем, правильний вибір адгезивної системи, залежно від зміни структури твердих тканин під дією геохімічних забруднювачів (тип солей важких металів), залишається найважливішим кроком. Саме від нього залежить якість адаптації та зв'язку реставрації з реставраційною основою. На шляху адгезивної системи лежить змінена структура, що заважає глибокій її penetрації і, як наслідок, викликає порушення герметичності реставрації. Саме тому раннє виявлення ускладнень шляхом клінічної оцінки якості проведених реставрацій являє великий інтерес. У даній статті відображено дані щодо ефективності застосування препарату Глуфторед у комплексі з різними адгезивними системами. Зроблено клінічну оцінку якості проведених реставраційних робіт у дітей різних вікових груп і територіальної приналежності з використанням індексу USPHS через 6 і 18 місяців після їх виконання. Проведені клінічні спостереження вказують на ефективність застосування глибокого фторування та різних адгезивних систем у комплексі лікування карієсу для різних вікових категорій дітей як у близький, так і віддалений час.

Ключові слова: діти; карієс; реставрації; адгезивна система

Evaluation of quality of permanent teeth restorations in children of areas contaminated by heavy metal salts

V.V. Avakov, N.N. Rozhko

Ivano-Frankivsk National Medical University, Ivano-Frankivsk, Ukraine

The influence of the environment on the child health is one of priority issues of the present time and it is of great social importance. Increased dental diseases associated with climatic and geographical characteristics of the area are widely discussed in the literature. The leading among them are environmentally determined dental diseases in children associated with geochemical and technogenic pollution of the area where they live. Increasing amounts of hard metal salts is the urgent hygienic problem, due to severity of their multi-element analysis in microsubjects, and negative influence on health of the children population, due to tropism, ability to cumulation, long biological life in the body and antagonism of heavy metal salts to the number of microelements. Influence of hard metal salts on dental diseases development is undeniable. Particular attention is paid to their influence on caries process and treatment peculiarities. Despite the fact that modern adhesive dentistry in recent years has made a significant breakthrough in improving adhesive systems, correct choice of adhesive system depending on changes in the structure of hard tissue under geochemical contaminants (like heavy metal salts) is the most important step. It is the decisive factor for adaptation and connection of restoration with the restoration base. We should remember that on the way of adhesive system there is an altered structure preventing from deep penetration of such system and, consequently, leading to violation of restoration tightness. Therefore, early detection of complications by clinical evaluation of quality of the restorations is of great interest. Multi-vector approach to treatment of dental caries in children living in conditions of technogenic pollution by heavy metal salts is extremely urgent and important issue. Significant niche in this approach is given to adhesive preparation methods combined with local fluoridation, using fluoride medication of the new generation. One of them is Hluftored which promotes the formation of microcrystalline CaF_2 . Protocol of work with this new gen-

eration drug is based on the sequential pre-coating of enamel with magnesium-fluoride silicate, and then with suspension of high dispersible calcium hydroxide promoting formation of microcrystalline CaF_2 , magnesium and copper with the size of $\sim 50\text{Å}$, leading to easy penetration of fluoride into pores of softening range. Moreover, microcrystals of CaF_2 are protected by silicic acid gel from outwashing. Therefore, they release fluoride for a long period of time (over 1 year), which promotes remineralization and prevents complications of dental caries. This article includes the data regarding effectiveness of the Hluftored use in combination with various adhesive systems. Also, we show data of clinical quality assessment conducted for restoration procedures in children of different age groups and territories by using index of USPHS, after 6 and 18 months of carrying out such procedures. Clinical observations indicate the effectiveness of deep fluoridation and different adhesive systems in the complex of caries treatment in different age groups at present time and in future.

Keywords: children; caries; restorations; adhesive system

Вступ

Останніми роками розроблено багато нових технологій і матеріалів, проте 20% клінічних випадків все ж таки пов'язані з руйнуванням і випадінням реставрації. Значною мірою це пов'язано з порушенням адгезії до твердих тканин. Нині питання поліпшення ефективності лікування захворювань твердих тканин зубів залишаються актуальними. Спостерігається швидкий розвиток естетичної стоматології з розширенням спектра застосування адгезивних систем до емалі та дентину. Впровадження у стоматологічну практику якісних реставраційних матеріалів і сучасних адгезивних систем істотно скоротило необхідність надмірного препарування твердих тканин зубів. У даний час у практичній стоматології широко використовують композитні матеріали світлового та хімічного твердіння для реставрації твердих тканин при карієсі, відновлення відколотих фрагментів зуба, заміщення втраченої емалі або дентину при ерозії, стигранні, клиноподібних дефектах (Bayer, 2001; Fischer, 2002). Поява нових самопротравлювальних адгезивних систем зі значно поліпшеними хімічними та біомеханічними властивостями знаходить своє відображення в ряді наукових досліджень (Tuas, 2006; Omar, 2006; Yoo, 2006; Söderholma, 2007; Ornella, 2009). У зв'язку із цим лікарі отримали широкий вибір для проведення естетичних робіт.

Підвищену надійність при більш швидкому застосуванні, а також зменшення кількості компонентів та етапів роботи можна досягти, впроваджуючи нові адгезивні системи. Для надійної фіксації пломби, запобігання крайової проникності та профілактики вторинного карієсу велике значення мають якість і правильне застосування обраної адгезивної системи перед заповненням порожнини пломбувальним матеріалом. Особливості хімічного складу та властивостей застосованої адгезивної системи мають велике практичне значення, оскільки це дозволяє грамотно підійти до її вибору і, тим самим, забезпечує успіх у роботі (Joffe, 2001; Shariff, 2005).

Адгезивні системи лягли в основу адгезивної технології та стали фундаментальною основою естетичного відновлення зубів. Їх роль у забезпеченні надійної ретенції з мінімальним ризиком виникнення післяопераційної чутливості, токсичної дії композиту, крайового зафарбовування та мікропідтікання, як в ортодонтії, так і в терапевтичній стоматології, беззаперечна (Nazarian, 2001; Azarov, 2002; Neslihan, 2006; Nunes, 2006; Parpalei, 2006; Maksimovskii, 2007; Udod, 2008; Milgrom, 2009).

Сила зв'язку адгезивної системи залежить від низки факторів, основними з яких є структурно-функціональна резистентність емалі та дентину (Azarov, 2004; Omar, 2006; Yamazaki, 2006), умови для роботи в адгезивній

техніці (рабердам), абразивність борів, якими препарували каріозну порожнину (Nikolaenko, 2003; Braem, 2007; Passos, 2010; Stookey, 2010). Утворення надійного зв'язку із тканинами зуба – необхідна умова композитних матеріалів. Поява техніки тотального протравлення поліпшила з'єднання між композитом і емаллю. Проте питання з'єднання з дентином стало великою проблемою. Дентинні каналці, які складаються з пери- та інтертубулярного дентину, заповнені рідиною, а це означає, що дентин є високогідрофільною структурою (Murchison, 1999; Beltrán-Aguilar, 2005; Söderholma, 2007; Blatz, 2008; Hikita, 2008; Almeida Neves, 2011). Проблема лежала в площині з'єднання гідрофільної структури з гідрофобною, якою є композит. Саме це сприяло розробці зв'язувального елемента – адгезивної системи (Sunna, 1999; Eliades, 2000; Gallego, 2004; Paraizo, 2007; Thais, 2007). Проте на шляху надійної адгезії композитних матеріалів виступає також низка інших факторів. Один із них – зміна структур дентину під дією різних факторів, таких як солі важких металів, що змінюють структури пери- та інтертубулярного дентину. Це, у свою чергу, спричинює порушення крайової адаптації реставраційного матеріалу та викликає ряд ускладнень. Із метою усунення цих ускладнень розроблено низку методів оцінки якості реставрації (Udot, 2009; Mandora, 2002), таких як комп'ютерний аналіз зображення, що базується на опрацюванні цифрового зображення за допомогою ряду програм на кшталт «Dental Quality» (Satiho, 2009) та інші.

У межах даного дослідження здійснювали раннє виявлення ускладнень шляхом клінічної оцінки якості проведених реставрацій у школярів у межах села Горохолино Богородчанського району та м. Івано-Франківськ за допомогою індексу USPHS. Мета дослідження – оцінити якість проведених реставрацій постійних зубів у дітей, що проживають у місцевості, забрудненій солями важких металів.

Матеріал і методи досліджень

Оцінку проводили за системою USPHS, що включає анатомічну форму, крайову адаптацію, шорсткість поверхні, крайове забарвлення, кольорову відповідність, вторинний карієс, наявність чутливості. Також урахували стан контактного пункту. Критеріями оцінки були такі показники.

1. Анатомічна форма (АФ): А – реставрація зберігає створену анатомічну форму, В – реставрація не відповідає створеній анатомічній формі, але відсутній матеріал не оголює дентин або матеріал прокладки, С – значна втрата матеріалу з оголенням дентину або матеріалу прокладки.

2. Крайова адаптація (КА): А – реставрація близько прилягає до зуба уздовж периферичної частини, дослідник не помічає, де проходить з'єднання з краєм (якщо і помічає, то лише в одному напрямі), ніяких тріщин не видно, В – дослідник явно помічає тріщину, що з'явилася, до якої може увійти інструмент, ані дентину, ані прокладки не видно, С – дослідник уводить інструмент у тріщину, яка настільки глибока, що оголені дентин і матеріал прокладки, D – реставрація зламалася, рухома або відсутня.

3. Крайове зафарбування (КФ): А – зміна кольору на межі між реставрацією та поверхнею зубної структури відсутня, В – зміни кольору не відбулося в напрямку пульпи, С – зміна кольору відбулася в напрямку пульпи.

4. Шорсткість поверхні (Ш): А – поверхня реставрації гладенька, В – поверхня реставрації злегка шорстка або підрита, але її можна виправити завдяки фінішній обробці, С – поверхня реставрації глибоко підрита, у нерівних заглибленнях (що не належать до анатомічної форми), її не можна виправити за допомогою фінішної обробки, D – поверхня зламана або в ній є розшарування.

5. Відповідність кольору (КВ): А – реставрація відповідає за кольором і прозорістю прилеглий зубній структурі, В – невідповідність за кольором і прозорістю в допустимих межах порівняно із забарвленням і прозорістю зуба, С – невідповідність за кольором і прозорістю виходить за межі порівняно із забарвленням і прозорістю зуба.

6. Чутливість (Ч): А – немає, В – середня, С – стерпна, D – дуже сильна.

7. Вторинний карієс (ВК): А – відсутній, В – наявний.

Показники А і В використовуються для позначення реставрацій як клінічно задовільних. Показник А перебуває в межах поняття «чудовий», а це значить, що реставрація довго перебуватиме у повноцінному стані. Показник В – прийнятний стан реставрації, тобто реставрація не відповідає ідеальній і може потребувати зміни. Показники С і D означають реставрації, які повинні бути замінені. Показник С означає реставрації, що потребують заміни з профілактичних цілей. Реставрації з оцінкою D підлягають заміні. Їх стан відповідає руйнуванню зуба. Реставрації з С і D відрізняються між собою лише мірою екстреності заміни.

Повинно бути проведено принаймні два дослідження, кожне з яких має параметри (відповідно до вимог Ради з матеріалів ADA Чикаго, 1994 р.): мінімальна кількість реставрацій – 30, в основі дослідження мінімум 25 пацієнтів, через 6 місяців оглядаються мінімум 20 пацієнтів, через 18 місяців оглядаються мінімум 15 пацієнтів, баланс вікових груп (до 25 років, 26–30, 31–40, 41–50 і понад 50 років).

Критерії позитивної оцінки визначали максимальним числом невдалих реставрацій і недостатнім крайовим приляганням в основі дослідження через 6 і 18 місяців. Негативні результати повинні становити через 6 місяців не більше 5%, через 18 місяців – не більше 10%.

Усі 160 дітей, згідно з віковим статусом, рівнем інтенсивності карієсу, використаними адгезивними системами, застосованим місцево препаратом Глуфторед, загальнозастосованим препаратом Полісорб МП, Мультитабс Джуніор і територіальною приналежністю, були поділені на дві групи – основну (120 дітей) та контроль-

ну (40). Дітям контрольної групи, до якої входили діти з низьким показником інтенсивності карієсу (КПВ), що проживають в м. Івано-Франківськ, ніяких спеціальних лікувально-профілактичних заходів не проводилось. Дітей дослідної групи, куди входили діти з високими показниками КПВ, що проживають у с. Горохолино Богородчанського району, було поділено на дві частини: дослідна група I (60 дітей), де місцево застосовано препарат Глуфторед, та II (60 дітей) де він не застосовувався. У свою чергу, ці групи поділені на дві вікові підгрупи: віком 12 та 15 років. Таким чином, сформовано шість груп: дві контрольні та чотири, яким проведено лікувально-профілактичні заходи. В усіх групах без винятку проведено професійну гігієну ротової порожнини, бесіди з батьками, навчання дітей правил гігієнічного догляду за порожниною рота, із дворазовим протягом дослідження контролем правильності виконання отриманих навиків, та хірургічна санація.

У дослідній групі I для дітей 12 та 15 років місцево застосовано препарат Глуфторед (ВладМіва), адгезивні системи V покоління Single Bond (3M ESPE), VII покоління Bond Force (Tokuyama Dental), композитні матеріали Filtek Z 250 (3M ESPE), Estelite Σ (Tokuyama Dental) та компомер F 2000 і загально препарати Полісорб МП та Мультитабс Джуніор (всередину). У дослідній групі II, 12 та 15 років, застосовано загально препарат Полісорб МП і Мультитабс Джуніор (всередину), адгезивні системи V покоління Adper Single Bond (3M ESPE), VII покоління Bond Force (Tokuyama Dental), композитні матеріали, Filtek Z 250 (3M ESPE), Estelite Σ (Tokuyama Dental) та компомер F 2000.

Що стосується контрольної групи, в ній здійснювали лікування за традиційною загальноприйнятою схемою з використанням у віковій групі дітей 12 років адгезивних систем Bond Force (Tokuyama Dental) і Adper Single Bond (3M ESPE), компомеру F 2000 (3M ESPE) в комбінації з композитами Estelite Σ (Tokuyama Dental) та Filtek Z 250 (3M ESPE). У віковій групі дітей 15 років застосовували адгезивну систему V покоління Adper Single Bond (3M ESPE), VII покоління Bond Force (Tokuyama Dental) і композитні матеріали Filtek Z 250 (3M ESPE) та Estelite Σ (Tokuyama Dental).

Оцінку якості виконаних реставраційних робіт проведено за системою USPHS. По даній системі враховано такі ключові пункти як АФ (анатомічна форма), КА (крайова адаптація), КЗ (крайове зафарбування), ШП (шорсткість поверхні), Ч (чутливість) та КВ (карієс вторинний). Загальна кількість реставрацій склала у дітей 12 років 215, а у дітей 15 років – 231. Відповідно до вимог Ради з матеріалів ADA (Чикаго, 1994 р.) проведено триетапне дослідження: через 6, 12 та 18 місяців.

Результати та їх обговорення

Через 6 місяців в основу дослідження взято 60 дітей 12 років (дослідна I, II та контрольна група) із сумарною кількістю реставрацій 204 та 60 дітей 15 років із сумарною кількістю реставрацій 209.

Через 12 місяців в основу дослідження взято 50 дітей 12 років із сумарною кількістю реставрацій 186 та 50 дітей 15 років із сумарною кількістю реставрацій 188.

Через 18 місяців у дослідженні перебувало 40 дітей 12 років із сумарною кількістю реставрацій 172 та 40 15-річних дітей із загальною кількістю реставрацій 171.

Кожен із ключових пунктів (критеріїв) системи USPHS оцінено за показниками А, В, С і D. Показники А відповідають повноцінній реставрації, В – клінічно прийнятні, С – реставрації, що потребують заміни із профілактичних цілей і D – реставрації, що потребують негайної заміни.

Через 6 місяців після проведених реставраційних робіт у групах 12-річних дітей, де застосовано адгезивну систему Bond Force, кількість реставрацій, що відповідали показнику А (повноцінний стан реставрації) в I дослідній групі, де застосовано препарат Глуфторед, склала $98,2 \pm 0,73\%$, у II дослідній – $91,7 \pm 0,9\%$, у контрольній групі – $94,3 \pm 2,3\%$. Показнику В (прийнятний стан реставрації) у I дослідній групі відповідало $1,8 \pm 0,7\%$, у II дослідній – $8,3 \pm 0,9\%$, а в контрольній групі – $5,7 \pm 2,3\%$ реставрацій. Показникам С та D (реставрації, що потребують заміни) жодна реставрація в даній групі не відповідала. Достовірних відмінностей за показниками в групах не виявлено.

Через 6 місяців після проведених реставраційних робіт у групах, де застосовано адгезивну систему Single Bond кількість повноцінних реставрацій (показник А) у I дослідній групі склала $98,2 \pm 0,7\%$, у II дослідній – $91,7 \pm 0,9\%$, а в контрольній групі – $94,3 \pm 2,3\%$. Кількість прийнятних реставрацій (показник В) у I дослідній групі склала $98,2 \pm 0,7\%$, у II дослідній – $91,7 \pm 0,9\%$, а в контрольній групі – $94,3 \pm 2,3\%$. Показникам С і D у II дослідній групі відповідало $1,8 \pm 0,6\%$ реставрацій, у той час як у I дослідній і контрольній групах за даними показниками не виявлено жодної реставрації. Проте достовірних відмінностей, як і в попередній групі, за діагностичними показниками не виявлено.

У вікових групах 15-річних дітей, де застосовано адгезивну систему Bond Force, через 6 місяців після проведених реставраційних робіт найбільша кількість реставрацій із повноцінним станом, що відповідає показнику А, зустрічалась у I дослідній і контрольній групах. У них за цим показником виявлено $98,3 \pm 1,2\%$ та $97,7 \pm 1,5\%$ реставрацій відповідно. Що стосується II дослідної групи, то в ній показнику А відповідало $90,2 \pm 2,2\%$ реставрацій, що порівняно з I дослідною групою достовірно менше – на $8,0\%$ ($P < 0,01$), а порівняно з контрольною групою – на $7,5\%$ ($P < 0,05$). За показником В (прийнятний стан) найбільша кількість реставрацій виявлена у II дослідній групі, де даному показнику відповідало $9,8 \pm 2,2\%$ реставрацій, що достовірно вище – на $8,0\%$ ($P < 0,01$) – показника I дослідної групи, який становив $1,7 \pm 1,2\%$ та на $7,5\%$ ($P < 0,05$) – від аналогічного показника контрольної групи, який склав $2,3 \pm 1,5\%$ реставрацій.

Показникам С і D (заміна реставрації) у I та II дослідній і контрольній групах не відповідала жодна з реставрацій. У групах 15-річних дітей, де застосовувалась адгезивна система V покоління Single Bond, за показником А в I та II дослідній та контрольній групах виявлено $91,6 \pm 1,9\%$, $87,2 \pm 2,2\%$ і $91,4 \pm 1,8\%$ реставрацій відповідно, показнику В у I та II дослідній та контрольній групах – $8,4 \pm 1,9\%$, $12,5 \pm 2,1\%$ та $10,0 \pm 1,4\%$ реставрацій. Тільки в II дослідній групі $0,9 \pm 0,4\%$ реставрацій

потребували заміни. За жодним показником достовірної відмінності між групами не виявлено ($P > 0,05$).

Отже, у віковій групі 12-річних дітей згідно з вимогами Ради з матеріалів ADA кількість невдалих реставрацій у групах, де застосовано адгезивні системи Bond Force (0% реставрацій) та Single Bond (II дослідна – $1,8\%$ реставрацій), через 6 місяців не перевищило допустиму межу, яка складає 5% . У віковій групі 15-річних дітей кількість невдалих реставрацій, де застосовано адгезивні системи Bond Force (0% реставрацій) та Single Bond (II дослідна – $0,9\%$ реставрацій), як і в попередній віковій категорії, не перевищила допустиму межу.

Далі оцінку якості реставрацій за системою USPHS проводили через 18 місяців після проведених реставраційних робіт. У 12-річних дітей (табл. 1) у групах, де застосовано адгезивну систему Bond Force, кількість реставрацій, що відповідали показнику А (повноцінний стан реставрації), в I дослідній групі склала $95,9 \pm 1,4\%$, що достовірно вище (на $19,2\%$, $P < 0,001$) від II дослідної, в якій даний показник склав $76,7 \pm 3,6\%$. У контрольній групі кількість повноцінних реставрацій склала $89,7 \pm 3,8\%$, що достовірно вище (на $13,1\%$, $P < 0,05$) показника II дослідної групи. Прийнятному стану реставрацій (показник В) у I дослідній групі відповідало $4,1 \pm 1,4\%$, у II дослідній $11,4 \pm 3,5\%$, у контрольній групі – $10,3 \pm 3,8\%$ реставрацій. За даним показником достовірних відмінностей між групами не виявлено. Показникам С і D у II дослідній групі відповідало $13,9 \pm 0,6\%$ реставрацій, що достовірно вище ($P < 0,01$) за показники I дослідної та контрольної груп, в яких не виявлено жодної реставрації (0%). У групах, де застосовували адгезивну систему Single Bond, кількість реставрацій, які відповідали показнику А (повноцінний стан), у I дослідній групі склала $89,8 \pm 2,5\%$, а в контрольній групі – $85,7 \pm 1,5\%$, що достовірно вище (на $27,4\%$ та $14,3\%$ відповідно, $P < 0,001$) показника II дослідної групи, який склав $71,4 \pm 2,4\%$. Кількість прийнятних реставрацій (показник В) у I дослідній групі склала $11,5 \pm 2,8\%$, у II дослідній – $9,5 \pm 3,5\%$, у контрольній групі – $14,3 \pm 1,5\%$ реставрацій. За даним показником достовірних відмінностей між групами не виявлено. Показникам С і D у II дослідній групі відповідало $14,3 \pm 2,7\%$, що достовірно вище ($P < 0,001$) за показники I дослідної та контрольної групи, де не виявлено жодної реставрації, яку потрібно було б замінити.

Через 18 місяців після реставраційних робіт у вікових групах 15-річних дітей (табл. 2), де застосовано адгезивну систему Bond Force, найбільшу кількість повноцінних реставрацій (показник А) виявлено у I дослідній групі – $94,5 \pm 1,4\%$ реставрацій, що достовірно вище (на $33,7\%$, $P < 0,001$) показників II дослідної та контрольної груп (на $17,3\%$, $P < 0,01$). Результат II дослідної групи за показником А достовірно менший (на $16,3\%$, $P < 0,05$) від аналогічного контрольної групи. Що стосується реставрацій із прийнятним станом, у II дослідній групі їх кількість склала $30,5 \pm 1,4\%$, що достовірно вище (на $25,9\%$, $P < 0,001$) показників I дослідної та контрольної груп (на $11,1\%$, $P < 0,05$). Результат контрольної групи ($19,4 \pm 3,5\%$) за показником В достовірно вищий (на $14,8\%$, $P < 0,01$) результату I дослідної групи.

Таблиця 1

Клінічна оцінка проведених реставраційних робіт із застосуванням адгезивних систем VII покоління Bond Force та V покоління Adper Single Bond через 18 місяців після їх виконання у 12-річних дітей

Адгезивна система	Показники за критеріями USPHS, % ($M \pm m$)	A			P, достовірність відмінностей між групами
		I дослідна група	II дослідна група	контрольна група	
VII покоління Bond Force	A, повноцінний стан реставрацій	95,9 ± 1,4	76,7 ± 3,6	89,7 ± 3,8	A:B <0,001
					A:C –
					B:C <0,05
	B, прийнятний стан реставрацій	4,1 ± 1,4	11,4 ± 3,5	10,3 ± 3,8	A:B –
					A:C –
					B:C –
C і D, реставрації, які потребують заміни	0	13,9 ± 0,6	0	A:B <0,01	
				A:C –	
				B:C <0,01	
V покоління Adper Single Bond	A, повноцінний стан реставрацій	89,8 ± 2,5	71,4 ± 2,4	85,7 ± 1,5	A:B <0,001
					A:C –
					B:C <0,001
	B, прийнятний стан реставрацій	11,5 ± 2,8	9,5 ± 3,5	14,3 ± 1,5	A:B –
					A:C –
					B:C –
C і D, реставрації, які потребують заміни	0	14,8 ± 2,7	0	A:B <0,001	
				A:C –	
				B:C <0,001	

Таблиця 2

Клінічна оцінка проведених реставраційних робіт із застосуванням адгезивних систем VII покоління Bond Force і V покоління Adper Single Bond через 18 місяців після їх виконання у 15-річних дітей

Адгезивна система	Показники за критеріями USPHS, % ($M \pm m$)	A			P, достовірність відмінностей між групами
		I дослідна група	II дослідна група	контрольна група	
VII покоління Bond Force	A, повноцінний стан реставрацій	94,5 ± 1,4	60,8 ± 4,3	77,1 ± 4,3	A:B <0,001
					A:C <0,01
					B:C <0,05
	B, прийнятний стан реставрацій	4,6 ± 1,6	30,5 ± 1,4	19,4 ± 3,5	A:B <0,001
					A:C <0,01
					B:C <0,05
C і D, реставрації, які потребують заміни	0,7 ± 0,5	7,3 ± 1,9	2,7 ± 1,8	A:B <0,01	
				A:C –	
				B:C –	
V покоління Adper Single Bond	A, повноцінний стан реставрацій	86,6 ± 2,6	67,3 ± 2,3	73,7 ± 4,2	A:B <0,001
					A:C <0,05
					B:C –
	B, прийнятний стан реставрацій	13,4 ± 2,6	12,4 ± 2,0	24,6 ± 4,1	A:B –
					A:C <0,05
					B:C <0,05
C і D, реставрації, які потребують заміни	0	15,6 ± 2,7	1,3 ± 1,3	A:B <0,001	
				A:C –	
				B:C <0,001	

У групах дітей, де застосовано адгезивну систему Single Bond, після 18 місяців клінічних спостережень за показником А у I дослідній групі виявлено найбільше повноцінних реставрацій (86,6 ± 2,6%), що достовірно вище аналогічного показників I дослідної та контрольної груп. За показником В (прийнятний стан) найбільше реставрацій виявлено в контрольній групі (24,6 ± 4,1%), що достовірно вище показників I та II дослідної груп. За показниками С та D (заміна реставрації) найбільшу кількість реставрацій виявлено в II дослідній групі (15,6 ± 2,7%), що достовірно вище показника контрольної та I дослідної (де не було виявлено жодної реставрації) груп.

Виходячи з вимог Ради з матеріалів ADA, у групах дітей 12-річного віку, де застосовувалась адгезивна система Bond Force та Single Bond, зокрема у I і II дослідній групах, кількість невдалих реставрацій склала 13,9 та 14,8% відповідно, що через 18 місяців перевищило допустиму межу (не більше 10%). У дітей 15-річного віку через 18 місяців до яких застосовували адгезивну систему Bond Force, кількість невдалих реставрацій склала 0,7, 7,3 і відповідно 2,7% реставрацій, що відповідає вимогам Ради з матеріалів ADA і не перевищує допустиму межу (не більше 10%). Проте у групах, де застосовано адгезивну систему Single Bond кількість невдалих

реставрацій за 18 місяців склала 15,6%, що перевищує допустиму межу на 5,6%.

Висновки

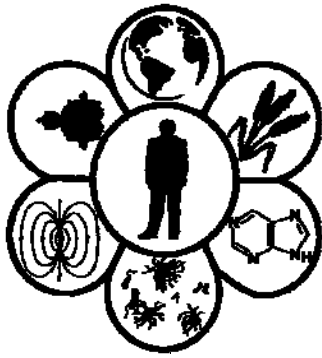
Відсоток реставрацій, які потребували заміни (показники C і D за USPHS) у групах дітей із геохімічно забрудненого району, де місцево Глуфторед не застосовано, перевищував установлені Радою з матеріалів ADA допустимі межі (5% невдалих реставрацій через 6 місяців та 10% – через 18 місяців), як у разі застосування Bond Force, так і Adper Single Bond.

Отримані дані стануть основою для розробки рекомендацій практичного спрямування щодо обробки відпрепарованих порожнин зубів перед застосуванням різних поколінь адгезивних систем у постійних зубах у дітей, які мешкають у різних за рівнем геохімічного забруднення районах.

Бібліографічні посилання

- Arhuna, N., Armanb, A., 2006. Microleakage beneath ceramic and metal brackets bonded with a conventional and an antibacterial adhesive system. *Angle Orthod.* 76(6), 1028–1034.
- Azarov, A.V., 2004. Vliianie strukturno-funksionalnoi rezistentnosti zubov na stepen adhezii plombirovochnoho materiala pri restavratsiiax zubov v raznie vozrastnie periodi. *Sovremennaia Stomatolohiia* 1, 15–16 (in Russian).
- Azarov, O.V., 2002. Eksperimentalno-klinichne obruntuvannia vikoristannia atsetonvmisnikh i etonolvmsnikh adhezivnikh sistem pri restavratsii zubiv u riznikh vikovikh hrupakh. *Donetskii Derzhavnii Medichnii Universitet im. M. Horkoho, Donetsk, Ukraine* (in Russian).
- Blatz, B.M., 2008. Resin-ceramic bonding: A review of the literature. *J. Prosthet. Dent.* 89, 268–274.
- Braem, M., 2007. Microshear fatigue testing of tooth/adhesive interfaces. *J. Adhes. Dent.* 9, 249–253.
- Eliades, T., Eliades, G., 2000. Watts degree of cure of orthodontic adhesives with various polymerization initiation modes. *Eur. J. Orthodont.* 22, 395–399.
- Eugenio, D.B., Laurie, K.B., 2005. Surveillance for dental caries, dental sealants, tooth retention, edentulism, and enamel fluorosis – United States, 1988–1994 and 1999–2002. *MMWR* 55(3), 1–45.
- Gallego, V., 2004. Microleakage study of three adhesive systems. *Braz. Dent. J.* 15, 194–198.
- Hikita, K., Meerbeek, B., Munck, J., 2008. Bonding effectiveness of adhesive luting agents to enamel and dentin. *Dent. Mater. J.* 10, 1–10.
- Maksimovskii, Y.M., 2007. Osobennosti restavratsii postoianikh reztsov u detei. *Stomatolohiia Detskoho Vozrasta i Profilaktika* 2, 7–8 (in Russian).
- Mandora, Y.V., Hrihorev, S.S., Horiunova, M.V., 2002. Effektivnost ispolzovaniia postbondiha pri restavratsii zubov. *Stomatoloh* 10, 22–23 (in Russian).
- Milgrom, P., 2009. Evaluation of pacific islands early childhood caries prevention project: Republic of the Marshall Islands. *J. Public Health Dent.* 69(3), 201–203.
- Murchison, D.F., 1999. Incisal edge reattachment: Indications for use and clinical technique. *Brit. Dent. J.* 186(12), 614–619.
- Nazarian, A., 2011. The progression of dental adhesives. *ADA CERP* 1, 1–10.
- Neves, A., Coutinho, E., 2011. Current concepts and techniques for caries excavation and adhesion to residual dentin. *J. Adhes. Dent.* 13, 7–22.
- Nikolaenko, S.A., 2003. Ysledovanie adhezii k dentinu pri preparirovani razlichnimi borami. *Stomatoloh* 8, 33–34 (in Russian).
- Nunesa, T.G., Garciab, F.C., Osorioc, R., 2006. Polymerization efficacy of simplified adhesive systems studied by NMR and MRI techniques. *Dent. Mater. J.* 22, 963–972.
- Omar, H., El-Badrawy, W., 2006. Microtensile bond strength of resin composite bonded to caries-affected dentin with three adhesives. *Oper. Dent.* 32, 24–30.
- Paraizo, A.M., 2007. Influence of two self-etching primer systems on enamel adhesion. *Braz. Dent. J.* 18(2), 113–118.
- Parpalei, E.A., 2006. Vibor adhezivnikh sistem pri plombirovani zubov u detei. *Dentalnie Tekhnolohii* 6, 26–28 (in Russian).
- Passos, I.A., Sampaio, F.C., 2010. Sucrose concentration and pH in liquid oral pediatric medicines of long-term use for children. *Rev. Panam. Salud. Publica* 27(2), 132–137.
- Satiho, E.A., 2009. Yspolzovanie adhezivnikh tekhnolohii v razlichnikh klinicheskikh situatsiiax. *Klinicheskaiia Stomatolohiia* 2, 20–22 (in Russian).
- Stookey, K.G., 2010. Emerging methods of caries diagnosis. *J. Dent. Educ.* 65(10), 1001–1006.
- Sunna, S., 1999. An ex vivo investigation into the bond strength of orthodontic brackets and adhesive systems. *Brit. J. Orthod.* 26, 47–50.
- Thais, P.C., 2007. Current adhesive systems in dentistry – what is being said and researched sistemas adesivos atuais na odontologia – o que está sendo dito e pesquisado. *Odontologia Clín.-Científ* 6(4), 293–298.
- Udod, A.A., 2008. Osobennosti klinicheskoi otsenki restavratsii frontalnikh zubov. *Ukrainskii Stomatolohichnii Almanakh* 2, 12–14 (in Russian).
- Udot, O.A., Cheliakh, O.M., Smieshko, A.A., Latinina, O.I., 2009. Klinichna otsinka iakosti poverkhni restavratsii zubiv. *Visnik Stomatolohii* 2, 32–35 (in Russian).
- Yamazaki, P.C., 2006. Microleakage evaluation of a new low-shrinkage composite restorative material. *Oper. Dent.* 31, 670–676.

Надійшла до редколегії 02.04.2014



УДК 579.88

Частота виявлення мікоплазм урогенітального тракту жінок у м. Дніпропетровськ

К.В. Бубало^{1,2}, Л.П. Голодок¹, А.І. Вінніков¹

¹Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпропетровськ, Україна

²Діагностичний центр Дніпропетровської медичної академії, Дніпропетровськ, Україна

Досліджено частоту виявлення урогенітальних мікоплазм у жінок різного віку культуральним методом тест-система DUO з метою встановлення їх етіологічного значення у розвитку запальних процесів урогенітального тракту жінок. Ідентифіковано досліджувані культури *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* у діагностичному титрі $>10^4$ КУО/мл і у титрі $<10^3$ КУО/мл. Із 120 досліджуваних ізолятів урогенітального тракту жінок виявлено 113 штамів генітальних мікоплазм, із них 63% – *Ureaplasma urealyticum*, 32% – *Mycoplasma hominis*, 3% – мікробна асоціація *Ureaplasma urealyticum* – *Mycoplasma hominis*. Домінантним збудником запальних процесів урогенітального тракту жінок вікової категорії 24–29 років є *Ureaplasma urealyticum*. За відсутності ознак запального процесу *U. urealyticum* зустрічається у низькій концентрації удвічі частіше, ніж у діагностично значимій концентрації. Збільшення кількості колонієтворних одиниць міко- та уреаплазм слугує маркером розвитку запального процесу урогенітального тракту жінок. Культуральний метод тест-система DUO дозволяє дати чутливішу кількісну характеристику мікоплазм, а ПЛІР – виявити збудник у дуже низькій концентрації. Для ефективної лабораторної діагностики необхідно застосовувати комплексні методи для підвищення вірогідності виявлення збудника та верифікації діагнозу урогенітальної інфекції.

Ключові слова: тест-система DUO; ПЛІР; *Ureaplasma urealyticum*; *Mycoplasma hominis*; урогенітальний тракт

Frequency of urogenital mycoplasma detection in women of Dnipropetrovsk

K.V. Bubalo^{1,2}, L.P. Golodok¹, A.I. Vinnikov¹

¹Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Dnipropetrovsk, Ukraine

²Diagnostic Center of Dnipropetrovsk Medical Academy, Dnipropetrovsk, Ukraine

The frequency of urogenital mycoplasmas detection in women of different ages was studied in culture with the help of DUO test-system in order to determine their etiological significance in the development of inflammatory processes of women urogenital tract. We identified the researched cultures *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* in the diagnostic titer $>10^4$ TEM/ml indicating severe contamination by microorganisms, and in the titer $<10^3$ TEM/ml, the carrier state of the identified microorganisms. Of 120 studied isolates of women urogenital tract there have been identified 113 strains of genital mycoplasmas, among which 63% – *U. urealyticum*, 32% – *M. hominis*, 3% – microbial association of *U. urealyticum* – *M. hominis*. According to the study of frequency of detection of urogenital mycoplasma using DUO test-system culture method, it was found that the most frequently observed ones were *U. urealyticum* in 75 women (63%) of all individuals, *M. hominis* in 38 women (32%) in different diagnostic titers ($>10^4$ TEM/ml, $<10^3$ TEM/ml) in 4 women (3%) *U. urealyticum* – *M. hominis* was observed in microbial associations and mycoplasma were not found in 3 women (2%) of all surveyed patients. *U. urealyticum* and *M. hominis* in the diagnostic titer of $>10^4$ TEM/ml was observed in 55 women (46%) and 20 women (17%), respectively, and the titer of $<10^3$ CFU/ml *U. urealyticum* was observed in 20 women (17%), and *M. hominis* in 18 women (15%). Analysis of genital mycoplasmas distribution among women of different ages has shown that there was the certain correlation between the patient age and frequency of genital mycoplasmas detection: the highest detection rate was observed in women age of 24–29. The dominant pathogen of urogenital tract inflammatory processes in women in 24–29 age group is *U. urealyticum*. The comparison of DUO test-system and PCR data has shown that DUO test-system in culture allowed more sensitive quantitative characterization of mycoplasmas, however, for the more effective laboratory diagnostics it was necessary to use complex methods to increase the probability of pathogen detection. Incidence of mycoplasmas in women with the presence of inflammation was higher than in women having the inflammation in the genital tract. In this case, potential symptom-

free carriers exist for the development of inflammation of urogenital tract of women. Scientists have proved that mycoplasma could cause vulvovaginitis, urethritis, paraurethritis, bartholinitis, adnexitis, salpingitis, endometritis, and ovaritis.

Keywords: DUO test-system; PCR; *Ureaplasma urealyticum*; *Mycoplasma hominis*; urogenital tract

Вступ

Мікоплазмові уrogenітальні інфекції посідають одне з провідних місць серед інших інфекцій людини, що передаються статевим шляхом (Rivera, 2001; Taylor-Robinson, 2012; LeRoy, 2012). При цьому показники відповідної захворюваності у різних регіонах світу досить варіабельні, коливаються в межах 10–80% усієї інфекційної уrogenітальної патології. Поширеність мікоплазмової уrogenітальної інфекції складає 3,9–31,0% у Мексиці, (Rivera, 2004), 44,8% – у Китаї (Zuo, 2006), 54,9% – у Туреччині (Karabay, 2006). В Україні нині немає статистично достовірних даних про поширеність уrogenітального мікоплазмозу у різних груп населення. Аналіз показників поширеності генітальних мікоплазм в Україні має ряд труднощів через відсутність достатньо надійних і достовірних епідеміологічних досліджень. Отримані в останні десятиліття дані вітчизняних і зарубіжних дослідників класифікують захворювання уrogenітального тракту, асоційовані з мікоплазмовою інфекцією, як один із проявів дисбалансу біоти в цілому.

Результати досліджень різних учених досить суперечливі. Деякі дослідники вважають мікоплазми умовно-патогенними мікроорганізмами, обґрунтовуючи це можливістю виділення їх від клінічно здорових, а також осіб із безсимптомним клінічним перебігом мікоплазмозу (Лурова, 2004; Petrikos, 2007; Pereyre, 2009). Разом із цим, на думку інших авторів, мікоплазми є патогенними агентами, а виділення їх від клінічно здорових осіб слід розглядати як загрозове носійство, з огляду на подовжену дію персистувального збудника, а також можливість підвищення вірулентності штамів мікоплазм (Bashmakova, 2006). Незважаючи на неоднозначність думок відносно патогенної ролі *Mycoplasma hominis* і *Ureaplasma urealyticum*, ВООЗ розглядає їх як можливих етіологічних агентів при гонококовому уретриті, запальних захворюваннях органів малого таза та бактеріальному вагінозі. При цьому як моноінфекція мікоплазмоз спостерігається лише в 12–18% випадків, а в асоціації з іншими патогенними мікроорганізмами (мікст-інфекція) – у 87–90%, із хламідіями – в 25–30% випадків (Boesen, 2004; Ross, 2005).

За сучасними уявленнями *M. hominis*, *U. urealyticum*, *U. parvum* є умовно-патогенними мікроорганізмами, які можуть виявитися в уrogenітальному тракті практично здорових жінок. Але носійство мікоплазм не заперечує їх етіологічну роль, оскільки подібне носійство спостерігається в умовах багатьох інфекцій. Як і у випадку інших безсимптомних інфекцій, при мікоплазмозах мікроорганізми можуть активізуватися під дією різних екзогенних і ендогенних факторів (Zdrodowska-Stefanow et al., 2006). Зростання інтересу до цієї групи інфекцій сприяло детальнішому вивченню клінічно-патогенетичних особливостей дії мікоплазм, зокрема їх впливу на репродуктивну, менструальну, ста-

теву функції жіночого організму, що визначає високу соціальну значимість даної проблеми.

На основі багатьох проведених досліджень розроблено різні методи діагностики жінок із мікоплазмовою інфекцією: бактеріологічний, молекулярний (ПЛР), біохімічний (тест-система DUO) і серологічний. За останні роки у лабораторній діагностиці відбулися помітні позитивні зміни, які дозволяють значною мірою оптимізувати клінічно-лабораторні обстеження пацієнтів, контролювати ефективність терапії. Разом із цим проблема повноцінного обстеження та лікування хворих залишається цілком актуальною, свідченням цього є невдачі терапії, хронізація процесу (Deguchi, 2004). Враховуючи все наведене вище, вивчення мікоплазмової інфекції дуже актуальне у наш час, оскільки нині спостерігається значне поширення цієї інфекції в популяції (10–50% – *M. hominis*, 11–80% – *U. urealyticum*), при цьому її оцінка як епідеміологами, так і клініцистами (Jensen, 2012) недостатня.

Мета роботи – визначити частоту виявлення мікоплазм і уреаплазм серед жінок різного віку, провести оцінку біоценозу уrogenітального тракту жінок із безсимптомним носійством уреа- та мікоплазмової інфекції за допомогою різноманітних методів.

Матеріал і методи досліджень

Посів біологічного матеріалу на живильні середовища, дослідження та інтерпретацію отриманих результатів проводили загальноприйнятими методами (Medinform, 2003). Ідентифікували виділені мікроорганізми бактеріоскопічними, бактеріологічними, біохімічними методами.

На першому етапі дослідження здійснили взяття та висів біологічного матеріалу. У пацієнтів для бактеріологічного аналізу відбирали такі його зразки: відокремлюване уретри та цервікального каналу. Матеріал за допомогою спеціального стерильного зонда вносили у рідке транспортне живильне середовище, яке містить усі необхідні речовини для зберігання уреаплазм і мікоплазм, інгібуючи ріст сторонньої мікрофлори за рахунок наявності у середовищі антибіотиків і антимікотиків. Потім із транспортного живильного середовища здійснювали пересів матеріалу на сухі комерційні диференційно-діагностичні середовища, які, крім основних поживних речовин для росту мікоплазм (холестерину та нуклеїнових кислот), містять 0,1% аргініну для виділення *M. hominis*, 0,1% сечовини – для *U. urealyticum*, а також індикатор фенолового червоного у концентрації 0,002%, зміна кольору якого свідчить про розклад аргініну або сечовини з утворення аміаку. Посіви інкубували в термостаті 24–48 годин для уреаплазм і 48–72 години для мікоплазм за температури +37 °С. Жовто-червоний колір середовища переходить у ліловий у результаті ферментативної активності за рахунок росту мікоплазм. Цей метод дозволяє візуально визначити наявність мікоплазм у досліджуваному матеріалі.

На другому етапі дослідження проводили кількісну оцінку чисельності *U. urealyticum* і *M. hominis* культуральним методом за допомогою тест-системи DUO (Sanofi – Франція), яка дозволяє визначити титр обох мікроорганізмів у досліджуваному матеріалі. Мікропіпеткою переносили клінічний матеріал на кожну лунку плашки. Плашки з клінічним матеріалом культивували протягом 24 годин за температури +37 °С. Після інкубації проводили оцінку результатів. Позитивні результати дослідження враховували при діагностично значимому титрі >10⁴ КУО/мл. Також проводили виявлення генетичного матеріалу у досліджуваних зразках за допомогою методу ПЛР. Генотипування культур, накопичених у рідкому живильному середовищі, проводили за допомогою тест-системи Літех (Москва). Синтез ДНК здійснювали на ампліфікаторі Терцик (ДНК-технологія, Росія). Кількість ДНК мікроорганізмів у зразку прийнято виражати в геном-еквівалентах (ГЕ).

У мікробіологічному відділі Діагностичного центру Дніпропетровської медичної академії досліджено зразки біологічного матеріалу 120 жінок різного віку.

Результати та їх обговорення

На першому етапі вивчали загальну картину біоценозу уrogenітального тракту жінок. Виділено 113 штамів генітальних мікоплазм, із них 75 – *U. urealyticum*, 38 – *M. hominis*. Згідно з дослідженням частоти виявлення уrogenітальних мікоплазм культуральним методом за допомогою тест-системи DUO виявили, що найчастіше спостерігалась *U. urealyticum*, найменше – *M. hominis* у різних діагностичних титрах (>10⁴, <10³ КУО/мл), у незначній кількості виявлялися *U. urealyticum* – *M. hominis* у мікробній асоціації – чотири досліджених зразка, зовсім не виявилися мікоплазми у трьох зразках з усіх досліджених ізолятів уrogenітального тракту обстежених пацієнток (табл. 1).

Таблиця 1

Кількість досліджених зразків пацієнток із діагностичним титром *M. hominis* і *U. urealyticum*

Діагностичний титр мікроорганізмів	<i>M. hominis</i> , % (n = 38)	<i>U. urealyticum</i> , % (n = 75)
>10 ⁴ КУО/мл	17	46
<10 ³ КУО/мл	15	17
Усього	32	63

Дослідження частоти виявлення мікоплазм методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) показало наявність генетичного матеріалу *U. urealyticum* у 65 зразках (54%) досліджуваного матеріалу, при цьому 38 зразків (32%) відповідали значенню *U. urealyticum* у титрі >10⁴ КУО/мл і 27 зразків (22%) відповідали кількості *U. urealyticum* у матеріалі <10³ під час визначення культуральним методом за допомогою тест-системи DUO, у 10 зразках генетичного матеріалу не виявлено. Генетичний матеріал *M. hominis* виявлено у 38 зразках (32%), при цьому 20 зразків (17%) відповідали значенню *M. hominis* у титрі >10⁴ КУО/мл і 18 (15%) відповідали кількості штамів *M. hominis* у титрі <10³ КУО/мл.

Серед усіх зразків, які мали позитивні результати, отримані методом ПЛР, тільки 38 зразків (32%) містили *U. urealyticum* у титрі >10⁴ КУО/мл і 20 зразків (17%) – *M. hominis* у концентрації >10⁴ КУО/мл, які мають клінічне значення. Менші концентрації цих мікроорганізмів не мають клінічного значення, хоча і виявляються ПЛР як позитивні. Імовірність отримання помилково позитивних результатів за використання ПЛР суттєво вища, ніж за тестування в наборі «Мікоплазма DUO». Це пов'язано з можливим неспецифічним зв'язуванням ДНК уреа- та мікоплазми як мішені, а також із можливою контамінацією зразків продуктами реакції.

На другому етапі дослідження з метою вивчення розповсюдження мікоплазмової інфекції у жінок різних вікових категорій пацієнток поділили на вікові групи. До I групи увійшли 78 пацієнток: виявлення мікоплазмової та уреаплазмової уrogenітальної інфекції, клінічні прояви запальних процесів у сечостатевої організації, відсутність вагітності. До II групи увійшли 39 пацієнток, у яких не виявлялося ознак запального процесу генітального тракту (безсимптомне носійство).

Частота виявлення генітальних мікоплазм у групі жінок із проявами запального процесу уrogenітального тракту: у дівчат 12–17 років – 3%, у віковій групі 18–23 – 15%, у жінок віком 24–29 – 32%, у віковій групі 30–35 років – 14%, у жінок понад 36 років – 3%. У жінок без прояву запального процесу частота виявлення мікоплазм менша, ніж у I групі обстежених пацієнток: у дівчат 12–17 років – 1%, у віковій групі 18–23 – 3%, у жінок віком 24–29 – 15%, у віковій групі 30–35 – 11%, у жінок понад 36 років – 3% (табл. 2).

Таблиця 2

Частота поширення (%) генітальних мікоплазм у жінок різних вікових груп

Вік, років	I група (n = 78)			II група (n = 39)		
	<i>U. urealyticum</i>	<i>M. hominis</i>	<i>M. hominis</i> – <i>U. urealyticum</i>	<i>U. urealyticum</i>	<i>M. hominis</i>	<i>M. hominis</i> – <i>U. urealyticum</i>
12–17	2	1	0	0	1	0
18–23	9	5	1	2	1	0
24–29	21	8	3	9	6	0
30–35	10	4	0	6	5	0
Старші 36	0	2	1	1	2	0
Усього	42	20	5	17	10	0

Порівняльна оцінка даних, отриманих у результаті лабораторного дослідження, показала, що найчастіше генітальні мікоплазми зустрічаються у жінок віком 24–

29 років. При цьому значно частіше виявляються *U. urealyticum*, ніж *M. hominis*, яка являє собою мікроорганізм із вищим патогенним потенціалом, ніж

M. hominis. За відсутності ознак запального процесу *U. urealyticum* зустрічається у низькій концентрації удвічі частіше, ніж у діагностично значимій концентрації. Збільшення кількості колонієтворних одиниць міко- та уреаплазм може слугувати маркером розвитку запального процесу уrogenітального тракту жінок. Найчастіше поширення генітальних мікоплазм у жінок віком 24–29 років пов'язане з підвищеною сексуальною та репродуктивною активністю, інколи воно може бути пов'язане з наявністю герпесвірусної інфекції та кандидомікозу.

Найменша частота виявлення спостерігається у дітей і поодинокі випадки – у жінок віком понад 36 років. Отримані дані свідчать про зв'язок *U. urealyticum* із клінічними проявами запальних процесів уrogenітального тракту і збігаються з результатами інших авторів. Ряд авторів (Robertson, 2002; Aujard, 2005; Jensen, 2013) довели, що мікоплазми можуть бути причиною вульвовагініту, уретриту, парауретриту, бартолініту, андекситу, сальпінгіту, ендометриту, запалення яєчників. Безсимптомне носійство уrogenітальних мікоплазм слід розглядати як стан ризику розвитку інфекційного процесу внаслідок дії факторів різної природи: змішані інфекції, зміна гормонального та імунного статусу організму тощо. Персистенція уrogenітальних мікоплазм в організмі жінки може супроводжуватися прихованими паталогічними змінами, пов'язаними з дисбіозом піхви. У вигляді моноінфекції мікоплазмозова інфекція була присутня лише у 20 пацієнтів (17%), в усіх інших випадках (83%) мікоплазмозова інфекція виявлялася у поєднанні з іншими етіологічно значимими мікроорганізмами у вигляді мікст-інфекції.

Висновки

Із виділень уrogenітального тракту жінок ідентифіковано генітальні мікоплазми *U. urealyticum* у 63% (75 зразків) і *M. hominis* – у 32% випадків (38 зразків). Аналіз розповсюдження мікроорганізмів у жінок різного віку показав, що домінуючим збудником уреаплазмозової інфекції у жінок є *U. urealyticum*. Найпоширеніша уреаплазмозова інфекція у жінок віком 24–29 років, що пов'язано з високою статевою активністю. У вигляді моноінфекції мікоплазмозова інфекція присутня лише у 20 пацієнток (17%), в інших випадках (83%) мікоплазмозова інфекція виявлялася у поєднанні з іншими етіологічно значимими мікроорганізмами у вигляді мікст-інфекції.

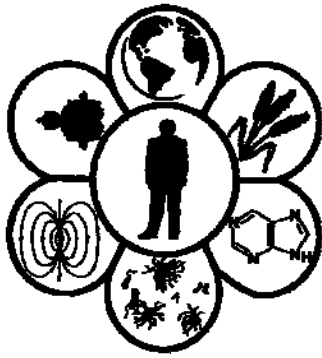
Порівнюючи різні методи дослідження (молекулярні методи ПЛР і культуральний метод тест-систему DUO), встановили, що для ефективнішої лабораторної діагностики мікоплазмозової інфекції необхідно застосовувати комплексну діагностику для підвищення вірогідності виявлення збудника у досліджуваних зразках.

Бібліографічні посилання

Aujard, Y., Maury, L., Doit, C., 2005. *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* infections in newborns: Personal data and review of the literature. Arch. Pediatr. 12(1), 12–18.

- Bashmakova, M.A., 2006. Laboratory diagnosis of genital infections. Reproduct. Problem. 5(1), 25–28 (in Russian).
- Boesen, T., Emmersen, J., Baczynska, A., 2004. The *vaa* locus of *Mycoplasma hominis* contains a divergent genetic islet encoding a putative membrane protein. BMC Microbiol. 4(1), 37–38.
- Deguchi, T., Yoshida, T., Miyazawa, T., 2004. Association of *Ureaplasma urealyticum* (biovar 2) with nongonococcal urethritis. Sex. Transm. Dis. 31(3), 192–195.
- Jensen, A., Kleveland, C., Moghaddam, A., 2013. *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* and *Ureaplasma urealyticum* among students in northern Norway. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 27(1), 146–147.
- Karabay, O., Topcuoglu, A., Kocoglu, E., 2006. Prevalence and antibiotic susceptibility of genital *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in a university hospital in Turkey. Clin. Exp. Obstet. Gynecol. 33(1), 36–38.
- LeRoy, C., LeHen, I., Clerc M., Arfel, K., 2012. The first performance report for the Bio-Rad Dx CT/NG/MG assay for simultaneous detection of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Mycoplasma genitalium* in urogenital samples. J. Microbiol. Methods. 89(3), 193–197.
- Lypova, E.V., Batakaev, E.V., 2009. Urogenital systems of associated infection with Mycoplasmas. Clin. Dermatol. Venereol. 26, 455–460.
- Pereyre, S., Sirand-Pugnet, P., Beven, L., 2009. Life on arginine for *Mycoplasma hominis*: Clues from its minimal genome and comparison with other human urogenital mycoplasmas. Plos. Genet. 10(5), 367–368.
- Petrakkos, G.L., Hadjisoteriou, M., Daikos, G.L., 2007. PCR versus culture in the detection of vaginal *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis*. Int. J. Gynaecol. Obstet. 97(3), 202–203.
- Rivera, J.A., Centeno, M., Santellan, O.M., Rodriguez, N.M., 2004. Prevalencia de *Ureaplasma urealyticum* en mujeres. Rev. Mex. Patol. Clin. 51(1), 33–36 (in Spanish).
- Rivera, J.A., Cedillo, M.L., Vega, M., 2001. Micoplasmasy su importancia médica. Rev. Biomed. 12(4), 262–271 (in Spanish).
- Robertson, J.A., Stemke, G.W., Davis, J.W., 2002. Proposal of *Ureaplasma parvum* sp. nov. and emended description of *Ureaplasma urealyticum*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52(2), 587–597.
- Ross, J.D., 2005. Is *Mycoplasma genitalium* a cause of pelvic inflammatory disease? Infect. Dis. Clin. North. Am. 19(2), 407–408.
- Taylor-Robinson, D., 2007. The role of mycoplasma in pregnancy outcome. Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol. 21(3), 425–438.
- Taylor-Robinson, D., Jensen, J.S., Svenstrup, H., Stacey, C.M., 2012. Difficulties experienced in defining the microbial cause of pelvic inflammatory disease. Int. J. STD AIDS 23(1), 18–24.
- Zdrodowska-Stefanow, B., Kosowska, W.M., Ostaszewska-Puchalska, I., 2006. *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* infection in women with urogenital diseases. Adv. Med. Sci. 51(1), 250–253.
- Zuo, C.X., Huang, J.H., Chen, J., Lu, J.Y., Xiang, Y.P., 2006. [Female urogenital mycoplasma infection and drug sensitivity status in Changsha]. Nan. Fang. Yi. Ke. Da. Xue. Xue. Bao. 26(6), 831–836 (in Chinese).

Надійшла до редколегії 11.04.2014



УДК 551.468.3(262.5)

**Фенотипическая пластичность
в соотношении полов
у *Idotea baltica basteri* (Crustacea, Isopoda)
в Одесском заливе Черного моря**

А.Ю. Варигин

Одесский филиал Института биологии южных морей НАН Украины, Одесса, Украина

Выявлена степень фенотипической пластичности в соотношении полов у равноногого ракообразного *Idotea baltica basteri* Audouin, 1827, входящего в состав зооценоза обрастания прибрежной зоны Одесского залива Черного моря. Определено соотношение самцов и самок у основных фенотипов *I. baltica basteri* (*uniformis*, *albufusca* и *lineata*), обитающих на подводной поверхности гидротехнических сооружений в трех районах залива на глубине от 1,0 до 2,5 м в условиях различной степени водообмена с открытым морем. При переходе от открытой акватории к полузакрытой с затрудненным водообменом доля самцов среди особей всех фенотипов уменьшается, а самок, соответственно, увеличивается. Показаны предпочтения самцов и самок в выборе локальных местообитаний.

Ключевые слова: *Idotea baltica basteri*; фенотипическая пластичность; соотношение самцов и самок

**Phenotypic plasticity
in the *Idotea baltica basteri* (Crustacea, Isopoda) sex ratio
in Odessa bay, Black Sea**

A.Y. Varigin

Odessa Branch of Institute of Biology of Southern Seas of NASU, Odessa, Ukraine

The degree of phenotypic plasticity in the *Idotea baltica basteri* Audouin, 1827 (Crustacea, Isopoda) sex ratio of the fouling community in the Odessa bay of the Black Sea was determined. The ratio of males and females in three main phenotypes of *I. baltica basteri*, namely: *uniformis*, *albufusca* and *lineata* was found. Crustaceans were collected on the underwater surface of traverses, located in three sea districts with the different degrees of water exchange intensity with the open sea. Water depth at the wall of traverses ranged from 1 to 2,5 m. In the first most opened district among the individuals of *uniformis* phenotype the ratio of males and females was equal to 1:4, that for *albufusca* – 1:1,3 and *lineata* – 1:1. In the second area with the release of drainage waters among the individuals of *uniformis* phenotype this ratio was equal to 1:4,5, while the *albufusca* and *lineata* figures were 1:1,5 and 1:1, accordingly. In the third region, with the most difficult water exchange, among the individuals of phenotypes the ratios of males and females were as follows: *uniformis* – 1:8, *albufusca* – 1:2, and *lineata* – 1:1. When moving from the opened to semi-enclosed area among the individuals of all phenotypes there was a gradual decline in the proportion of males and accordingly, increases of the proportion of females. The greatest number of males in all areas under study is observed among the individuals of *lineata* phenotype, and that of females – among the individuals of *uniformis* phenotype. It is found that monochromatic colored females prefer to stay in the shaded places among the seagrass beds and brightly colored males usually move actively along the outside of the substrata.

Keywords: *Idotea baltica basteri*; phenotypic plasticity; ratio of males and females

Введение

Представители равноногих ракообразных рода *Idotea* очень широко распространены в морях умеренных широт (Kusakin, 1979; Salemaa, 1979 a). В Черном море *Idotea baltica basteri* является наиболее массовым обитателем различных прибрежных сообществ (Teasa et al., 2006). Этот вид, хорошо приспособленный к значительным колебаниям температуры и солености морской воды, входит в качестве постоянного компонента в состав зооценоза обрастания твердых субстратов (Sezgin and Aydemir, 2010). По способу питания он всеяден, однако предпочитает растительную пищу (Prato et al., 2012). С другой стороны, эти ракообразные служат пищевым объектом для многих видов рыб, живущих в прибрежной зоне моря (Leidenberger, 2012).

Известно, что *I. baltica* являются раздельнополыми животными (Jormalainen et al., 1992). Половой диморфизм у взрослых особей выражен достаточно четко (Jormalainen and Tuomi, 1989). Самцы примерно в полтора раза крупнее самок (Merilaita and Jormalainen, 2000). У них первые пары переоподов видоизменены в хватательные конечности, служащие для удержания самки во время копуляции (Jormalainen et al., 2001). Половозрелые самки обычно шире самцов в области развития выводящей сумки, образованной попарно расположенными, налегающими друг на друга пластинками, представляющими собой выросты коксальных члеников грудных ног (Kusakin, 1979).

Кроме того, у особей *I. baltica* ярко выражен цветовой полиморфизм (Salemaa, 1978). Окраска у равноногих ракообразных является результатом взаимодействия пигментов кутикулы с пигментами, находящимися в хроматофорах (Bulnheim and Fava, 1982). Передвижение зерен различных пигментов в хроматофорах вызывает изменение интенсивности окраски животного (Kusakin, 1979). В ряде случаев это явление носит приспособительный характер (Merilaita, 2001). Ракообразные могут изменять интенсивность окраски своего тела в зависимости от цвета субстрата (Carabelos et al., 2010). Однако общий характер окраски у отдельных особей *I. baltica* в течение жизни остается неизменным (Bulnheim and Fava, 1982).

Для предотвращения интенсивных оползней еще в середине прошлого столетия одесские склоны были укреплены с помощью берегозащитных сооружений, представляющих собой систему погруженных в воду бетонных траверсов и волноломов, расположенных в прибрежной зоне моря. Подводная часть этих гидротехнических конструкций представляет собой подходящий субстрат, пригодный для развития организмов биоценоза обрастания. Его основу составляют двустворчатые моллюски *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819, образующие здесь прибрежный пояс биофильтраторов (Govorin, 2006). Этот краевой биоценоз в значительной мере обеспечивает процесс биологического самоочищения морской среды в результате фильтрационной активности моллюсков (Govorin et al., 2004; Govorin and Shatsillo, 2010). Кроме того, в его состав входят многие виды ракообразных, червей и моллюсков, которые находят здесь пищу и убежище. Одним из самых массовых обитателей зооценоза обрастания в этом районе моря

является представитель отряда Isopoda – *I. baltica basteri*. Несмотря на широкую распространенность и массовость *I. baltica basteri*, особенности половой и фенотипической структур поселений этих ракообразных в северо-западной части Черного моря остаются не изученными. Целью работы было выяснение степени фенотипической пластичности в соотношении полов у *I. baltica basteri* в различных условиях на подводной поверхности гидротехнических сооружений, расположенных в трех районах прибрежной зоны Одесского залива.

Материал и методы исследований

Материал собирали весной 2013 года во время массового размножения изучаемых ракообразных в прибрежной зоне моря. Пробы с подводной поверхности трех траверсов отбирали с помощью металлической рамки, размером 20 x 20 см, обтянутой мельничным газом. Эти траверсы расположены в разных районах прибрежной зоны Одесского залива. Акватории, ограниченные ими, характеризуются различной степенью интенсивности водообмена, что, в свою очередь, отражается на условиях обитания организмов, входящих в состав зооценоза обрастания. Первый из траверсов не соединяется с волноломом и находится в открытой акватории с наиболее интенсивным водообменом. Второй окружен волноломом и расположен в зоне сброса пресных вод из дренажной системы, входящей в состав берегоукрепительных сооружений Одесского побережья. Третий траверс находится в полузамкнутой акватории причала с очень ограниченным водообменом. В первом незащищенном волноломом участке моря волновое воздействие проявляется в наибольшей степени, во втором – значительно слабее, а в третьем – практически отсутствует. Глубина у стенки траверса в первом и втором участках составляет 2,5 м, в третьем – не более 1 м.

Отобранных животных промывали через систему почвенных сит с минимальным размером ячеек 0,5 мм. Затем ракообразных идентифицировали, определяли их пол (Kusakin, 1979). Фенотипическую принадлежность выявляли по характеру окраски наружных покровов животных (Salemaa, 1979 b). При этом выделяли три основных фенотипа: *uniformis* – монохромный или одноцветный, *albufusca* – пятнистый, выраженный в чередовании темных и светлых пятен и *lineata* – линейчатый, с хорошо различимой продольной полосой (рис. 1).

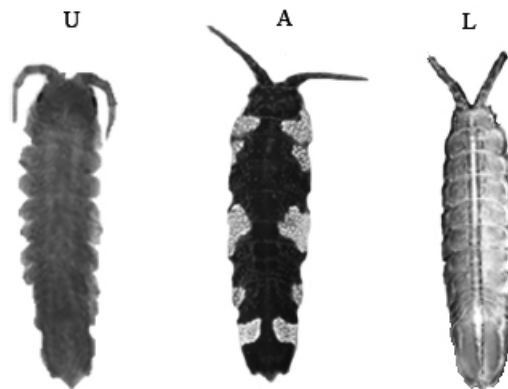


Рис. 1. Основные фенотипы *I. baltica basteri*: U – *uniformis*, A – *albufusca*, L – *lineata*

Для достижения поставленной цели определяли соотношение полов у основных фенотипов *I. baltica basteri* в каждом из трех исследуемых районов залива. Кроме того, производили измерение длины тела рачков с точностью до 0,1 мм. Всего исследовано 352 экземпляра *I. baltica basteri*.

Результаты и их обсуждение

В первой открытой акватории общее соотношение самцов и самок без учета их фенотипической принадлежности составляет 1:1,4. При этом средняя длина самцов здесь была $12,5 \pm 0,94$, самок – $9,1 \pm 0,82$ мм. Во второй акватории, находящейся в зоне сброса дренажных вод, это соотношение составляло 1:1,6. Средняя длина самцов – $13,2 \pm 0,57$, самок – $8,8 \pm 0,79$ мм. В третьей полузакрытой акватории общее соотношение самцов и самок было 1:2 (рис. 2). Средняя длина самцов – $14,2 \pm 0,45$, самок – $9,6 \pm 0,73$ мм.

При переходе от открытой акватории к полузакрытой средняя длина как самцов, так и самок возрастает. Однако эта разница в размерах оказалась статистически недостоверной. Более детальную картину дает анализ размерно-частотного распределения разных фенотипов и полов *I. baltica basteri*. На гистограммах размерно-

частотного распределения самцов для полузакрытого района моря видно, что при последовательном переходе от фенотипа *uniformis* к фенотипу *lineata* происходит сдвиг в сторону преобладания более крупных особей (рис. 3). Гистограммы, относящиеся к самкам, и показывают относительную стабильность размерно-частотного распределения всех фенотипов. Аналогичное распределение наблюдается и в других изученных районах моря.

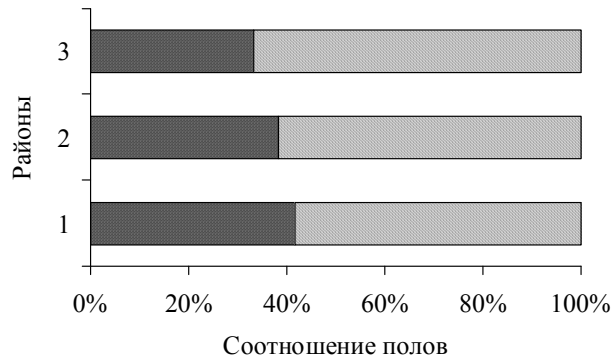


Рис. 2. Общее соотношение полов у *I. baltica basteri* из различных районов Одесского залива:
1 – открытый, 2 – с выпуском дренажных вод, 3 – полузакрытый район; светлой штриховкой отмечены самки, темной – самцы

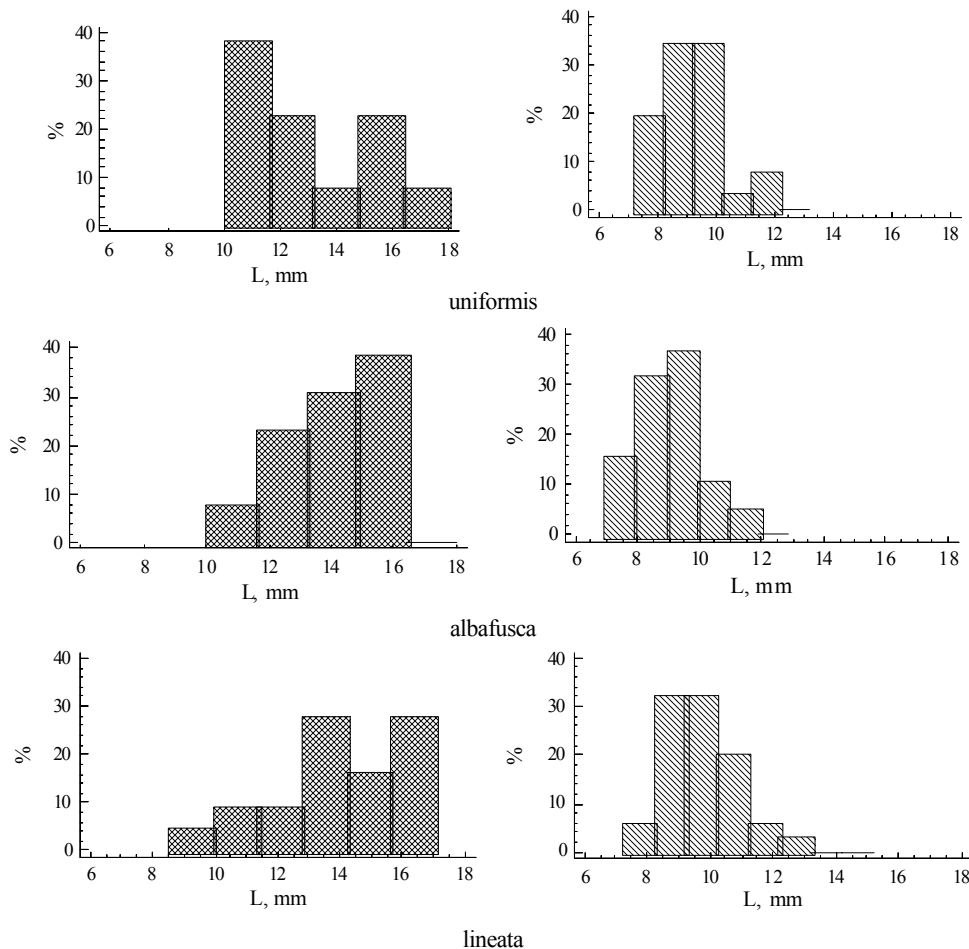


Рис. 3. Размерно-частотное распределение разных фенотипов и полов *I. baltica basteri* в полузакрытом районе Одесского залива:
крестообразной штриховкой отмечены самцы, косой – самки

В первом открытом районе среди особей фенотипа *uniformis* соотношение самцов и самок составляло 1:4, *albufusca* – 1:1,3 и *lineata* – 1:1. Во втором районе с выпуском дренажных вод среди особей фенотипа *uniformis* соотношение самцов и самок составляло 1:4,5, *albufusca* – 1:1,5 и *lineata* – 1:1. И в третьем полузакрытом районе среди особей фенотипа *uniformis* соотношение самцов и самок составляло 1:8, *albufusca* – 1:2 и *lineata* – 1:1 (рис. 4).

Как видно из полученных данных, наибольшее количество самцов отмечено среди особей фенотипа *lineata*. В этом случае наблюдается равное количество самцов и самок во всех изученных акваториях. При последовательном переходе от открытой акватории к полузакрытой среди особей фенотипа *albufusca* наблюдается постепенное снижение доли самцов и, соответственно, увеличение доли самок (до двух самок на одного самца). И, наконец, наибольшее относительное количество самок обнаружено среди представителей фенотипа *uniformis*. При переходе от открытой акватории к полузакрытой количество самок увеличивается так, что в итоге на каждого самца уже приходится не менее восьми самок.

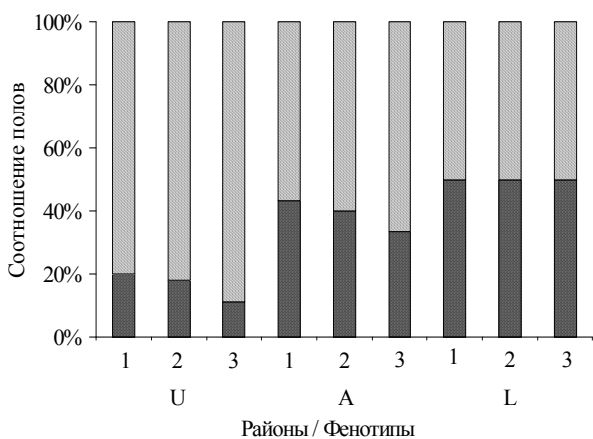


Рис. 4. Соотношение полов фенотипов *I. baltica basteri* в различных районах Одесского залива:

U – *uniformis*, A – *albufusca*, L – *lineate*; 1 – открытый, 2 – с выпуском дренажных вод, 3 – полузакрытый район; светлой штриховкой отмечены самки, темной – самцы

Такие различия в соотношении полов у представителей трех основных фенотипов *I. baltica* можно объяснить разными предпочтениями в выборе местообитания у самцов и самок этого вида (Veber et al., 2009). Однотонно окрашенные самки предпочитают держаться в затененных местах среди зарослей водорослей (Kotta and Kotta, 2004). Пестро окрашенные самцы обычно активно передвигаются вдоль наружной части субстрата (Vetter et al., 1999). Покровительственная окраска позволяет самцам сливаться с субстратом и таким образом избегать нападения рыб (Merilaita, 2001).

Увеличение относительного количества самок при переходе от открытых участков моря к полузакрытым свидетельствует о наиболее благоприятных условиях для размножения этого вида в мелководной защищенной от воздействия волн акватории.

Выводы

Степень фенотипической пластичности в соотношении полов у *I. baltica basteri* зависит от конкретных условий обитания в зооценозе обрастания Одесского залива Черного моря. При последовательном переходе от открытой акватории к полузакрытой с затрудненным водообменом среди особей всех фенотипов наблюдается постепенное снижение доли самцов и, соответственно, увеличение доли самок. Наибольшее количество самцов во всех изученных районах отмечено среди особей фенотипа *lineata*, а самок – среди особей фенотипа *uniformis*. Самки предпочитают держаться в затененных местах среди зарослей водорослей, а самцы – в наружной части субстрата.

Библиографические ссылки

- Bulnheim, H.P., Fava, G., 1982. Colour polymorphism and genetic variation in *Idotea baltica* populations from the Adriatic Sea and Baltic Sea. *Genetica* 59, 177–190.
- Carabelos, E., Lourido, A., Troncoso, J., 2010. Composition and distribution of subtidal and intertidal crustacean assemblages in soft-bottoms of the Ria de Vigo (NW Spain). *Sci. Mar.* 74(3), 455–464.
- Govorin, I.A., 2006. The role of mussels from biofouling of coast-protecting hydraulic facilities in forming of microbiological characteristics of the marine environment in the beach water areas. *Hydrobiol. J.* 42(5), 39–47.
- Govorin, I.A., Adobovsky, V.V., Shatsillo, Y.I., 2004. Fouling of hydroengineering structures with mussels as a natural biofilter component in the coastal zone of the Black Sea. *Hydrobiol. J.* 40(5), 62–69.
- Govorin, I.A., Shatsillo, Y.I., 2010. Formation of the filtering potential of the mussel and mytilaster settlements within anthropogenically transformed coastal zone of the Black Sea. *Hydrobiol. J.* 46(2), 3–12.
- Jormalainen, V., Merilaita, S., Riihimäki, J., 2001. Costs of intersexual conflict in the isopod *Idotea baltica*. *J. Evol. Biol.* 14, 763–772.
- Jormalainen, V., Tuomi, J., 1989. Sexual differences in habitat selection and activity of the colour polymorphic isopod *Idotea baltica*. *Anim. Behav.* 38, 576–585.
- Jormalainen, V., Tuomi, J., Merilaita, S., 1992. Mate choice for male and female size in aquatic isopod *Idotea balthica*. *Ann. Zool. Fennici* 29, 161–167.
- Kotta, H.O., Kotta, J., 2004. Food and habitat choice of the isopod *Idotea baltica* in the northeastern Baltic Sea. *Hydrobiologia* 514, 79–85.
- Kusakin, O.G., 1979. Morskie i solonovotvodnye ravnonogie rakoobraznye (Isopoda) holodnyh i umerennyh vod severnogo polusharija. *Podotr. Flabellifera* [Marine and brackish isopods (Isopoda) of cold and temperate waters of the northern hemisphere. Suborder Flabellifera]. Nauka, Leningrad (in Russian).
- Leidenberger, S., Harding, K., Jonsson, P., 2012. Ecology and distribution of the Isopod genus in the Baltic Sea: Key species in a changing environment. *J. Crust. Biol.* 32(3), 359–381.
- Merilaita, S., 2001. Habitat heterogeneity, predation and gene flow: Colour polymorphism in the isopod *Idotea baltica*. *Evol. Ecol.* 15, 103–116.
- Merilaita, S., Jormalainen, V., 2000. Different roles of feeding and protection in diel microhabitat choice of sexes in *Idotea baltica*. *Oecologia* 122, 445–451.

- Prato, A., Danieli, A., Mafia, M., Biandolino, F., 2012. Lipid contents and fatty acid compositions of *Idotea baltica* and *Sphaeroma serratum* (Crustacea: Isopoda) as indicators of food sources. *Zool. Stud.* 51(1), 38–50.
- Salemaa, H., 1978. Geographical variability in color polymorphism of *Idotea baltica* (Isopoda) in Northern Baltic. *Hereditas* 88, 165–182.
- Salemaa, H., 1979a. Ecology of *Idotea* spp. (Isopoda) in the Northern Baltic. *Ophelia* 18, 133–150.
- Salemaa, H., 1979b. Seasonal variability in the colour polymorphism of *Idotea baltica* (Isopoda) in the northern Baltic. *Hereditas* 90, 51–58.
- Sezgin, M., Aydemir, E., 2010. Rocky bottom crustacean fauna of Sinop (Black Sea, Turkey) coast. *Zool. Baetica* 21, 5–14.
- Teaca, A., Begun, T., Gomoiu, M.-T., 2006. Recent data on benthic populations from hard bottom mussel community in the Romanian Black Sea coastal zone. *Geo-Eco-Marina* 12, 43–51.
- Veber, T., Kotta, J., Lauringson, V., Kotta, I., 2009. Influence of the local abiotic environment, weather and regional nutrient loading on macrobenthic invertebrate feeding groups in a shallow brackish water ecosystem. *Oceanologia* 51(4), 541–559.
- Vetter, R.A., Franke, H.D., Buchholz, F., 1999. Habitat-related differences in the responses to oxygen deficiencies in *Idotea baltica* and *Idotea emarginata* (Isopoda, Crustacea). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 239, 259–272.

Надійшла до редколегії 19.03.2014



УДК 616.155+577.112.85:615.277

Активність матриксних металопротеїназ ММП2 та ММП9 у пацієнтів з мієло- та лімфопрولیферативними захворюваннями

Ю.А. Гордієнко

ДЗ «Дніпропетровська державна медична академія МОЗ України», Дніпропетровськ, Україна

Досліджено активність матриксних металопротеїназ ММП2 та ММП9 у плазмі крові пацієнтів з мієло- та лімфопрولیферативними захворюваннями до та після хіміотерапії антрацикліновими антибіотиками даунорубіцином і адрибластином. У хворих із гострим мієлолейкозом до початку терапії активність проММП9 була суттєво зниженою ($0,03 \pm 0,01$ ум. од.), втім після хіміотерапії цей показник зростав майже в 7 разів. Хронічний лімфолейкоз і множинна мієлома супроводжуються значним підвищенням ММП9. Застосування даунорубіцину викликає зменшення активності проММП9 до $0,25 \pm 0,10$ ум. од. у хворих на хронічний лімфолейкоз. При множинній мієломі активність проММП9 істотно знижується (у 16 разів), а ММП9 – підвищується. Співвідношення проММП9/ММП9 можна застосовувати як додатковий критерій моніторингу та ефективності хіміотерапії проліферативних захворювань крові.

Ключові слова: матриксні металопротеїнази; ММП2; ММП9; гострий мієлолейкоз; хронічний лімфолейкоз; множинна мієлома; антрациклінові антибіотики

Activity of MMP2 and MMP9 matrix metalloproteinases in patients with myeloproliferative and lymphoproliferative diseases

I.A. Gordiienko

State Enterprise “Dnipropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Health of Ukraine”, Dnipropetrovsk, Ukraine

MMP2 and MMP9 matrix metalloproteinases due to their ability to destroy basement membranes collagen and remodeling extracellular matrix (ECM) in the micro-environment of blood progenitor cells in the bone marrow play the important role in hematopoiesis. Displacement of normal hematopoiesis and dissemination of malignant cells in proliferative diseases of blood is also accompanied by catalytic ECM rearrangement. However, it is not known exactly how activity of MMP2 and MMP9 changes in various forms of leukemia and how it is affected by chemotherapeutic drugs. The aim of this study was to determine the influence of anthracycline antibiotics (daunorubicin and adriablastin) on MMP2 and MMP9 activity in blood plasma of patients with acute myeloid leukemia, chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma. It was established that proMMP9 activity was significantly reduced ($0,03 \pm 0,01$ rel. u.) in patients with acute myeloid leukemia before the treatment, however, after chemotherapy, it increased approximately 7 times. Chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma were accompanied by significant increase of MMP9 activity. Application of daunorubicin led to decrease of proMMP9 activity ($0,25 \pm 0,10$ rel. u.) in patients with chronic lymphocytic leukemia. ProMMP9 activity was significantly reduced (16 times) and that of MMP9 increased in case of multiple myeloma. In studying of MMP2 activity it did not significantly change. The conclusion is that the ratio of proMMP9/MMP9 can be used as the additional criterion for monitoring the effectiveness of chemotherapy of proliferative diseases of blood.

Keywords: MMP2 and MMP9 matrix metalloproteinases; acute myeloid leukemia; chronic lymphocytic leukemia; multiple myeloma; anthracycline antibiotics

Вступ

Лейкози відносять до злоякісних новоутворень кровотвірної тканини з первинною локалізацією в кістковому мозку. Цілковита невиліковність даних захворювань на сучасному рівні розвитку медицини – причина більш ретельного дослідження їх патогенезу. Мієло- та лімфо-проліферативні захворювання, як і будь-які неопластичні процеси, супроводжуються модифікацією екстраклітинного матриксу шляхом надмірного руйнування його складових, сприяючи дисемінації злоякісних клітин з кісткового мозку через периферичну кров до інших органів і тканин. Однак здатність клітин крові до міграції – їх основна фізіологічна характеристика. Ключовими ферментами, що забезпечують цей процес у нормальних і патологічних умовах, є матриксні металопротейнази (ММП) – схожі за доменною організацією цинкові кальційзалежні ендопептидази, поділені за субстратною специфічністю на колагенази, стромелізини, желатинази, мембранозв'язані ММП та ММП, що не увійшли до перелічених груп. Особливу увагу приділяють субродині желатиназ, що включає желатинази А і В (ММП2 та ММП9 відповідно), оскільки саме ці ензими здатні руйнувати колаген ІV типу, що є основним компонентом базальних мембран, адже саме подолання цієї перепони є важливим етапом в інвазії та метастазуванні.

Для лікування онкогематологічних захворювань найчастіше застосовують антрациклінові антибіотики, незважаючи на їх виражену токсичність, яка проявляється ураженням різних органів, насамперед, серця, печінки, нирок. Для ефективної профілактики та усунення небажаних ефектів треба враховувати патогенетичні механізми, які лежать в їх основі. Серед них розглядають перекисне окиснення ліпідів, порушення метаболізму жирних кислот, функцій мітохондрій, синтезу оксиду азоту тощо (Baklanova and Ushakova, 2013). Однак нині залишається невизначеним питання, як в умовах застосування цих препаратів змінюється активність желатиназ.

Мета роботи – виявити вплив препаратів антрациклінового ряду на активність ММП2 та ММП9 у хворих із гострим мієлолейкозом, хронічним лімфолейкозом і множинною мієломою.

Матеріал і методи досліджень

Усіх пацієнтів поділено на групи залежно від клінічного діагнозу: 1 – група пацієнтів із гострим мієлолейкозом (ГМЛ, $n = 10$), 2 – хворі на хронічний лімфолейкоз (ХЛЛ, $n = 7$), 3 – хворі на множинну мієлому (ММ, $n = 8$). Групу контролю склали клінічно здорові донори ($n = 20$). Середній вік пацієнтів усіх досліджуваних груп становив $56,1 \pm 4,3$ роки. Хворі першої та другої груп отримували даунорубіцин, а третьої – адрибластин. Усім пацієнтам вводили відповідні антибіотики внутрішньовенно з 30–40-хвилинною інфузією залежно від віку та площі поверхні тіла в дозі 45–60 мг/м²/добу впродовж трьох діб. Усі маніпуляції проведено згідно з існуючими стандартами (Vugov'ska et al., 2002). Для дослідження використовували цитратну плазму пацієнтів, яку отримували до лікування та на четверту добу після курсу хіміотерапії.

Активність досліджуваних ММП визначали методом желатин-зимографії з попереднім вертикальним електрофорезом зразків у 7,5% ПААГ за присутності 0,1% ДСН та 1% желатину (Sigma, США). Після закінчення електрофорезу гель промивали у розчині Тритон X-100 та інкубували за +37 °С протягом 16 годин у ензимному буфері, після чого гелі фарбували за кімнатної температури Кумасі діамантовим синім G250, розчиненим у суміші «метанол : оцтова кислота : вода» у співвідношенні 2,5 : 1,0 : 6,5. На зимограмах дія желатиназ проявлялась як висвітлені зони на синьому фоні. Відповідність зон лізису ММП2 та ММП9 оцінювали за допомогою маркерів Bio-Rad Lab (США) і позитивного контролю на ці ензими (Sigma, США).

Зимограми переводили у цифровий формат. Обробку результатів проводили за допомогою програми Videodensitometer Sorbfil 2.0. Активність желатиназ визначали в умовних одиницях (ум. од.) відносно активності цих ферментів у стандартному зразку, в якому цей показник був прийнятий за 1 ум. од. Як стандарт використовували пул плазми крові групи здорових донорів.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програм Statwin та Excel, використовуючи *t*-критерій Стьюдента та непараметричний критерій Манна – Уїтні (U-критерій). Вірогідними вважали відмінності між результатами, якщо $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення

В усіх досліджуваних групах основні зміни торкались активності ММП9 та її зимогену. У пацієнтів першої групи до лікування виявлено різке зменшення активності проММП9 відносно контролю (рис. 1). Як відомо, саме проММП9 – основний маркер зрілих циркулюючих нейтрофілів (Bouchet and Vauvois, 2014), а для перебігу ГМЛ характерна маніфестація незрілих бластних клітин, які втратили здатність до диференціації, з кісткового мозку у периферичну кров. У цих неповноцінних клітинах синтез ММП9 значно знижується, але повністю не припиняється (Gajdamaka et al., 2009). З іншого боку, ММП9 – критичний фактор неоангіогенезу. Літературні дані свідчать, що за ГМЛ щільність судин у кістковому мозку значно збільшується (Fu et al., 2010), тобто джерелом даного ферменту можуть виступати і нелейкемічні клітини кісткового мозку – стромальні та ендотеліальні клітини, фібробласти (Klein et al., 2004).

На фоні призначення даунорубіцину у пацієнтів цієї групи вірогідно підвищувалась активність обох форм ММП9 порівняно з аналогічними показниками до хіміотерапії. Найвиразнішими виявились зміни активності проММП9, яка зростала у 7 разів, у той час як зріла форма ММП9 підвищувалась лише у 1,8 раза. Отримані дані можна пояснити так. Активація НАД(Ф)Н-оксидази під впливом антрациклінових антибіотиків зумовлює генерацію великої кількості активних форм кисню та посилення активності редоксчутливих факторів транскрипції NF- κ B, AP1 та експресії прозапальних цитокінів (інтерлейкіну ІЛ6), що сприяє активації ММП9 (Spallarossa et al., 2006; Mittelstadt and Pate, 2012).

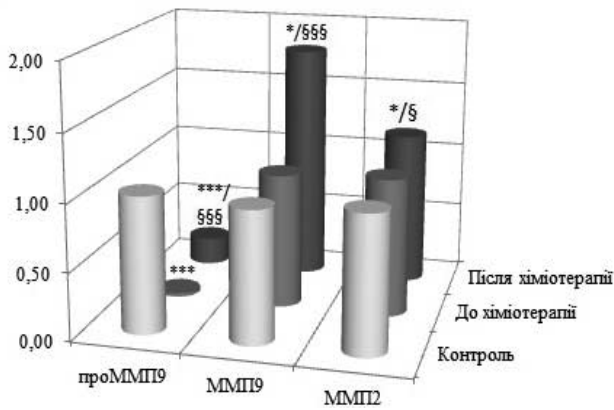


Рис. 1. Активність ММР2 та ММР9 у плазмі крові пацієнтів із гострим мієлолейкозом до та після хіміотерапії даунорубіцином:

* – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$, *** – $P < 0,001$ відносно контрольної групи, § – $P < 0,05$, §§ – $P < 0,01$, §§§ $P < 0,001$ відносно групи до хіміотерапії

На тлі застосування даунорубіцину у хворих цієї групи у 1,2 раза зростала активність ММР2.

У другій групі до хіміотерапії спостерігалось вірогідне (майже у 1,3 раза) підвищення ММР9 (рис. 2), яке можна пов'язати з тим, що трансформовані В-лімфоцити синтезують велику кількість проММР9 за сприяння ендотеліального фактора росту судин, фактора росту фібробластів β (ФРФ β), фактора некрозу пухлин α (ФНП α), накопичуючи, таким чином, певний пул зимогену (Yu and Han, 2006). Після застосування даунорубіцину у хворих із ХЛЛ спостерігалось пригнічення активності латентної ММР9 у 4,1 раза та зменшення ММР2 на 15%.

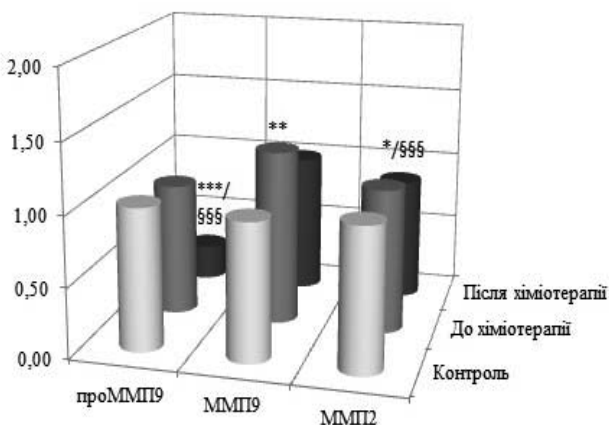


Рис. 2. Активність ММР2 та ММР9 у плазмі крові пацієнтів із хронічним лімфолейкозом до та після хіміотерапії даунорубіцином:

позначення див. рис. 1

Інші зміни активності желатиназ спостерігались у пацієнтів третьої групи. У ході роботи встановлено, що активність проММР9 у хворих на мієлому до лікування майже у 2,8 раза перевищувала нормальні значення, а активність ММР9 підвищувалась у 1,5 раза (рис. 3).

Означені зміни відповідають даним інших дослідників. Посилення експресії ММР9 мієломними клітинами та остеокластами стимулюється фактором росту гепатоцитів (HGF) та сигнальним трансдуктором і активатором транскрипції 3 (STAT3) (Kannaiyan, 2012). Мієломні

клітини також здатні до експресії інтегрину $\alpha\beta_3$, зв'язування якого з фібронектином і вітронектином теж викликає стимуляцію експресії ММР9 (Van Valckenborgh, 2004).

У разі застосування адрибластину у хворих із ММ спостерігалось різке падіння активності проММР9 (у 16 разів). Імовірно, це можна пояснити специфікою дії антрациклінових антибіотиків, які, порушуючи синтез ДНК та РНК, перешкоджають синтезу білків. Активність ММР9, навпаки, вірогідно підвищувалась майже на 30%.

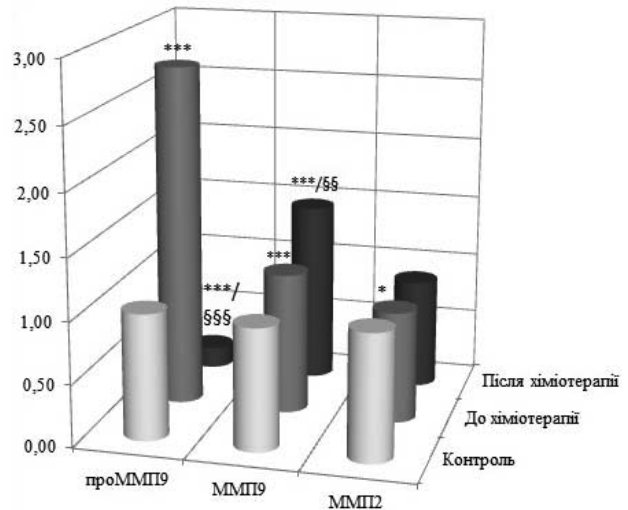


Рис. 3. Активність ММР2 та ММР9 у плазмі крові пацієнтів із множинною мієломою до та після хіміотерапії адрибластином:
позначення див. рис. 1

Одним із критеріїв успішної відповіді на хіміотерапію є цитоліз, який оцінюють за рівнем лейкоцитів і тромбоцитів у периферичній крові. Тобто у разі застосування антрациклінових антибіотиків задля лікування будь-якого лейкозу після курсу терапії відбувається часткова або повна ерадикація злоякісного клону клітин із тимчасовим пригніченням гемопоєзу, що супроводжується перебудовою екстраклітинного матриксу кісткового мозку. ММР9 – ключовий ензим, залучений до перелічених процесів. У цих умовах посилення активності ММР9 може бути свідченням відновлення мієлопоєзу в кістковому мозку (Vadhan-Raj et al., 2005). Цитотоксичність антрациклінових антибіотиків проявляється також відносно інших органів і тканин, які теж сприяють підвищенню активності ММР9 у крові.

У ході дослідження виявлено виразні зміни у співвідношенні проММР9/ММР9 під час дослідження плазми пацієнтів із різними варіантами лейкозів до та після терапії. У здорових донорів цей показник становив 1,03. До лікування в групі з ГМЛ співвідношення було найменшим (0,03), після закінчення циклу хіміотерапії цей показник підвищувався учетверо (0,12). У групі з ХЛЛ спостерігали проміжні зміни порівняно з іншими групами: перед початком лікування співвідношення проММР9/ММР9 у хворих цієї групи становило 0,76, після – знижувалось утричі. При ММ, навпаки, до введення адрибластину означений показник був вищим за норму у 2,4 раза, тоді як після хіміотерапії спостерігалось різке зменшення до 0,12.

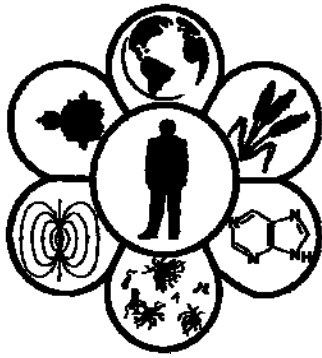
Висновки

Активність ММП9 та її зимогену є визначальною як для первісно встановленого діагнозу (до хіміотерапії), так і після лікування. Зміни активності ММП9 залежать від типу злоякісного захворювання крові. Визначення співвідношення проММП9/ММП9 може бути додатковим критерієм моніторингу та ефективності хіміотерапії проліферативних захворювань крові.

Бібліографічні посилання

- Baklanova, J.V., Ushakova, G.O., 2013. Toksychni efekty ta biohimichnyj kontrol' naslidkiv antracyklinovoi' terapii' [Toxic effects and biochemical control the consequences of anthracycline therapy]. *Arhiv Klinichnoi' ta Eksperymental'noi' Medycyny* 22(2), 242–248 (in Ukrainian).
- Bouchet, S., Bauvois, B., 2014. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), pro-matrix metalloproteinase-9 (pro-MMP-9) and their complex pro-MMP-9/NGAL in leukemias. *Cancers* 6, 796–812.
- Fu, J., Chen, X., Zhang, Y., Gu, H., Bai, Y., 2010. CD147 and VEGF co-expression predicts prognosis in patients with acute myeloid leukemia. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 40(11), 1046–1052.
- Gajdamaka, N.V., Parovichnikova, E.N., Zavalishina, L.J., Savchenko, V.G., Frank, G.A., 2009. Jekspressija matriksnyh metalloproteinaz i ih inhibitorov v kostnom mozge u bol'nyh ostrymi lejkozami [Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in the bone marrow of patients with acute leukemia]. *Gematologija i Transfuziologija* 54(2), 3–10 (in Russian).
- Kannaiyan, R., Surana, R., Shin, E.M., Ramachandran, L., Sethi, G., Kumar, A.P., 2012. Targeted inhibition of multiple pro-inflammatory signaling pathways for the prevention and treatment of multiple myeloma. Chapter 5, 93–128.
- Klein, G., Vellenga, E., Fraaije, M.W., Kamps, W.A., De Bont, E.S.J.M., 2004. The possible role of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in cancer, e.g. acute leukemia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 50, 87–100.
- Mittelstadt, M.L., Pate, R.C., 2012. AP-1 mediated transcriptional repression of matrix metalloproteinase-9 by recruitment of histone deacetylase 1 in response to interferon β . *PLoS One* 7(8), e42152.
- Spallarossa, P., Altieri, P., Garibaldi, S., Ghigliotti, G., Barisione, C., Manca, V., Fabbi, P., Ballestrero, A., Brunelli, C., Barsotti, A., 2006. Matrix metalloproteinase-2 and -9 are induced differently by doxorubicin in H9c2 cells: The role of MAP kinases and NAD(P)H oxidase. *Cardiovasc. Res.* 69, 736–745.
- Vadhan-Raj, S., Bueso-Ramos, C.E., Hangoc, G., Christopherson, K., Collard, M., Broxmeyer, H.E., 2005. Expansion of bone marrow progenitors and mobilization of multilineage progenitor cells associated with once-per-cycle administration of the long-acting growth factors pegfilgrastim and darbepoetin alfa with chemotherapy. *J. Support. Oncol.* 3(2), 22–23.
- Van Valckenborgh, E., Asosingh, K., Van Riet, I., Van Camp, B., Vanderkerken K., 2004. Matrix metalloproteinases in multiple myeloma. *Cancer Ther.* 2, 29–38.
- Vygovs'ka, J.I., Karol', J.S., Lukavec'kyj, L.M., Mazurok, A.A., Masljak, Z.V., Matlan, V.L., Novak, V.L., Rudenko, V.P., Cjapka, O.M., 2002. Standarty v gematologii' [Standards in Haematology]. PP Kwart, L'viv (in Ukrainian).
- Yu, X.F., Han, Z.C., 2006. Matrix metalloproteinases in bone marrow: Roles of gelatinases in physiological hematopoiesis and hematopoietic malignancies. *Histol. Histopathol.* 21, 519–531.

Надійшла до редколегії 24.03.2014



УДК 616.1+612

Аутоімунна реакція проти нейроспецифічних білків та якість життя пацієнтів з уродженою вадою серця

О.М. Лисунець¹, В.С. Недзвєцький²

¹УкрдержНДІ медико-соціальних проблем інвалідності МОЗ України, Дніпропетровськ, Україна
²Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпропетровськ, Україна

Представлено результати експериментальних досліджень аутоімунної реакції, спрямованої проти нейроспецифічних білкових антигенів у пацієнтів з уродженою вадою серця. Титр аутоантитіл до білків мозку у таких пацієнтів значно перевищує показники контрольної групи. Підвищення титру аутоантитіл корелює зі здатністю до вирішення задач на виявлення складних аналогій і зниженням якості життя. Таким чином, зниження якості життя та розвиток пізнавального дефіциту у пацієнтів із патологіями серцево-судинної системи може бути асоційоване з аутоімунною реакцією проти специфічних білків клітин нервової тканини. Отримані результати показують, що генерація аутоантитіл у пацієнтів з уродженим пороком серця асоційована з розвитком когнітивного дефіциту. Однією з найважливіших причин пізнавального спаду може бути стан гіпоксії під час проведення хірургічного втручання. Наслідки гіпоксії, у свою чергу, супроводжуються хронічним оксидативним стресом. Молекулярні та клітинні порушення вільними радикалами – поширена причина широкого спектру патологій. Подальші дослідження необхідні для валідації діагностичних критеріїв відносно диференціації причин розвитку пізнавального дефіциту у групі пацієнтів з уродженим пороком серця. Такі дослідження дозволять розкрити механізми впливу гіпоксичних пошкоджень у результаті розвитку оксидативного стресу у клітинах нервової тканини. Розуміння зв'язку між спадом пізнавальної функції та патологією серцево-судинної системи необхідно для точного клінічного діагнозу та раннього попередження ускладнень.

Ключові слова: аутоантитіла; якість життя; пізнавальний дефіцит; нейроспецифічні антигени

Autoimmune reaction against neurospecific proteins and life quality of patients with congenital heart failure

H.M. Lisunets, V.S. Nedzvetsky

Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Dnipropetrovsk, Ukraine

The results of experimental investigation of autoimmune reaction targeted against neurospecific protein antigens in patients with congenital heart failure are presented. It is shown that titer for autoantibodies to these patients' brain proteins is significantly higher compared with healthy persons. Elevation of titer of these autoantibodies is correlated with the ability to solve tasks for revealing complex analogies and decrease of life quality. Therefore, worsening of life quality and development of cognitive deficit in patients with cardiovascular diseases might be associated with autoimmune reaction against specific proteins of nervous tissue cells. The results obtained demonstrate that generation of autoantibodies in patients with congenital heart failure is linked with the cognitive deficit. One of the most important causes of cognitive decline could be hypoxia state due to surgery intervention. Consequences of hypoxia, in their turn, are accompanied by chronic oxidative stress. Molecular and cell injuries induced by free radicals are known to be the widely spread cause of various pathologies. Further investigations for validation of diagnostic hallmarks for estimation of the origin of progression of the cognitive deficit in patients with congenital heart failure are needed. These studies will allow clarifying mechanisms of influence of hypoxia-induced injuries associated with the aggravation of oxidative stress in nervous tissue cells. Understanding of relationship between decline of cognitive function and pathologies of cardiovascular system is necessary for more precise clinical diagnostics of the early prevention of possible complications and proper treatment of patients.

Keywords: autoantibodies; life quality; cognitive deficit; neurospecific antigens

Вступ

Прогресивне зростання кількості захворювань серцево-судинної системи та широке коло ускладнень, асоційованих із погіршенням функцій ЦНС, зумовлюють особливий інтерес до вивчення молекулярних і клітинних механізмів, які викликають порушення пам'яті, здатності до навчання та розвиток пізнавального дефіциту в людей із різними серцевими патологіями. Останніми роками інтенсивно досліджуються причини та патогенез розвитку пізнавального дефіциту у пацієнтів із серцевою недостатністю та вродженою вадою серця (BBC) (Pressler et al., 2010).

Серцево-судинна патологія може бути одним із причинних факторів погіршення показників психомоторної реакції, пам'яті та виконавчих функцій принаймні в одного із п'яти пацієнтів. Істотним ускладненням у вивченні зв'язку серцевої патології з нервовими розладами є необхідність диференціації біохімічних, фізіологічних і соціальних факторів (Sloan et al., 2009). Актуальність досліджень підкреслюється також сучасними вимогами визначення показників якості життя в контексті спаду нервових функцій у таких пацієнтів (Pressler et al., 2010). Молекулярні механізми, які спричинюють функціональні розлади ЦНС у пацієнтів із серцево-судинними патологіями, залишаються не вивченими. Ішемічні ушкодження у тканині мозку внаслідок хронічної недостатності кисню індукують порушення окисно-відновного балансу та розвиток окисного стресу. Окисний стрес, у свою чергу, є одним із найпоширеніших факторів, що індукують структурні та функціональні порушення у клітинах нервової системи (Pratico and Delanty, 2000). Клітини нервової системи є одними з найчутливіших до окисних ушкоджень порівняно з клітинами інших тканин. Нейродегенерація, що викликається окисним стресом, може бути однією з важливих причин порушень функцій ЦНС, зокрема, пізнавальної здатності, навчання та пам'яті (Baydas et al., 2005). У хворих із BBC виявляється підвищений рівень факторів запальної реакції, а також ознаки гіпоксії та окисного стресу, порушення проникності ГЕБ у ранньому післяопераційному періоді (Wolman et al., 1999; Mariani et al., 2005).

Незважаючи на значний прогрес медико-біологічних наук в останні десятиліття, залишаються не з'ясованими причини порушення показників вищої нервової діяльності у хворих на BBC. Не розкрита також роль імунних реакцій, зокрема, генерації аутоантитіл до нейроспецифічних білків у системних порушеннях взаємодії імунної та нервової систем. Мета роботи – визначити аутоантитіла, їх титр і специфічність до антигенів тканини мозку у пацієнтів із BBC.

Матеріал і методи досліджень

Кров відбирали у пацієнтів із BBC на другу добу після надходження до стаціонару. У зразках сироватки методом імуноблотингу визначали присутність аутоантитіл. Специфічність тестували до антигенів із відмінними фізико-хімічними властивостями: розчинної,

мембранної та цитоскелетної фракцій білків. Відповідні фракції, збагачені білками клітин мозку, одержували як описано раніше (Nedzvetsky et al., 2006; Baydas et al., 2003). Зразки білків мозку розділяли електрофорезом у поліакриламідному гелі (Baydas et al., 2003). Імуноблотинг із моноспецифічними антитілами проти гліального фібрилярного кислого білка (ГФКБ) проводили як це описано раніше (Nedzvetsky et al., 2006).

Отримані результати сканували та аналізували за допомогою комп'ютерної програми AlfaImager 2000. Для кожної сироватки пацієнтів із BBC визначали максимальне розведення, за якого інтенсивність забарвлення основних поліпептидних зон була не меншою за умовну одиницю. Всі проби білків мозку містили однаково кількість загального білка (30 мкг). Вміст загального білка у пробах визначали методом Лоурі в модифікації Міллера (Miller, 1959). У роботі застосовували для дослідження когнітивної функції прогресивні матриці Равена, для дослідження якості життя хворого – методику оцінки якості життя Всесвітньої організації охорони здоров'я (українську версію).

Отримані дані обробляли з використанням стандартних методів математичної статистики (пакет програм Statistica 6.0).

Результати та їх обговорення

Результати дослідження показали присутність у сироватці крові пацієнтів із BBC аутоантитіл, які специфічно реагували з білками всіх досліджених фракцій. Найінтенсивніша реакція (за розведення сироваток 1:200) виявлена із фракціями цитоскелетних і мембранних білків мозку. Менш виражена реакція аутоантитіл виявлена також із розчинними білками, виділеними буфером із низькою іонною силою.

Реакцію аутоантитіл до антигенів нервової тканини виявлено у 47 з 52 пацієнтів із групи BBC і в 3 із 38 зразків сироватки контрольної групи. Імуноблотингом ідентифіковано молекулярну масу білкових антигенів нервової тканини, з якими специфічно реагували аутоантитіла пацієнтів із BBC. Більшість поліпептидів, які специфічно розпізнавалися аутоантитілами, мала молекулярну масу в діапазоні 30–90 кДа. Враховуючи фізико-хімічні властивості білків кожної фракції та молекулярну масу даних поліпептидів, можна припустити, що саме нерозчинні цитоскелетні білки та білки, асоційовані з мембранами, можуть бути основною мішенню специфічно спрямованої аутоімунної реакції пацієнтів із BBC. Умови проведення імуноблотингу дозволяють виключити неспецифічні реакції.

Аутоантитіла, які реагували з нервовоспецифічними антигенами молекулярною масою понад 90 кДа, були виявлені у 37% пацієнтів із BBC. У переважній більшості когорти пацієнтів, у яких виявлено аутоімунну реакцію, більшість аутоантитіл (94%) були специфічними до білків масою 37–50 кДа. На особливу увагу заслуговує факт, що такі антигени були представлені в усіх трьох досліджених фракціях.

Імуноблотинг білкових фракцій печінки показав, що антитіла із сироваток пацієнтів не мали специфічної спрямованості проти антигенів печінки людини та щура.

Зважаючи на те, що у печінці найширше представлені білкові антигени хребетних, цей факт підтверджує спрямованість аутоімунної реакції переважно проти нервовоспецифічних антигенів.

Існують різні гіпотези про природу та роль аутоантитіл. Однак не викликає сумнівів факт їх присутності в організмі людини та інших хребетних. Природні аутоантитіла являють собою пул молекул, які є частиною репертуару нормальних імуноглобулінів (Wright et al., 2009). Незважаючи на значний прогрес молекулярних методів дослідження аутоімунних реакцій, механізми активації лімфоцитів і синтезу аутоантитіл проти ЦНС-антигенів залишаються не повністю зрозумілими (Zhang and Popovich, 2011).

На сьогодні є неоднозначні дані про присутність аутоантитіл до антигенів ЦНС за різних патологій нервової системи. Аутоімунна реакція може бути індукована органічними uszkodженнями нервової тканини, порушенням проникності ГЕБ, порушеннями механізмів саморозпізнавання в імунній системі, а також збігом усіх цих причинних факторів (Levin et al., 2010). Однією з найприйнятніших і ймовірних причин генерації аутоантитіл до антигенів нервової тканини вважається порушення цілісності ГЕБ і доступність антигенів нервової тканини для імунокомпетентних клітин (Arshavsky, 2006).

Останнім часом показано, що переважна кількість різних за природою uszkodжувальних факторів викликає активацію, у першу чергу, гліальних клітин – астроцитів та мікроглії (Wright et al., 2009). У ЦНС саме астроцити за рахунок щільних контактів із судинами формують ГЕБ. Можливість uszkodжень ГЕБ унаслідок гіпоксії доведено численними клінічними та експериментальними дослідженнями. На ранніх стадіях хронічної ішемії мозку мають місце порушення у вигляді підвищення вмісту нейротропних аутоантитіл. Уже на початкових стадіях хронічної ішемії при відносно мінімальних клінічних та інструментальних симптомах може бути стимульована генералізована імунізація до структурних компонентів нервової тканини (Zhang and Popovich, 2011). Ішемія активує процеси як некротичної, так і апоптичної загибелі клітин мозку, що стимулює утворення цитокінів і нейротрофічних факторів гліальними клітинами. З одного боку, активація глії за умов uszkodжень забезпечує нормальну життєдіяльність нейронів, а з іншого – сприяє синтезу та вивільненню факторів, які активують імунні реакції (Levin et al., 2010).

У багатьох експериментальних моделях показано, що розвиток окисного стресу є наслідком порушення балансу між активністю мітохондрій і метаболізмом субстратів циклу Кребса – донорів протонів для дихального ланцюга. Одним із найпоширеніших факторів, здатним індукувати астрогліоз, є саме окисний стрес (Arshavsky, 2006). Мультифакторна спрямованість наслідків окисних uszkodжень зумовлює надзвичайну складність розкриття молекулярних і клітинних механізмів, які визначають погіршення пам'яті та розвиток пізнавального дефіциту. У відповідь на окисні uszkodження в нервовій тканині активується синтез медіаторів запальної реакції, які одночасно є стимуляторами імунної відповіді (Kuboyama et al., 2010). ГЕБ забезпечує відособленість клітин нервової тканини від

контакту з імунною системою. Астроцити формують ГЕБ завдяки щільним безпосереднім контактам астроцитів з ендотеліальними клітинами судин мозку. Крім формування ГЕБ астроцити виконують у мозку велику кількість життєво важливих функцій. Вони забезпечують енергетичні витрати нейронів, іонний баланс, синтезують широкий спектр цитокінів і несуть на своїй поверхні рецептори, подібні до рецепторів лімфоцитів і макрофагів (Sofroniew and Vinters, 2010). У пацієнтів із гострим ішемічним інсультом визначаються аутоантитіла, спрямовані проти антигенів клітин ЦНС (Ankeny and Popovich, 2010). Автори припускають, що провідну роль у генерації таких антимозкових антитіл відіграють uszkodження ГЕБ і контакт нервовоспецифічних антигенів з імунокомпетентними клітинами.

З огляду на той факт, що у пацієнтів із ВВС оперативне втручання супроводжувалось гіпоксією, можна припустити високу імовірність розвитку окисного стресу. У свою чергу, розвиток окисного стресу у тканині мозку певною мірою може спричиняти характерну захисну реакцію гліальних клітин – гліоз. Астроцити роблять найбільший внесок у таку реактивну відповідь. У ході астрогліозу астроцити активують синтез і вивільнення різних ростових факторів, сигнальних молекул, у тому числі фактор некрозу пухлин та інтерлейкіни, які беруть безпосередню участь в активації як імунних реакцій, так і запального процесу. Враховуючи це, можна припустити, що саме астроцити є сполучною ланкою між імунною та нейроендокринною системою у ході таких подій. На користь цього свідчать також результати досліджень аутоантитіл проти цитоскелетного маркера астроцитів (ГФКБ), які виявлені майже у 30% пацієнтів із запальними захворюваннями ЦНС і множинним склерозом (Bien, 2011). Дефекти ГЕБ сприяють контактуванню антигенів ЦНС з імунокомпетентними клітинами. Внаслідок такої стимуляції може розвиватися аутоімунна реакція до нейроспецифічних антигенів.

Діагностика та розуміння імунно-опосередкованих патологій отримали значний прогрес завдяки ідентифікації аутоантител у сироватці та ЦСЖ пацієнтів із різними захворюваннями. Недавно виявлені аутоантитіла, які реагують із поверхневими антигенами нейронів, зокрема – рецепторами, каналами та асоційованими з ними білками. Небезпідставно припускають можливий прямий патогенетичний ефект аутоантитіл на нейрони ЦНС. Існують приклади досить повно вивчених синдромів типово асоційованих з аутоантитілами до антигенів мозку (Bien, 2011).

Кардіоваскулярні фактори ризику можуть ініціювати порушення ГЕБ. Оскільки мозок є захищеним ГЕБ від реакцій імунної системи, навіть незначне ослаблення бар'єрної функції може викликати дисбаланс взаємин нейроендокринної та імунної систем. Зокрема, для процесу консолідації пам'яті необхідний синтез нових макромолекул, які відрізняються лише конформаційними детермінантами. Однак імунна система здатна розпізнавати такі макромолекули як «не свої» антигени. Варто врахувати, що поки така концепція залишається гіпотетичною та має потребу в експериментальних аргументах (Arshavsky, 2006). На підставі проведеного клінічного дослідження, аналізу психологічних особли-

востей та якості життя доцільно звернути увагу на патофізіологічні аспекти нервово-психічних розладів у даної групи пацієнтів. Якісний аналіз когнітивної сфери пацієнта проводили за допомогою методики «Прогресивні матриці Равенна» (табл.).

Таблиця

Аналіз порушень когнітивної сфери за допомогою методики «Прогресивні матриці Равенна»

Рівень когнітивних функцій	Частка порушень, %
Високий	4,8
Середній	69,8
Нижче середнього	25,4

Під час дослідження рівня наочних форм мислення за допомогою прогресивних матриць Равенна виявлено, що основна маса результатів припадала на середній рівень наочних форм мислення, дуже низький рівень наочного інтелекту не був діагностований. Також під час якісного аналізу помилок, що допускаються випробуваними, нами виявлено статистично значимі ознаки. Хворі з оперованими ВВС найчастіше допускають помилки у складних кластерах завдань (систематизація мислення, відновлення складних логічних зв'язків, розкриття істотних зв'язків між предметами та явищами). Слід зазначити, що за показником складних аналогій виявлені взаємозв'язки з усіма напрямками обмеження життєдіяльності (навчання та застосування знань, спілкування, мобільність, побутове життя, міжособова взаємодія).

Таким чином, для дослідженої групи пацієнтів з оперованими ВВС притаманне не тільки зниження інтелектуальних показників, а і якісне порушення наочних форм мислення. Такі інтелектуальні показники у сполученні з неврологічними порушеннями можуть служити додатковим діагностичним критерієм рівня непрацездатності.

Висновки

У пацієнтів із ВВС генерація аутоантитіл, спрямованих в основному проти нейроспецифічних білків, асоційована з когнітивним спадом. Однією з причин розвитку аутоімунної реакції та пізнавального дефіциту в дослідженій групі може бути гіпоксія під час хірургічного втручання. Подальші дослідження також необхідні для валідизації діагностичних критеріїв щодо диференціації причин розвитку пізнавального дефіциту у групах пацієнтів із ВВС. Подібні дослідження дозволять розкрити та з'ясувати вплив гіпоксичних ушкоджень у результаті розвитку оксидативного стресу у клітинах нервової тканини. Виявлення зв'язку між погіршенням пізнавальної функції та серцево-судинними патологіями може бути використане для точнішого клінічного діагнозу, раннього попередження та ставлення до пацієнта.

Бібліографічні посилання

Ankeny, D.P., Popovich, P.G., 2010. B cells and autoantibodies: Complex roles in CNS injury. *Trends Immunol.* 319(9), 332–338.

Arshavsky, Y.I., 2006. Alzheimer's disease, brain immune privilege and memory: A hypothesis. *J. Neural Transmission.* 113(11), 1697–1707.

Baydas, G., Koz, S.T., Tuzcu, M., Etem, E., Nedzvetzky, V.S., 2007. Melatonin inhibits oxidative stress and apoptosis in fetal brains of hyperhomocysteinemic rat dams. *J. Pineal Res.* 43, 225–231.

Baydas, G., Nedzvetzky, V.S., Nerush, P.A., Kirichenko, S.V., Yoldas, T., 2003. Altered expression of NCAM in hippocampus and cortex may underlie memory and learning deficits in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Life Sci.* 73(15), 1907–1916.

Bien, C.G., 2011. Antibody-associated diseases of the gray matter of the CNS: Diagnosis and treatment. *Nervenarzt.* 82(8), 986–993.

Kuboyama, K., Harada, H., Tozaki-Saitoh, H., Tsuda, M., Ushijima, K., Inoue, K., 2011. Astrocytic P2Y1 receptor is involved in the regulation of cytokine/chemokine transcription and cerebral damage in a rat model of cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 31, 1930–1941.

Laemmli, O.H., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(1), 243–246.

Levin, E.C., Acharya, N.K., Han, M., Zavareh, S.B., Sedeyn, J.C., Venkataraman, V., Nagele, R.G., 2010. Brain-reactive autoantibodies are nearly ubiquitous in human sera and may be linked to pathology in the context of blood-brain barrier breakdown. *Brain Res.* 1345(3), 221–232.

Mariani, E., Polidori, M.C., Cherubini, A., Mecocci, P., 2005. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: An overview. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 827, 65–75.

Miller, G.L., 1959. Protein determination for large numbers of samples. *Anal. Chem.* 31(5), 964–966.

Nedzvetzky, V.S., Tuzcu, M., Yasar, A., Tikhomirov, A.A., Baydas, G., 2006. Effects of vitamin E against aluminum neurotoxicity in rats. *Biochem. (Mosc).* 71(3), 239–244.

Pratico, D., Delanty, N., 2000. Oxidative injury in diseases of the central nervous system: Focus on Alzheimer's disease. *Am. J. Med.* 109, 577–585.

Pressler, S.J., Subramanian, U., Kareken, D., Perkins, S.M., Gradus-Pizlo, I., Sauvé, M.J., Ding, Y., Kim, J., Sloan, R., Jaynes, H., Shaw, R.M., 2010. Cognitive deficits in chronic heart failure. *Nursery Research* 59(2), 127–139.

Pressler, S.J., Subramanian, U., Kareken, D., Perkins, S.M., Gradus-Pizlo, I., Sauvé, M.J., Ding, Y., Kim, J., Sloan, R., Jaynes, H., Shaw, R.M., 2010. Cognitive deficits and health-related quality of life in chronic heart failure. *J. Cardiovasc. Nurs.* 25(3), 189–198.

Sloan, R.S., Pressler, S.J., 2009. Cognitive deficits in heart failure: Re-cognition of vulnerability as a strange new world. *J. Cardiovasc. Nurs.* 24(3), 241–248.

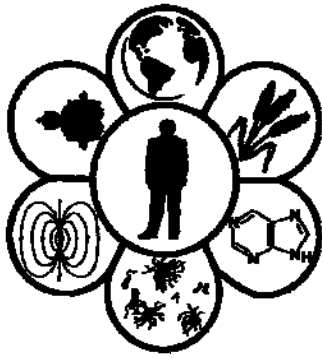
Sofroniew, M.V., Vinters, H.V., 2010. Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119, 7–35.

Wolman, N.A., Nussmeier, A., Aggarwal, R.L., 1999. Cerebral injury after cardiac surgery; identification of a group at extraordinary risk. *Stroke* 30, 514–522.

Wright, B.R., Warrington, A.E., Edberg, D.D., Rodriguez, M., 2009. Cellular mechanisms of central nervous system repair by natural autoreactive monoclonal antibodies. *Arch. Neurol.* 66(12), 1456–1459.

Zhang, Y., Popovich, P., 2011. Roles of autoantibodies in central nervous system injury. *Discov. Med.* 11(60), 395–402.

Надійшла до редколегії 27.03.2014



УДК 577.156+612.015

Використання специфічних біомаркерів донних риб Керченської протоки для оцінки забруднення водних біоресурсів

О.В. Сухаренко

Керченський державний морський технологічний університет, Керч, Україна

Сучасна екологічна ситуація у водах Керченської протоки потребує оцінки порушень у біотопах і моніторингу ступеня впливу промислових забруднень на екосистему. Відкладення нафтопродуктів після катастрофи судів у 2007 році може мати несприятливий вплив на стан біоценозів акваторії. Проведене дослідження цитоскелетного маркера астроцитів гліального фібрилярного кислого білка (ГФКБ) у мозку бичка-пісочника (*Neogobius fluviatilis*), який є типовим представником промислових донних риб Керченського проливу. Результати порівняльного аналізу вмісту ГФКБ у мозку риб із прибережних вод бухти Керченська і з умовно чистої частини р. Ворскла показали достовірне збільшення ГФКБ (у 2,18 раза) у промислово забрудненому регіоні. Підвищення вмісту ГФКБ вказує на розвиток астрогліозу у результаті метаболічних порушень, які можуть бути викликані забрудненням нафтопродуктами придонних горизонтів бухти Керченська. У тканині мозку групи риб, виловлених у Керченській бухті виявлене збільшення вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів. Представлені результати порушень стану цитоскелету астроцитів і оксидативний стрес у мозку бичка-пісочника Керченської бухти свідчать про прояв сублетального біологічного ефекту промислових забруднювачів у гідробіонтів даної акваторії. Результати досліджень вказують на потребу постійного екологічного моніторингу та комплексного дослідження популяцій гідробіонтів промислових регіонів і зон екологічних катастроф.

Ключові слова: молекулярні маркери; гліальний фібрилярний кислий білок; промислове забруднення; водні біоресурси

Assessment of Kerch Bay environmental pollution using neuroglial proteins of ground fish

H.V. Sukharenko

Kerch State Marine Technological University, Kerch, Ukraine

The modern ecology situation in waters of the Kerch Strait requires assessment of disturbances in biotopes and monitoring of the degree of impact of industrial pollutants on ecosystem. Deposit of oil products after the 2007 year ships' accidents might have considerable impact on the water biocenosis area. The investigation of cytoskeleton marker of astrocytes glial fibrillary acidic protein (GFAP) in brain of the bullhead (*Neogobius fluviatilis*), which is the typical representative of the commercial ground fish of the Kerch Strait, has been carried out. The results of comparative analysis of GFAP content in the brain of fish from the Kerch Bay near-shore waters and fish from conditionally clear area of Vorskla river shows the reliable (2.18 times) increasing of GFAP in the area of industrial pollution. Rising GFAP content indicates the astrogliosis development as a result of metabolic disturbances which can be induced by higher content of oil products in the near-bottom biotopes of the Kerch Bay. Increase in lipid peroxidation level was observed in the brain of fish from the Kerch Bay. The results provided with regard to violations of the state of astrocyte cytoskeleton and oxidative stress in the brain of bullhead from the Kerch Bay prove the sublethal biology effect of industrial pollutants in hydrobionts from this area. Results of this investigation also indicate the necessity of continuous ecology monitoring and comprehensive study of hydrobiont populations in the industrial regions and ecological disaster zones.

Keywords: molecular markers; glial fibrillary acidic protein; industrial pollution; water bioresources

Вступ

Відносно зниження промислових викидів за останні роки принципово не відбивається на екологічному стані водних біоресурсів України. Це зумовлено рядом об'єктивних причин. У деяких регіонах навіть зафіксовано значне погіршення показників тотального забруднення акваторій. Інтенсифікація судноплавства спричинила зростання ерозійних процесів і прогресуючої реседиментації донних відкладів. Збільшенню забруднення акваторії сприяла робота декількох морських портів і рейдово-перевантажувальних комплексів.

Представники зообентосу – основні об'єкти живлення донних промислових риб. Забруднення донних відкладів може спричинювати порушення екологічної рівноваги у популяціях донних риб. Саме тому надзвичайно актуальною є комплексна оцінка на всіх рівнях організації біологічних систем. Чутливим індикатором рівня комбінованої дії токсинів на рівновагу метаболічних процесів хребетних є клітини нервової тканини. Найчутливішими до дії ушкоджувальних чинників клітинами нервової тканини є астроцити. Головним компонентом цитоскелета цих клітин є гліальний фібрилярний кислий білок (ГФКБ), експресія якого є характерним показником реакції астроцитів у відповідь на ушкодження внаслідок дії несприятливих чинників різної природи (Nedzvetskii et al., 2006).

Мета дослідження – оцінити особливості астрогліозу, вмісту специфічного цитоскелетного маркера астроглії – гліального фібрилярного кислого білка (ГФКБ) в мозку бичка-пісочника (*Neogobius fluviatilis*), що є типовим представником промислових донних риб Керченської протоки.

Матеріал і методи досліджень

Основою порівняльного аналізу були комплексні іхтіотоксикологічні, біохімічні та імунохімічні дослідження, збирання матеріалу та спостереження, проведені на акваторії річки Ворскла (Дніпродзержинське водосховище) у межах існуючого іхтіологічного заказника, що практично не потрапляє під техногенний вплив, і зони узбережжя бухти Керченської, в якій розташований ряд діючих портових комплексів. Іхтіологічний матеріал (38 екземплярів бичка-пісочника (*N. fluviatilis*)) відбирали відповідно до загальноприйнятих методик у водах Керченської бухти у травні – червні 2012 р. Для порівняльного аналізу наведено також результати, отримані у 2012 р. щодо забрудненої ділянки р. Самара.

Вміст і склад поліпептидних фрагментів ГФКБ визначали імунохімічними методами. Фракції розчинних та цитоскелетних білків мозку риб отримували як це описано раніше (Nedzvetskii et al., 2006). Визначення вмісту та поліпептидного складу гліальних філаментів проводили за допомогою імуноблотингу (Nedzvetskii et al., 2006). Кількісний аналіз ГФКБ проводили шляхом порівняння інтенсивності забарвлення відповідних поліпептидних зон, що були віднесені до кількості загального білка у фракції. Загальний білок визначали методом Лоурі в модифікації Міллера (Miller, 1959). Рівень

перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) вимірювали з використанням тест-набору LPO-586 (Oxis Int. Inc., USA) (Ohkawa et al., 1979). Обробку отриманих даних проводили методами математичної статистики з використанням програми Statistica 6. Відносний вміст ГФКБ і продуктів ПОЛ виражали у вигляді середньої величини \pm стандартна похибка середньої. Достовірну відмінність між групами оцінювали із застосуванням *t*-критерію Стьюдента ($P < 0,01$) після перевірки гіпотез про нормальність розподілу та відмінність між генеральними дисперсіями.

Результати та їх обговорення

Анатомоморфологічне дослідження риб у всіх групах не виявило відхилення від нормального розвитку, аберації та потворності. Результати кількісної оцінки вмісту білка гліальних проміжних філаментів у мозку риб показали значні відмінності досліджених груп (рис. 1). У мозку бичка-пісочника, виловленого у прибережних водах бухти Керченська, виявлено достовірне зростання ГФКБ (в 2,28 раза, $P < 0,001$) порівняно з групою риб з умовно чистої ділянки (р. Ворскла). Отриманий результат вказує на розвиток гліальної реактивації в результаті метаболічних порушень, викликаних підвищеним вмістом токсинів у придонних біотопах бухти Керченської. Цей показник був також вищим за відповідний у мозку риб із р. Самара, що вказує на значний несприятливий вплив забруднювачів у бухті Керченській.

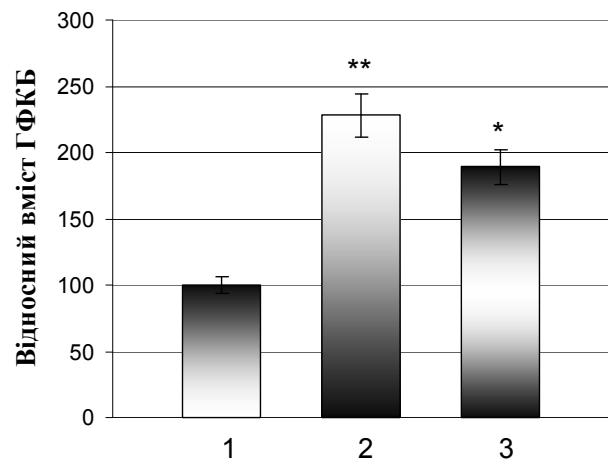


Рис. 1. Відносний вміст ГФКБ у мозку бичка-пісочника бухти Керченської (2) порівняно з контрольною ділянкою р. Ворскла (1) і ділянкою р. Самара (3): * – $P < 0,01$, ** – $P < 0,001$ відносно 1

Підвищення вмісту білка гліальних філаментів – це наслідок збільшення числа субпопуляції окремих гліоцитів, у першу чергу за рахунок диференціації гліальних попередників у зрілі астроцити. Реактивація астроцитів отримала назву «астрогліоз». Астрогліоз індукується різними за природою чинниками та є ознакою патогенетичних і структурних ушкоджень ЦНС. Участь астроцитів у репарації ушкоджень ЦНС широко вивчається останнім часом. Зміни, якими супроводжується астрогліоз, спрямовані від оборотних

змін експресії генів і клітинної гіпертрофії до тривалого формування рубців і перебудови структури окремих ділянок мозку (Sofroniew and Vinters, 2010).

Результати визначення поліпептидного складу ГФКБ у мозку риб, що мешкають у прибережних зонах бухти Керченська і річки Самара Дніпровська, показали значне зростання кількості деградованих поліпептидів ГФКБ (рис. 2). Найзначніші зміни ГФКБ виявлені в цитоскелетних фракціях білків.

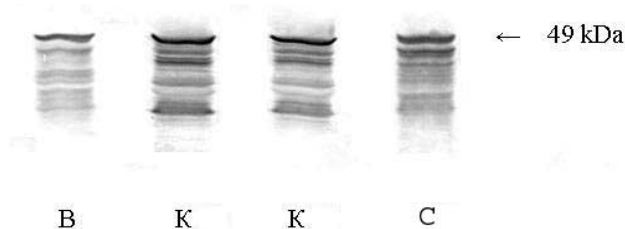


Рис. 2. Результати імуноблотингу цитоскелетних фракцій білків із мозку бичка-пісочника р. Ворскла (В), бухти Керченської (К) і ділянки р. Самара (С)

Вміст кінцевих продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) у тканині мозку групи риб, виловлених у вищезгаданих ділянках, свідчить про передумови розвитку окисного стресу (рис. 3). Зміни показників окисного стресу та астрогліозу в мозку бичка-пісочника бухти Керченська, р. Самара та р. Ворскла мали високий коефіцієнт кореляції ($r = 0,69 \pm 0,091$ і $r = 0,74 \pm 0,087$ відповідно).

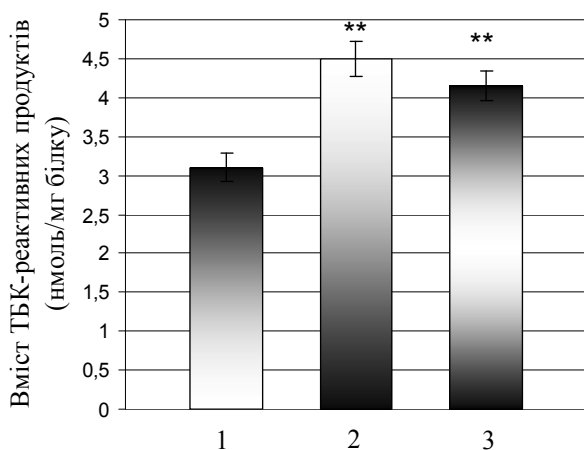


Рис. 3. Вміст кінцевих продуктів перекисного окиснення ліпідів у мозку бичка-пісочника р. Ворскла (1), бухти Керченської (2) та р. Самара (3): * – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$ відносно групи 1

Таким чином, вивчення відповідних реакцій популяцій донних риб є актуальним завданням в оцінці дії різних несприятливих чинників, у тому числі десорбції нафтопродуктів із донних відкладів. Риби – зручні об'єкти в екологічних дослідженнях через високу чисельність, поширення та доступність для вивчення реакції організмів на дію поллютантів (Bucher et al., 1992).

Використання як біомаркерів гістоспецифічних цитоскелетних білків, які виконують життєво необхідні

функції нервової системи та надзвичайно чутливі до дії несприятливих чинників, – найперспективніший напрям (Kalman and Pritz, 2001; Nedzvetskii et al., 2006). Як і в інших хребетних, у риб нейроглія відіграє життєво важливу роль у підтримці та забезпеченні функціонування нейронів. Нейрогліальні клітини особливо критичні для підтримання гомеостазу мозку, репарації ушкоджень, захисту нейронів від різних дій. Несприятливі дії різної природи індують характерну клітинну відповідь глії – астрогліоз. Астрогліоз, тобто реактивация астроцитів, завжди супроводжується активацією фібрилогенезу та синтезу ГФКБ (Nedzvetskiy and Nerush, 2011). Надмірно інтенсивний фібрилогенез є головним показником реактивної відповіді астроцитів на нейрональні ушкодження. Перебудова проміжних філаментів астроглії може бути необхідною умовою для адекватного функціонування гліальних клітин за дії ушкоджувальних чинників (Norton et al., 1992).

Виявлене нами достовірне підвищення експресії білка гліальних проміжних філаментів свідчить про індукований астрогліоз, тобто функціональну відповідь нейроглії на дію несприятливих факторів. Характерне збільшення кількості деградованих поліпептидних фрагментів ГФКБ є ознакою цитоскелетних перебудов, порушення стану цитоскелета, морфології та функціонування клітин нервової тканини. Отже, стан гліального цитоскелета може бути валідним показником токсичної дії нафтового забруднення морських вод.

Окисний стрес – найпоширеніше метаболічне порушення за дії несприятливих чинників (Baydas et al., 2004). Проміжні високореактивні продукти окисного стресу є важливою причиною нейродегенерації та зниження життєздатності в умовах дії токсичних забруднювачів різної природи. Дія промислових забруднювачів на організм викликає порушення енергетичного метаболізму у клітинах, морфологічні та структурні аномалії.

Виявлена у цьому дослідженні позитивна кореляція показників астрогліозу, тобто стану цитоскелета нейроглії, та окисного стресу в мозку бичка-пісочника з промислово забруднених і умовно чистих ділянок водойм указує на те, що окислювальні ушкодження можуть бути одним з основних механізмів реалізації токсичних ефектів забруднювачів. Порушення на молекулярному рівні лежить в основі патологічних процесів та відбуваються на наступних, вищих рівнях біологічної організації, у тому числі на структурно-функціональній організації екосистем.

Отриманий результат про реактивний астрогліоз у мозку риб, що мешкають у забрудненому середовищі Керченської протоки, вказує на певний рівень адаптації клітин нервової системи до несприятливих умов, викликаних забрудненням.

Висновки

Вивчення впливу забруднювальних речовин на гідросистему не може бути обмежене проведенням дослідів лише на організменому рівні, оскільки дозволяє виявити аномальні зміни лише на пізніх стадіях інтоксикації, коли організм перебуватиме на межі

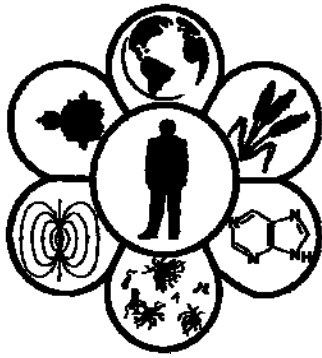
загибелі. Отримані результати переконливо свідчать, що виявлені цитоскелетні перебудови в мозку риб виникли під впливом несприятливих антропогенних чинників навколишнього середовища. Це дає змогу розглядати ГФКБ як надійний і достовірний маркер токсичного впливу поллютантів, за допомогою якого можливо оцінити ушкоджувальні ефекти на ранніх етапах і розробити ефективні заходи компенсації патогенетичних порушень.

Отримані дані про порушення метаболізму специфічного білка цитоскелета нейроглії бичка-пісочника з бухти Керченська свідчать про негативний вплив нафтопродуктів на донні біотопи Керченської протоки та гідробіонтів, які населяють їх. Наведені результати вказують на необхідність постійного екологічного моніторингу та комплексного дослідження донних біотопів цього регіону.

Бібліографічні посилання

- Baydas, G., Donder, E., Kiliboz, M., Nedezvetsky, V., 2004. Neuroprotection by α -lipoic acid in streptozotocin-induced diabetes. *Biochem. (Mosc.)* 69(9), 1001–1005.
- Bucher, F., Hofer, R., Salvenmoser, W., 1992. Effects of treated paper mill effluents on hepatic morphology in male bullhead (*Cottus gobio* L.). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 23, 410–419.
- Kalman, M., Pritz, M., 2001. Glial fibrillary acidic protein – immunopositive structures in the brain of a crocodilian, *Caiman crocodilus*, and its bearing on the evolution of astroglia. *J. Comp. Neurol.* 17, 460–480.
- Miller, G.L., 1959. Protein determination for large numbers of samples. *Anal. Chem.* 31(5), 964–966.
- Nedzvetskii, V.S., Tuzcu, V., Yasar, A., Tikhomirov, A.A., 2006. Effects of vitamin E against aluminum neurotoxicity in rats. *Biochem. (Mosc.)* 71(3), 239–244.
- Nedzvetskiy, V.S., Nerush, P.A., 2011. Hyperthyrosis effects on the learning, memory and glial intermediate filaments of a rat brain. *Int. J. Physiol. Pathophysiol.* 2(3), 269–278.
- Norton, W.T., Aquino, D.A., Hozumi, I., 1992. Quantitative aspects of reactive gliosis: A review. *Neurochem. Res.* 17(9), 877–885.
- Ohkawa, H., Ohishi, H., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95(2), 351–358.
- Sofroniew, M.V., Vinters, H.V., 2010. Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119, 7–35.

Надійшла до редколегії 24.03.2014



УДК 577.156:612.015

Вплив гіпертиреозу на процеси навчання та стан гліальних проміжних філаментів головного мозку щурів

С.В. Кириченко, В.С. Недзвєцький

Дніпропетровський національний університет імені Олесь Гончара, Дніпропетровськ, Україна

Досліджено вплив гіпертиреозу на показники окисного стресу, стан гліальних проміжних філаментів і пам'ять. У мозку щурів із гіпертиреозом визначено достовірне зростання вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів і погіршення процесу запам'ятовування. Час збереження пам'яті у тесті умовного рефлексу пасивного уникнення був відмінним у групі щурів, які отримували тироксин, порівняно з контролем. Зниження періоду очікування у тесті умовного рефлексу пасивного уникнення становило 67% ($P < 0,01$) порівняно з контролем. Такі значні відмінності вказують на погіршення процесу навчання та запам'ятовування у групі щурів із гіпертиреозом. Зміни поліпептидного складу виявлені в гіпокампі та корі великих півкуль. У гіпокампі щурів із гіпертиреозом відмічається збільшення інтенсивності поліпептидних зон як розчинної, так і філаментної форм гліального фібрилярного кислого білка. Дослідження показників кореляції виявило високий ступінь кореляції між вмістом ГФКБ і рівнем продуктів перекисного окиснення. Ці дані вказують на важливу роль окисного стресу в індукції астрогліальної реактивної відповіді за умов гіпертиреозу. Отримані результати вказують на можливість реконструкції цитоскелета гліальних клітин під впливом тироїдних гормонів.

Ключові слова: гіпертиреоз; окисний стрес; гліальні проміжні філаменти

Hyperthyreosis effects on the learning and glial intermediate filaments of rat brain

S.V. Kyrychenko, V.S. Nedzvetsky

Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Dnipropetrovsk, Ukraine

The influence of hyperthyreosis on oxidative stress, state of glial intermediate filaments and memory was investigated. Significant increasing of lipid peroxidation products into both hippocampus and cortex and change for the worse of memory was observed. Analysis of the behavioral reactions of rats in the test of passive avoidance conditioned reflex showed that the acquisition of skills of all groups of animals did not differ by time waiting period (latent period). Time saving memory test conditioned reflex of passive avoidance was excellent in the group of rats treated with thyroxine compared with controls. The change of polypeptide GFAP was observed in hippocampus and cortex. Both soluble and filamentous forms of GFAP increased in hippocampus of rat with hyperthyreosis. In filament fractions, increase in the intensity of 49 kDa polypeptide band was found. In the same fraction of insoluble cytoskeleton proteins degraded HFKB polypeptides with molecular weight in the region of 46–41 kDa appeared. Marked increase of degraded polypeptides was found in the soluble fraction of the brain stem. The intensity of the intact polypeptide (49 kDa), as well as in the filament fraction, significantly increased. It is possible that increasing concentrations of soluble subunits glial filaments may be due to dissociation of own filaments during the reorganization of cytoskeleton structures. Given the results of Western blotting for filament fraction, increased content of soluble intact 49 kDa polypeptide is primarily the result of increased expression of HFKB and only partly due to redistribution of existing filament structures. Calculation and analysis of indicators showed high correlation between the increase in content and peroxidation products of HFKB. These results indicate the important role of oxidative stress in the induction of astroglial reactive response under conditions of hyperthyroidism. This data shows the possibility of the glial cell cytoskeleton reconstruction under effect of thyroid hormones.

Keywords: hyperthyreosis; oxidative stress; glial intermediate filaments

Вступ

Гормони щитовидної залози – важливі посередники молекулярних, клітинних і фізіологічних процесів, які регулюють розвиток мозку ссавців, диференціацію клітин, їх міграцію на ранніх стадіях онтогенезу, експресію деяких генів, чутливих до впливу як дефіциту гормонів щитовидної залози, так і їх надлишку. Фізіологічна роль гормонів щитовидної залози полягає в координації процесів розвитку мозку за допомогою впливу на експресію окремих генів і швидкість диференціації клітин. Існують експериментальні докази можливої участі тироїдних гормонів і їх рецепторів у диференціації нейронів і гліальних клітин, а також у контрольованій загибелі клітин (Bernal and Nunez, 1995). Вплив гормона щитовидної залози на нейрональну диференціацію може реалізовуватися за допомогою регуляції експресії деяких генів. Останніми роками відносно велику кількість тироїдзалежних генів ідентифіковано в мозку ссавців (Motomura and Brent, 1998). Концентрація тиреотропного гормона в крові не корелює з варіабельністю ознак, що спостерігаються у пацієнтів із тиреотоксикозами.

Широко досліджені ефекти гіпофункції щитовидної залози на процеси розвитку клітин ЦНС. У той же час залишаються нез'ясованими питання впливу надмірних концентрацій тироїдних гормонів (ТГ) на функції нейронів і гліальних клітин. Не розкриті також причини розвитку пізнавального дефіциту у випадку порушень балансу нейрогормонів.

Незважаючи на те, що тироїдні гормони та їх вплив добре досліджені, вивчено лише обмежену кількість маркерів, які безпосередньо відображають дію гормона. У ролі маркерів, що адекватно відповідають на зміни концентрації ТГ, розглядаються цитоскелетні білки. Є дані про те, що ТГ регулює експресію тубуліну (Nunez et al., 1992), модулює експресію важкого ланцюга міозину у разі денервації скелетних м'язів ТГ, впливає на процес полімеризації F-актину і таким чином контролює організацію відповідних цитоскелетних структур (Haddad et al., 2007).

Білки проміжних філаментів розглядаються як надійні гістоспецифічні маркери. У нервовій тканині проміжні філаменти представлені триплетом білків нейрофіламентів і гліальним фібрилярним кислим білком (ГФКБ). Існують дані про зміну структури проміжних філаментів і фізико-хімічних властивостей цитоскелетних білків за патологій різної етіології та дії ушкоджувальних факторів (Farvell et al., 1995). Велике значення має вивчення та використання проміжних філаментів як маркерів розвитку патологічних станів нервової системи. Дослідження молекулярних маркерів, характерних для тиреотоксикозів, має особливе значення у зв'язку з постійно зростаючим забрудненням навколишнього середовища, що викликає надмірну продукцію тиреотропних гормонів. Є дані про те, що синтез ТГ істотно підвищений у дітей, опромінених під час вагітності матері внаслідок Чорнобильської катастрофи, а також у дітей, які проживають у районах спільного впливу

солей важких металів і малих доз радіації (Baydas et al., 2007).

Мета статті – оцінити показники окисного стресу, вміст і поліпептидний склад білка гліальних проміжних філаментів ГФКБ у різних відділах головного мозку та поведінкові реакції щурів за умов експериментального гіпертиреозу.

Матеріал і методи досліджень

Щури лінії Вістар (масою 200–230 г) протягом 14 днів отримували перорально тироксин. Динаміка отримання тироксину: початкова доза (10 мкг/добу) нарощувалася по 10 мкг/добу протягом 14 днів. До експерименту брали тварин з концентрацією тироксину у сироватці крові не менше 17 нг/мл. Здатність до запам'ятовування оцінювали у тесті «умовної реакції пасивного уникнення» (УРПУ). Викликані тиреотоксикозом зміни білка гліальних проміжних філаментів оцінювали по досягненні дози 140 мкг за 24 години. Після декапітації вилучали головний мозок, охолоджували та розділяли на відділи. 0,2 г тканини (головний мозок загалом, кора великих півкуль, мозочок, середній мозок) гомогенізували в 4,0 мл 0,025 М трис-буфери (pH 8,0), що містив 2 мМ ЕДТА, 1 мМ 2-меркаптоетанол, 0,1 мМ фенілметилсульфонілфторид і соєвий інгібітор трипсину (10 мкг/мл). Гомогенат центрифугували при 30 000 г протягом 60 хв. Супернатант (S₁) містив розчинні білки. Осадок ресуспендували в 0,5 мл тієї ж буферної системи, яка додатково містила 4 М сечовину. Супернатант, який отримували після другого центрифугування (S₂), містив нерозчинні білки проміжних філаментів. Вміст загального білка в екстрактах визначали методом Лоурі в модифікації Міллера (Miller, 1959). Визначення поліпептидного складу гліальних філаментів проводили за допомогою імуноблотингу з використанням поліклональної моноспецифічної антисироватки у розведенні 1:1500, як описано раніше. Кількісний аналіз ГФКБ проводили за допомогою комп'ютерної обробки сканованих результатів імуноблотингу (LabWork 4.0). Рівень перекисного окислення ліпідів вимірювали з використанням тест-набору LPO-586 (Oxis Int. Inc., USA).

Обробку одержаних даних проводили методами математичної статистики для малих вибірок. Відносний вміст ГФКБ виражали у вигляді середньої величини ± стандартна похибка, достовірну різницю між групами оцінювали із застосуванням *t*-критерію Стьюдента ($P < 0,05$) після перевірки гіпотез про нормальність розподілу та різницю між генеральними дисперсіями.

Результати та їх обговорення

Однією з важливих причин функціональних ускладнень у клітинах нервової тканини вважається розвиток окисного стресу (Hattori and Oikawa, 2007). Із метою контролю змін показників окисно-відновного балансу в гіпокампі, корі великих півкуль і

стовбурі мозку визначали рівень ТБК-реактивних продуктів (малоновий діальдегід + 4-гідроксиалкенів, ДК). Результати визначення кінцевих продуктів перекисного окиснення ліпідів у гомогенатах головного мозку експериментальних і контрольних щурів наведено на рисунку 1. В усіх досліджених відділах мозку тварин експериментальної групи рівень малонового діальдегіду + 4-гідроксиалкенів був достовірно підвищений відносно контрольної групи.

У дослідженій експериментальній моделі гіпертиреоз викликав достовірне підвищення вмісту ТБК-реактивних продуктів у гіпокампі на 68%, стовбурі мозку – на 49%, корі великих півкуль – на 57% порівняно з контролем (див. рис. 1). Таким чином, отримані результати свідчать про розвиток стійкого окисного стресу у нервовій тканині щурів за умов порушення балансу ТГ.

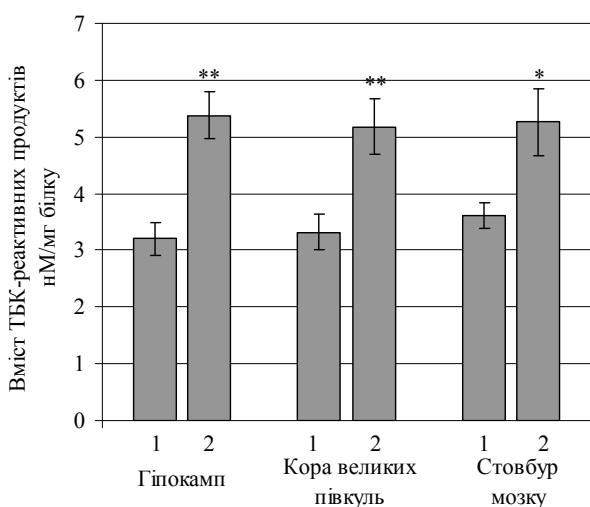


Рис. 1. Вміст ТБК-реактивних продуктів перекисного окиснення ліпідів у мозку щурів:

1 – контрольна група, 2 – група щурів із гіпертиреозом; * – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$ відносно контрольної групи

Існує обмежена кількість комплексних даних про нейротоксичні ефекти гіпертиреозу на розвиток окисного стресу, структурні нервовоспецифічні білки та поведінку, пам'ять. Різні за природою ушкоджувальні фактори та метаболічні розлади індують генерацію реактивних сполук кисню у нервовій тканині та розвиток інсульту (Nedzvetskii et al., 2006) можуть впливати на експресію та рециклінг цитоскелетних і мембранних білків (Baudas et al., 2004), щільність синаптичних контактів (Veneto et al., 2006) і таким чином порушувати процеси навчання та пам'яті.

Аналіз поведінкових реакцій щурів у тесті умовного рефлексу пасивного уникання показав, що до набуття навичок усі групи тварин не відрізнялися за часом періоду очікування (латентного періоду). Час збереження пам'яті у тесті умовного рефлексу пасивного уникання був відмінним у групі щурів, які отримували тироксин порівняно з контролем. Зниження періоду очікування у тесті умовного рефлексу пасивного уникання становило 67% ($P < 0,01$) порівняно з контролем. Такі значні відмінності вказують на

погіршення процесу навчання та запам'ятовування у групі щурів із гіпертиреозом.

Із метою дослідження впливу гіпертиреозу на стан астроглії та її реактивність у гіпокампі, корі великих півкуль і стовбурі мозку визначали вміст і склад поліпептидних фрагментів ГФКБ. Достовірні відмінності вмісту астроцитарного цитоскелетного маркера ГФКБ визначені у фракціях розчинних і філаментних білків із мозку щурів експериментальної групи. Найсуттєвіше підвищення вмісту ГФКБ філаментної фракції виявлене в корі великих півкуль і гіпокампі щурів, які отримували тироксин (рис. 2). У гіпокампі тварин цієї групи виявлене збільшення вмісту ГФКБ у 1,74 раза ($P < 0,01$), корі великих півкуль – у 1,63 ($P < 0,01$), стовбурі мозку – у 1,45 ($P < 0,05$) порівняно з контрольною групою.

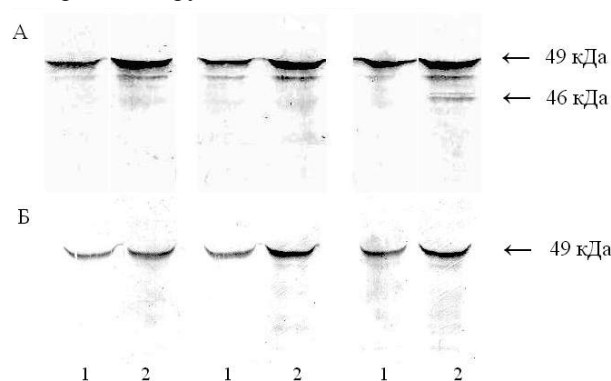


Рис. 2. Результати імуноблотингу філаментних і розчинних фракцій білків проміжних філаментів:

А – філаментна фракція, Б – розчинна фракція; 1 – контрольна група, 2 – група щурів із гіпертиреозом

Створений експериментально стан гіпертиреозу відбивається також на стані гліальних проміжних філаментів. Зміни поліпептидного складу ГФКБ виявлені в усіх відділах мозку, що були досліджені. Результати імуноблотингу філаментних і розчинних фракцій білків проміжних філаментів наведено на рисунку 2. У філаментних фракціях усіх досліджених відділів виявлено збільшення інтенсивності поліпептидної зони 49 кДа. У цій же фракції нерозчинних цитоскелетних білків з'являються деградовані поліпептиди ГФКБ з M_r в області 41–46 кДа. У розчинній фракції стовбура мозку не виявлено помітного збільшення деградованих поліпептидів. Інтенсивність інтактного поліпептиду 49 кДа, так само як і у філаментній фракції, істотно зростає. Не виключено, що підвищення вмісту розчинних субодиниць гліальних філаментів може відбуватися внаслідок дисоціації власне філамента під час реорганізації цитоскелетних структур. Враховуючи результати імуноблотингу філаментної фракції, збільшення вмісту розчинного інтактного поліпептиду 49 кДа, найвірогідніше, є результатом підвищеної експресії ГФКБ.

У сечовинній (філаментній) фракції представлені в основному субодиниці ГФКБ, що безпосередньо складають філамент. Таким чином, значне збільшення інтенсивності поліпептидної зони 49 кДа у

філаментній фракції свідчить на користь того, що підвищення концентрації ТГ може бути причиною активції фібрилогенезу у гліальних клітинах і розвитку астрогліозу.

Розрахунок і аналіз показників кореляції виявив високий ступінь кореляції між умістом ГФКБ і рівнем продуктів перекисного окиснення: у гіпокампі – $0,74 \pm 0,084$ ($P < 0,01$), у корі великих півкуль – $0,71 \pm 0,093$ ($P < 0,01$), у стовбурі мозку – $0,62 \pm 0,096$ ($P < 0,05$). Ці дані вказують на важливу роль окисного стресу в індукції астрогліальної реактивної відповіді за умов гіпертиреозу. Ефекти ТГ на астрогліальні клітини реалізуються через реорганізацію їх цитоскелета, яка контролюється ступенем фосфорилування ГФКБ (Zamoner et al., 2007).

Роль ТГ у дозріванні астроцитів залишається не зовсім зрозумілою. Вплив ТГ на процеси дозрівання мозку реалізується також через їх взаємодію з ядерними рецепторами та регуляцію генної експресії. Зниження концентрації ТГ частково блокує диференціацію астроцитів. За останні 10 років зроблено значний прогрес у розкритті механізму перетворення T_3 сигналу у клітинну відповідь. Ядерні рецептори ТГ функціонують по типу апорецепторів. Тобто вони мають активність за відсутності гормону, а стимуляція T_3 діє як репресор транскрипції окремих генів (Bernal, 2005, 2007). Всі ізоформи трийодтиронінового рецептора експресуються в мозку. Просторова та тимчасова експресія цих рецепторів може бути основою створення у ході розвитку унікальних нейрональних ансамблів. Один із шляхів впливу на нейрональну диференціацію може реалізовуватися внаслідок дії ТГ на виробництво нейротропів та їх рецепторів (Bernal and Nunez, 1995).

Клітинні рецептори ТГ залучаються до процесів міграції клітин, синаптогенезу як у ході розвитку нервової системи, так і в дорослому мозку. Експресія мутантних рецепторів ТГ у дорослих мишей індукуює стійкі поведінкові зміни, синдром тривожності та морфологічні зміни у гіпокампі (Bernal, 2007). Це вказує на важливу регуляторну роль балансу ТГ протягом усього життя.

Є дані про вплив ТГ на стан окремих компонентів цитоскелета: мікрофіламентів, мікротрубочок і проміжних філаментів. В агрегованих культурах клітин ТГ стимулює експресію білків нейрофіламентів, а також появу обмежувальних гліальних клітин із надмірно розвиненими волокнами (Trentin et al., 2003). Адгезія астроцитів порушується за відсутності ТГ, що відбивається на нейрон-гліальних контактах. Таким чином, астроцитозалежне регулювання адгезивних взаємодій забезпечує механізм, за допомогою якого ТГ може впливати на міграцію нервових клітин і формування нейрональних зв'язків. Гіпертиреоз викликає багатofакторіальні метаболічні порушення, які можуть спричинювати нейротрофічні, нейро модуляторні та функціональні розлади. Надмірна концентрація ТГ викликає стійкі метаболічні порушення у нервових клітинах. Тривалий метаболічний розлад у клітинах ЦНС може відбиватись на функціях вищої нервової діяльності, зокрема, як дефіцит пізнавальної активності.

Результати тесту умовного рефлексу пасивного уникання свідчать про можливий зв'язок між розвитком окисного стресу, надмірним і тривалим астрогліозом і пізнавальним дефіцитом у групі щурів із гіпертиреозом. Існують експериментальні докази того, що у щурів із гіпотиреозом мозок тривалий час залишається незрілим. Автори передбачають, що ТГ забезпечує синхронізацію зростання аксонів і дендритів (Nunez et al., 1992). Швидкість формування мікротрубочок збільшується з віком, причому це збільшення уповільнюється в умовах гіпотиреозу та відновлюється ТГ. Експресія принаймні п'яти білків, які регулюють стан тубулінових філаментів, перебуває під тироїдним контролем (Nunez, 1985). Зміна складу таких білків контролює кількість і довжину мікротрубочок під час формування нейритів у процесі диференціації. Можливо, ТГ є одним із чинників, який визначає послідовність експресії генів, що регулюють процеси диференціації.

Показано, що в неокортексі та мозочку після стимуляції T_3 активується транскрипційна регуляція та експресія не всіх, а у першу чергу нервовоспецифічних білків (Andres-Barquin et al., 1994). Диференціальна регуляція експресії у клітинах нервової системи сприяє встановленню стаціонарного стану, спрямованій та регульованій адаптації клітин у відповідь на зовнішні сигнали та опосередкованій гормональною регуляцією. Механізм гормональної регуляції ТГ може бути одним із факторів мікрооточення нервових клітин, модулюючи їх специфічну відповідь на дію стимулів різної природи. Несприятливі фактори різної природи можуть впливати на метаболізм ТГ. Порушення гормонального балансу індукуює метаболічні порушення, які відбиваються як на функціонуванні окремих нервових клітин, так і на ЦНС у цілому.

Передбачають, що в онтогенезі мозку існує лише короткий період, протягом якого нервові клітини чутливі до дії ТГ. Незважаючи на це, існують дані про вплив гіпертиреозу на сформовану нервову систему. У ліквідаторів наслідків аварії на ЧАЕС із патологією щитовидної залози захворюваність хворобами нервової системи та органів чуття підвищена в 7,7 раза (Eng et al., 2000). Трийодтиронін має множинні ефекти на нервові клітки. Є дані про те, що ТГ активує транспорт глюкози та метаболічну активність астроцитів. Інтенсифікація фібрилогенезу у гліальних клітинах може бути пов'язана з цим ефектом ТГ.

Раніше було показано, що проміжні філаменти схильні до протеолізу Ca^{2+} -залежними протеїназами – калпаїнами (Eng et al., 2000). В експериментах на тваринах виявлено, що в умовах гіпертиреозу порушується гомеостаз Ca^{2+} . Це дозволяє передбачити, що ТГ може також впливати на стан проміжних філаментів за допомогою модулювання активності Ca^{2+} -залежних протеїназ. Цитоскелет еукаріотичних клітин розглядають на сьогодні не тільки як структурний інтегратор, а і як активний модулятор цілої низки клітинних процесів і функцій. Можливо, гліальні проміжні філаменти залучаються до процесів, що викликаються дією ТГ.

Отримані результати вказують на щільний зв'язок між розвитком окисного стресу в нервовій тканині, реактивацією астроцитів та пізнавальним дефіцитом у щурів за умов гіпертиреозу. Виявлені зміни поліпептидного складу проміжних філаментів глії свідчать про певну пластичність астроцитарного цитоскелета в умовах тиреотоксикозу. Ідентифікація мережі генів, експресія яких чутлива до регуляції гормоном щитовидної залози у період розвитку мозку та у зрілій нервовій системі, з'ясування механізмів регуляції та фізіологічної ролі продуктів цих генів залишаються головною метою майбутніх досліджень.

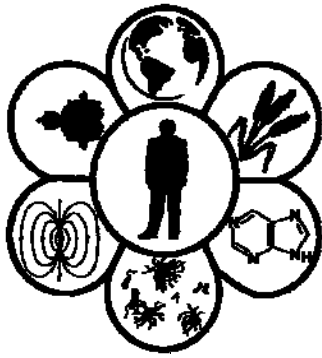
Висновки

В умовах експериментального гіпертиреозу відбувається суттєве підвищення вмісту ТБК-реактивних продуктів у відділах мозку щурів (гіпокампі – на 68%, стовбурі – 49%, корі великих півкуль – на 57% порівняно з контрольною групою). Визначено збільшення вмісту астроцитарного цитоскелетного маркера ГФКБ та поліпептидного складу мозку щурів експериментальної групи, які корелюють з умістом ТБК-реактивних продуктів.

Бібліографічні посилання

- Andres-Barquin, P.J., Fages, C., Le Prince, G., Rolland, B., Tardy, M., 1994. Thyroid hormones influence the astroglial plasticity: Changes in the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and of its encoding message. *Neurochem. Res.* 19(1), 65–69.
- Baydas, G., Koz, S.T., Tuzcu, M., Etem, E., Nedzvetzky, V.S., 2007. Melatonin inhibits oxidative stress and apoptosis in fetal brains of hyperhomocysteinemic rat dams. *J. Pineal. Res.* 43(3), 225–231.
- Baydas, G., Donder, E., Kiliboz, M., Sonkaya, E., Tuzcu, M., Yasar, A., Nedzvetzky, V.S., 2004. Neuroprotection by α -lipoic acid in streptozotocin-induced diabetes. *Biochem. (Mosc.)* 69(9), 1233–1238.
- Bernal, J., 2005. Thyroid hormones and brain development. *Vitam. Horm.* 71, 95–122.
- Bernal, J., 2007. Thyroid hormone receptors in brain development and function. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* 3(3), 249–259.
- Bernal, J., Nunez, J., 1995. Thyroid hormones and brain development. *Europ. J. Endocrinol.* 133(4), 390–398.
- Eng, L.F., Ghirnikar, R.S., Lee, Y.L., 2000. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969–2000). *Neurochem. Res.* 25(9), 1439–1451.
- Farvell, K., Tranter, C., Leonard, J.L., 1995. Thyroxine-dependent regulation of integrin-laminin interaction in astrocytes. *Endocrinology* 136(9), 3909–3915.
- Haddad, F., Arnold, K., Zeng, M., Boldwin, K., 1997. Interaction of thyroid state and denervation on skeletal myosin heavy chain expression. *Muscle Nerve* 20(12), 1487–1496.
- Hattori, F., Oikawa, S., 2007. Peroxiredoxins in the central nervous system. *Subcell. Biochem.* 44, 357–374.
- Miller, G.L., 1959. Protein determination for large numbers of samples. *Anal. Chem.* 31(5), 964–966.
- Motomura, K., Brent, G.A., 1998. Thyreotoxicosis. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 27(1), 1–23.
- Nedzvetzky, V.S., Tuzcu, M., Yasar, A., Tikhomirov, A.A., Baydas, G., 2006. Effects of vitamin E against aluminum neurotoxicity in rats. *Biochem. (Mosc.)* 71(3), 239–244.
- Nunez, J., 1985. Microtubules and brain development: The effects of thyroid hormones. *Neurochem. Int.* 7(6), 959–968.
- Nunez, J., Couchie, D., Aniello, F., Bridoux, A.M., 1992. Thyroid hormone effects on neuronal differentiation during brain development. *Acta Med. Austriaca.* 19(1), 36–39.
- Trentin, A.G., De Aguiar, C.B., Garcez, R.C., Alvarez-Silva, M., 2003. Thyroid hormone modulates the extracellular matrix organization and expression in cerebellar astrocyte: Effects on astrocyte adhesion. *Glia* 42(4), 359–369.
- Venero, C., Herrero, A.I., Touyarot, K., Cambon, K., Lopez-Fernandez, M.A., Berezin, V., Bock, E., Sandi, C., 2006. Hippocampal up-regulation of NCAM expression and polysialylation plays a key role on spatial memory. *Eur. J. Neurosci.* 23(6), 1585–1595.
- Zamoner, A., Funchal, C., Jacques-Silva, M.C., Gottfried, C., Barreto Silva, F.R., Pessoa-Pureur, R., 2007. Thyroid hormones reorganize the cytoskeleton of glial cells through Gfap phosphorylation and RhoA-dependent mechanisms. *Cell Mol. Neurobiol.* 27(7), 845–865.

Надійшла до редколегії 24.03.2014



УДК 612.32+616-008.6+616-003.233

Особенности периодической активности желудка за умов дисбалансу NO-ергічної системи

О.В. Севериновська, О.О. Галінський, А.І. Руденко, О.Б. Мурзін, В.В. Бабічева, Л.Д. Скубицька

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпропетровськ, Україна

Результатом тривалого уведення донатора NO є перебування періодичної моторної та секреторної активності шлунка. Зменшувались показники моторного індексу на 6-ту добу, суттєво (на 56%) знижувалась міоелектрична активність шлунка на 12-ту добу. Зміни секреторної функції шлунка проявлялися у достовірному зменшенні об'єму виділення шлункового соку в 2,0 та 3,3 раза, зростанні pH, зниженні концентрації глікопротеїнів на 57 та 39%, збільшенні концентрації пепсину в 1,8 та 2,6 раза на 6- та 12-ту добу відповідно. За цих змін спостерігали розбалансування механізмів регуляції секреторної активності шлунка, а вплив натрію нітропрусиду на головні та поверхневі епітеліальні клітини слизової оболонки шлунка був вираженіший у разі збільшення тривалості дії чинника. При уведенні блокатора синтезу NO – L-NNA порушувалась фазова картина міоелектричної активності (МЕА) шлунка, яка ставала подібною до переходу між II та III фазами. Показники міоелектричного імпульсу (МІ) підвищувались в 1,3 раза на 6-ту добу уведення блокатора. На 12-ту добу спостерігали зміну характеру скорочень у всіх фазах МЕА шлунка та зниження МІ на 28%. Перебудови секреторної функції шлунка проявлялися достовірним збільшенням об'єму шлункового соку на 61 та 17%, у значному зростанні його pH на 6-та 12-ту добу відповідно. Встановлено порушення кислототвірної функції шлунка та активності пілоричного сфінктера, спричинене закиданням дуоденального вмісту до шлунка.

Ключові слова: оксид азоту; натрій нітропрусид; L-NNA; шлункова секреція; міоелектрична активність шлунка

Features of the gastric periodic activity in conditions of NO-ergic system disbalance

O.V. Severynovska, O.O. Galinskij, A.I. Rudenko, O.B. Mursin, V.V. Babicheva, L.D. Skubytska

Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Dnipropetrovsk, Ukraine

Nitric oxide is the main inhibitory mediator of the gastrointestinal smooth muscles' relaxation which stimulates duodenal mucus and bicarbonate secretion. More recent studies have demonstrated that NO also protected the gastrointestinal tract by inhibiting gastric acid secretion. In this study we investigated gastric secretory and motor activity considering the NO imbalance condition. The experiments were carried out on male white laboratory rats (200–230 g). The control group was treated with 0.9% NaCl solution. The injections of NO donator (1.5 mg/kg of 0.1% (Sigma-Aldrich) sodium nitroprusside solution) were made in the second and the third groups during 6 and 12 days. The fourth and the fifth group were treated with NO synthesis inhibitor (40 mg/kg of 1% solution (Sigma-Aldrich) N^o-nitro-L-arginine) during 6 and 12 days respectively. Recording of gastric myoelectric activity (GMA) and gastric juice collection were carried out under anesthesia (ketamine, 110 mg/kg). Next, its volume, pH, glycoprotein and pepsin were measured. Within 6-days stimulation of NO excess decreased gastric juice volume by 47% and increased pH compared to control samples. Pepsin level increased by 62% and glycoprotein level decreased by 68% compared to the checkpoint. After 6 days of L-NNA injections we observed the increase of gastric juice secretion volume (78%) and pH level, however, pepsin concentration remained unchanged. Glycoprotein level increased by 21% compared to control samples. After 12 day NO synthesis inhibitor injections gastric secretion volume increased by 85%. Gastric juice pH level was 200% higher than the control value and exceeded gastric juice pH level (62%) in the third group. In addition, pepsin level tended to decrease when NO deficiency simulation was prolonged. Glycoprotein level decreased by 41% compared to control samples and by 51% compared to the third group. Pepsin level decreased after 12 day NO-inhibitor injections as gastric juice pH level increased. After 12 day Na-nitroprusside treatment, gastric myoelectric index decreased by 42% compared to the checkpoint. The type of contractions is typical to the I phase of the basic electrical rhythm (BER). Also, retrograde entrainment of duodenal rhythm took place. After 6 day L-NNA injections, GMA was the same as

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, пр. Гагаріна, 72, Дніпропетровськ, 49010, Україна.

Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Gagarin Ave., 72, Dnipropetrovsk, 49010, Ukraine.

Tel.: +38-050-565-73-81, +38-067-567-67-56. E-mail: e_severinovskaya@mail.ru, alexejgalinskij@gmail.com, viktoriya03@gmail.com

the period between II and III phase of BER. Late second and early third phases predominated, while the I phase wasn't detected during the recording. In case of long-lasting disorder of *NO*-system, motor index value significantly differed from the control group samples and depended on the duration of *NO*-synthase blocking. On the 6th day of L-NNA treatment, the level of motor index increased 1.5 times. GMA phases could be identified only on the basis of motor index values. Stomach's own rhythms disappeared and duodenogastric reflux resulted in domination of duodenal rhythms. After 12 day L-NNA injections, duration of the II and III phases increased while the I phase of gastric BER disappeared; gastric motor index decreased by 27%. After considering the results of the current investigation, it can be stated that *NO* system imbalance leads to desynchronization of gastric active phases and, perhaps, reassigns the influence of different compensatory-adaptive mechanisms. The longer is the L-NNA treatment, the more gastric functions are imbalanced and the stronger is the process of destruction.

Keywords: nitric oxide; sodium nitroprusside; L-NNA; gastric secretion; gastric myoelectrical activity

Вступ

Оксид азоту (*NO*) – важливий фактор, який характеризує не лише стан довкілля та зовнішні умови існування, а також є першим представником нового класу сигнальних молекул – потужним біорегулятором в організмі людини та тварин (Schuman et al., 1993; van Griensven et al., 2003; Sharma et al., 2007). Він здійснює міжклітинну комунікацію та регуляцію важливих фізіологічних функцій, таких як вазодилатація, нейротрансмісія, зниження агрегації тромбоцитів, активація процесів запам'ятовування, регуляція тонуусу гладеньких м'язів, впливає на перекисне окиснення ліпідів під час розвитку та перебігу запальних процесів (Mungrue et al., 2002; Bentz et al., 2012). Сьогодні молекула оксиду азоту посідає місце загальноновизнанного регулятора життєвих функцій на різних рівнях – від молекулярного та клітинного до системного, а також бере участь у розвитку патологічних процесів в організмі людини та тварин (van Griensven et al., 2003; Pacher et al., 2007; Sharma et al., 2007; Shapoval et al., 2011).

Для розуміння молекулярних основ і особливостей впливу *NO* на різні органи та тканини необхідно враховувати наявність двох ізоформ *NO*-синтази: постійної – конститутивної (cNOS) та індукційної (iNOS). Активність конститутивної *NO*-синтази, що міститься в ендотеліальних, нервових клітинах, тромбоцитах і деяких інших, в умовах фізіологічного їх спокою, хоча і постійна, але низька. Однак під впливом факторів і агентів, що стимулюють надходження кальцію до клітини, її кальційзалежна активність помітно підвищується, що зумовлює короткотривалий синтез невеликих кількостей *NO*, який через цГМФ виконує в клітинах-мішенях регуляторні функції. Індукційна *NO*-синтаза виявлена в ендотеліальних клітинах (бере участь у контролі судинного тонуусу), клітинах судин гладеньких м'язів, макрофагах, поліморфоядерних лімфоцитах тощо. Вищезгадана ізоформа та оксид азоту, який із неї утворюється, відіграють важливу роль у розвитку порушення процесів перекисного окиснення ліпідів, прогресуванні патологічних процесів (Mungrue et al., 2002; Bentz et al., 2012).

Монооксид азоту може виступати в ролі нейротрансмітера, опосередковуючи ефекти так званих неадренергічних-нехолінергічних нейронів (NANC-нейронів), які, поряд із холін- і норадренергічними провідниками автономної нервової системи, можуть становити третій тип нервової системи. Цей тип нейронів називають ще нітроергічним; нейрони містяться у серці, травній системі та дихальних шляхах, де іннервують як судинну, так і позасудинну гладеньку мускулатуру (Kamata et al., 1993; Curtò et al., 1998).

З одного боку, у шлунково-кишковому тракті *NO* регулює мікроциркуляцію, секрецію та моторику, та, за фізіологічних умов, має цитопротекторну дію (Jesedov and Magomedjeminova, 2010; Kochar et al., 2011). Оксид азоту є головним інгібіторним медіатором, що забезпечує розслаблення гладенької мускулатури стравоходу, шлунка, тонкої та товстої кишок, жовчного міхура, сфінктера Одді, а також бере участь у дуоденальній секреції бікарбонатів. З іншого боку, вступаючи в реакцію з киснем, *NO* утворює пероксинітрит і бере участь у формуванні запальних процесів у шлунку, підшлунковій залозі та кишечнику. Негативний вплив оксиду азоту починає проявлятися, коли його сумарна концентрація або різко знижується, або зростає, спричинюючи функціональне та структурне пошкодження органа (Lamarque et al., 1996; Mungrue et al., 2002; Kochar et al., 2011). Поліморфізм прояву його впливу пов'язаний із присутністю у травній системі різних форм *NO*-синтаз (Price et al., 1996).

Запропонована така схема участі *NO* у регуляції моторики шлунково-кишкового тракту (Kochar et al., 2011). Стимуляція нейронів супроводжується збільшенням активності *NO*-синтази та виділенням *NO*. Проникнувши в м'язовий шар, він активує фермент гуанілатциклазу. Це викликає збільшення циклічного гуанілатмонофосфату та розслаблення м'язів. Крім того, нормальним регулятором перистальтики травного тракту є бактеріальна флора кишечника. Компоненти мембран клітин бактерій – ліпополісахариди – володіють здатністю активувати NOS безпосередньо в м'язовій клітині (Kmonickova et al., 2012).

Питання про роль *NO* в механізмах релаксації шлунка викликає особливу цікавість протягом багатьох років і поки що до кінця не з'ясоване. Термін «рецептивна релаксація», уведений на початку минулого століття, означає розслаблення шлунка в момент проходження їжі по стравоходу. Термін «адаптивна релаксація» або «акомодация» передбачає розслаблення шлунка в момент потрапляння до нього їжі. Відомо, що обидві реакції – рефлекторні, опосередковуються блукаючим нервом, проте не належать ані до холінергічних, ані до адренергічних. Саме завдяки цим дослідженням термін «нехолінергічна неадренергічна іннервація» було вперше введено в літературі (Kamata et al., 1993; Curtò et al., 1998). За 80 років досліджень цієї проблеми висунуто багато гіпотез, які частково пояснювали механізми цих феноменів, доки не настала ера *NO*.

Немало досліджень присвячено динаміці, ролі оксиду азоту у шлунково-кишковому тракті (Jesedov and Magomedjeminova, 2010; Kochar et al., 2011). Нині вивчаються моторно-евакуаторна функція органів травлення, молекулярні механізми розвитку порушень у гла-

деньких м'язях органів травлення за дисбалансу системи L-аргінін/*NO/NO* синтази як фактора розвитку цих порушень. За даними авторів (Ivashkin et al., 2011; Jesedov and Magomedjeminova, 2010), оксид азоту – активний вазодилататор, здатний забезпечити збільшення кровопостачання слизової оболонки шлунка. Під час секреції шлункового соку відбувається збільшення кровопостачання слизової оболонки за рахунок розширення її мікросудин і, ймовірно, *NO* є причиною дилатації та відповідно стимулятором шлункової секреції. За умови внутрішньошлункового уведення соляної кислоти, що, у свою чергу, посилює дифузію іонів водню через слизову оболонку, синтез *NO* збільшує кровопостачання слизової оболонки. Вважають, що цей механізм захищає слизову оболонку при посиленні зворотної дифузії іонів водню у випадку порушення, наприклад, слизового бар'єру. Забезпечення достатнього кровопостачання слизової оболонки – один із способів захисту при патології гастродуоденальної зони. Залежність показників метаболізму *NO* від активності запального процесу, перебігу, ступеня пошкодження слизової оболонки вказує на його значення у патогенезі захворювання шлунково-кишкового тракту.

У зв'язку з тим, що актуальною проблемою сучасної гастроентерології є пошук нових і модифікація старих інформативних і в той же час неінвазивних тестів для діагностики захворювань органів травлення, перспективними є дані про можливість використання *NO* як маркера для визначення характеру патології органів травлення (Zvenigorodskaja and Nilova, 2008).

Ураховуючи універсальність механізму нітроергічної системи та її відновлювальний ефект, останнім часом широко застосовують *NO*-коригувальну терапію в кардіології для лікування різних серцево-судинних захворювань. Цілковито природно очікувати, що надходження готових молекул в організм повинне викликати протекторну та лікувальну дію. Однак експериментально встановлено, що надлишок *NO* у тканинах, який виникає за додаткового уведення L-аргініну у великих дозах і (або) активація індукованої NOS (iNOS) у макрофагах, може негативно впливати на організм, викликаючи розвиток атеросклерозу внаслідок порушення балансу *NO/O₂⁻* на користь кисню, утворення пероксинітриду, виникнення оксидантного стресу взагалі. Це створює необхідність контролю за рівнем *NO* в ендотеліальних клітинах для того, щоб уникнути його надмірних (патогенних) ефектів і досягти бажаного лікувального результату (Tani et al., 1990; Stepanov et al., 2012).

Коригуючи роботу серцево-судинної системи фармакологічними препаратами, які активують *NO*-залежні механізми, іноді, на жаль, отримують побічні ефекти в інших системах організму, у тому числі у травній (Elliott et al., 1998; Khattab et al., 2001; Polotnjuk et al., 2003; Stepanov et al., 2012), оскільки застосовуються ентерально, тобто безпосередньо впливають на шлунково-кишковий тракт. Упродовж багатьох десятиліть для лікування гіпертонії та серцевої недостатності використовується нітропрусид натрію. Його недолік – необхідність уведення парентерально. Окрім того, до нього швидко виникає звикання та за тривалого використання можуть спостерігатися токсичні та патологічні ефекти, які проявляються на рівні шлунково-кишкового тракту.

Незважаючи на численні нові публікації, проблема регуляції моторики стравоходу, шлунка та кишечника залишається актуальною, до кінця не вирішеною. Тому детальніше дослідження механізму впливу блокаторів і донаторів *NO* на шлунково-кишковий тракт дасть можливість повніше зрозуміти механізми системного та міжсистемного впливу *NO*.

Якщо вже загальновідомо, що за механізмом своєї дії оксид азоту є ендогенним «релаксуючим» фактором, то ще залишається не вирішеним питання щодо уявлень про роль оксиду азоту в реалізації секреторної активності шлунка. Деякі дослідники вважають, що *NO* здійснює гальмівний вплив на його секреторну функцію (Khattab et al., 2001), що може реалізовуватися як через зниження тонічної активності блукаючих нервів, так і через виділення такого гальмівного чинника як соматостатин. При цьому вважається, що один із механізмів гальмівного впливу оксиду азоту на кислую шлункову секрецію реалізується за рахунок стимулювального впливу *NO* на циклооксигенази, внаслідок чого збільшується синтез простагландинів (Polotnjuk et al., 2003). Деякі автори вважають, що нітроергічна ланка регуляції стимулює кислую шлункову секрецію (Takeuchi et al., 2000), інші підкреслюють, що роль *NO* у фізіологічній регуляції секреторної функції шлунка до кінця не відома (Elliott et al., 1998). Тому мета даної роботи – оцінити особливості періодичної секреторної та моторної активності шлунка в умовах надлишку та дефіциту *NO*.

Матеріал і методи досліджень

Експерименти проведені на 100 білих лабораторних щурах-самцях масою 200–230 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Тварин випадковим чином розділили на п'ять груп по 20 особин у кожній. Щурам контрольної групи вводили 1 мл 0,9% розчину *NaCl* (I група). Дисбаланс *NO*-ергічної системи викликали шляхом 6- та 12-добового уведення розчину натрію нітропрусиду (SNP) – донатора *NO* (Sigma-Aldrich) у дозі 1,5 мг/кг (II та III групи) та суспензії *NO*-нітро-L-аргініну (Sigma-Aldrich) у дозі 40 мг/кг (IV та V групи). Розчини готували безпосередньо перед експериментом і внутрішньочеревинно вводили дослідним тваринам в один і той же час о 9-й годині ранку. Після завершення моделювання тварин піддавали 18-годинній харчовій депривації з вільним доступом до води, щурів наркотизували розчином кетаміну гідрохлориду (110 мг/кг) та проводили забір шлункового соку за допомогою зонда (Razuvaeva et al., 2009). Забір шлункового соку проводили кожні 15 хв упродовж години. Зонд вводили на таку глибину, щоб кінець його розташовувався в нижній третині шлунка. Вміст шлунка відсмоктували протягом 5 хв за допомогою шприца, насадженого на зонд. Після натщевої секреції отримували базальну порцію шлункового соку. Для цього упродовж однієї години через кожні 15 хв відсмоктували шлунковий вміст і збирали у пронумеровані пробірки. Враховували загальний об'єм і *pH* (Razuvaeva et al., 2009).

Вміст пепсину у шлунковому соку визначали за кількістю тирозину та триптофану, які утворюються в результаті гідролізу субстрату. Шлунковий сік залежно

від *pH* і застосування стимулятора шлункових залоз розводили 0,02 н соляною кислотою в 10–20 або 40 разів. У піддослідні та дві контрольні пробірки вносили по 1 мл 2% розчину субстрату (субстрат готували в день визначення, шляхом розчинення у воді, а потім за допомогою 0,3 н соляною кислоти потенціометрично встановлювали *pH* – 1,8) і утримували 5 хв на водяній бані за температури +37 °С. Після цього у дослідні пробірки (з інтервалом 30 с) доливали по 0,2 мл досліджуваного шлункового соку, а в контрольні – по 0,2 мл дистильованої води. Проби інкубували 10 хв за тієї самої температури. Після цього з інтервалом 30 с додавали по 5 мл 5% розчину трихлороцтової кислоти в кожен пробірку. Потім, через 5 хв, вміст пробірок фільтрували через щільний хроматографічний папір марки М або фільтри беззолні з синьою стрічкою. До пробірки з 5,0 мл розчину *NaOH* додавали по 2,5 мл фільтрату з дослідних і контрольних пробірок і 1,5 мл реактиву Фоліна. Інтенсивність забарвлення вимірювали через 10 хв проти води на фотоелектроколометрі при червоному світлофільтрі з максимумом поглинання 670 нм (Razuvaeva et al., 2009).

Для визначення глікопротеїнів шлунковий сік попередньо профільтрували, розбавляли в 2–5 разів дистильованою водою. Потім 0,5 мл розведеного соку додатково розводили 5 мл дистильованої води та додавали у пробірки по 2 мл 20% сульфосаліцилової кислоти. Через 10 хв отриманий розчин фільтрували, далі 5 мл фільтрату переливали у центрифужні пробірки та змішували з 1 мл фосфоровольфрамкової кислоти. Через 15 хв залишок центрифугували (1000 об./хв упродовж 30 хв), прозорий супернатант зливали. Пробірки з осадом перекидали вгору дном і висушували на фільтрувальному папері. Осад розчиняли в 2 мл 0,1 н *NaOH*, додавали 1,3 мл 10% *NaOH*, потім 0,5 мл реактиву Фоліна та через 10 хв фотометрували (Razuvaeva et al., 2009).

Міоелектричну активність (МЕА) гладеньких м'язів шлунка відводили за допомогою біполярних платинових голкових електродів (Kovalyov et al., 2004). Електрод фіксували в антральному відділі шлунка на відстані 5–7 мм від пілоричного сфінктера. Реєстрацію здійснювали за допомогою поліграфа RM–86 Nihon Kohden. Аналізували МЕА шлунка за показниками моторного індексу (МІ), котрий розраховували як площу, обмежену проінтегрованою електрогастроміограмою. Цей показник відображає загальну картину моторної активності шлунка.

Ступінь ураження слизової оболонки ГДЗ оцінювали за допомогою методу, заснованого на кількісному обліку сорбції тканинами вітального барвника нейтрального червоного. При цьому вилучений шлунок промивали фізіологічним розчином, заповнювали 0,25% розчином барвника та інкубували у термостаті за +38 °С протягом 7 хв. Після цього шлунок промивали, розтирали та фіксували на парафінових підкладках і візуально оцінювали наявність ерозивно-виразкових пошкоджень його слизової оболонки.

Дослідження проводили, дотримуючись нормативів Конвенції з біоетики Ради Європи 1997 р., Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей, загальних етичних принципів експериментів на тваринах, прийнятих Першим національним конгресом України з

біоетики (2001 р.), інших міжнародних угод і національного законодавства в цій галузі (Pokrovskij, 1997).

Отриманий числовий матеріал обробляли за допомогою стандартних методів математичної статистики з визначенням середніх величин, їх стандартних помилок та інтервалів достовірності за *t*-критерієм Стьюдента. Відмінності, отримані методом парних порівнянь, вважали достовірними при $P < 0,05$ (Petrin et al., 2003). Математичні розрахунки та побудову графіків здійснювали з використанням пакетів програм Microsoft Excel 2010 і OriginLab OriginPro.v8.0.

Результати та їх обговорення

Установлено, що 6-добове уведення донатора оксиду азоту викликало зменшення об'єму шлункового соку в 1,9 раза (табл. 1), при цьому його *pH* підвищувалася відносно контролю, що викликало зниження темпу секреції іонів водню ушестеро. Відмічали підвищення в шлунковому соку концентрації пепсину в 1,6 раза, що свідчить про стимуляцію роботи головних клітин шлунка в умовах надлишку *NO* і може бути пов'язане з компенсаторним збільшенням продукції пепсину у відповідь на зниження його активності в умовах зниження кислотності соку. Концентрація захисних факторів слизової оболонки шлунка – глікопротеїнів (ГП) у шлунковому соку збільшувалася на 68% відносно контрольних значень, що, у свою чергу, збігається з літературними даними, згідно з якими з *NO* пов'язані механізми синтезу слизу в кишковому епітелії (Zvjagintseva and Gridneva, 2005).

В умовах 12-добового уведення натрію нітропрусиду об'єм шлункового соку зменшувався в 2,8 раза (рис. 2а), порівняно з контролем. Рівень *pH* шлункового соку підвищувався (табл. 1) відносно контролю та залишався на тому ж рівні, що і на 6-ту добу уведення натрію нітропрусиду. Робота головних клітин стимулювалася і рівень пепсину збільшився в 2,3 раза. Концентрація ГП продовжувала зростати, збільшившись у 2,4 раза відносно контрольних значень.

При візуальному аналізі слизової оболонки шлунка після 6-добового уведення нітропрусиду натрію не спостерігалося явних ушкоджень. У подовження терміну уведення донатора до 12 діб у деяких тварин відмічали наявність поодиноких виразкових ушкоджень, які за характером дифузного розташування збігалися з такими, які відмічали за умов моделювання стресорних ушкоджень (Razuvaeva et al., 2009).

За умов моделювання недостатності оксиду азоту на 6-ту добу уведення L-NNA спостерігали збільшення об'єму шлункового соку на 78% (табл. 2) зі збільшенням *pH* відносно показників інтактних тварин. Темп секреції іонів водню знизився ушестеро. Проте рівень пепсину не змінювався. Концентрація ГП підвищувалася на 21% відносно контрольних значень.

Після 12-добового уведення L-NNA відмічалася збільшення об'єму шлункового соку на 17% та збільшення *pH* (табл. 2), тобто темп секреції іонів гідрогену знизився на 99% за практично незмінних значень концентрації пепсину. Зменшилася концентрація глікопротеїнів (на 41% відносно контрольних рівнів). Такі факти вказують на імовірне порушення кислототвірної функції за даних

умов, а також на порушення активності пілоричного сфінктера, що стає причиною закиду дуоденального вмісту до шлунка. Про це свідчить і зростання *pH* шлункового соку та зміни МЕА шлунка. Макроспічний

аналіз морфологічного стану слизової оболонки шлунка дослідних тварин у цій серії виявив наявність гострих виразок овальної та полігональної форми (у кількості 2–4), які були розташовані переважно в тілі шлунка.

Таблиця 1

Показники шлункової секреції у контрольних тварин (I група), після 6- (II) та 12-добового (III група) уведення натрію нітропрусиду (*n* = 10)

Показники	I група	II група	III група
Об'єм, мл	1,11 ± 0,12	0,59 ± 0,08**	0,39 ± 0,06***
<i>pH</i>	1,16 ± 0,10	1,54 ± 0,06**	1,56 ± 0,05**
Пепсин, мг/мл	0,66 ± 0,03	1,08 ± 0,06***	1,56 ± 0,07***
ГП, мг/мл	0,034 ± 0,002	0,057 ± 0,002***	0,080 ± 0,005***
Темп секреції H^+ , ммоль/год	0,125 ± 0,0230	0,021 ± 0,0036**	0,014 ± 0,0026***

Примітки: * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$.

Таблиця 2

Зміни показників шлункової секреції, що відбулися з умовах 6- (IV) та 12-добового (V група) уведення блокатора оксиду азоту – L-NNA порівняно з контрольною групою тварин (I група) (*n* = 10)

Показники	I група	IV група	V група
Об'єм, мл	1,11 ± 0,12	1,97 ± 0,23**	2,05 ± 0,15***
<i>pH</i>	1,16 ± 0,10	2,14 ± 0,25**	3,47 ± 0,25***
Пепсин, мг/мл	0,66 ± 0,03	0,67 ± 0,12	0,61 ± 0,14
ГП, мг/мл	0,034 ± 0,002	0,041 ± 0,002*	0,020 ± 0,006*
Темп секреції H^+ , ммоль/год	0,1250 ± 0,024	0,0210 ± 0,005**	0,0008 ± 0,0001***

Примітки: див. табл. 1.

У другій серії досліджень реєстрували міоелектричну активність шлунка за вищезазначених умов. В інтактних тварин МЕА шлунка мала чіткий фазний характер, тривалість I фази становила 70–90 хв, II–III – 30–50 хв (рис. 1), показники моторного індексу шлунка коливалися залежно від фаз періодичної активності та становили в середньому $4,7 \pm 1,0$ мкВ/с² (рис. 2). За 6-добової дії донатора NO тривалість фаз МЕА шлунка була подібною до контролю, але спостерігалася тенденція до зниження показників моторного індексу шлунка відносно контрольних значень.

У тварин III групи відмічали зменшення МЕА шлунка, а характер скорочень відповідав першій фазі основного електричного ритму шлунка на рисунку 3, активні фази не реєструвались. Міоелектрична активність

шлунка знизилась за показниками моторного індексу на 56% ($P < 0,001$) порівняно з контролем (рис. 2).

Після 6-добового порушення NO-ергічної ланки регуляції періодичної активності шлунка фазна картина МЕА шлунка була подібною до переходу між II та III фазами, переважали пізня II та рання III фази, I фаза була не виявлена протягом запису, тобто на запису зареєстровано переважання активних фаз (див. рис. 3). На 6-ту добу дефіциту NO відмічалось збільшення MI в 1,5 раза ($P < 0,05$), електрогастроіограма відрізнялася нестабільністю періоду ритму, збільшенням показників амплітуди та збільшенням періоду коливання порівняно з показниками інтактних тварин. Фази МЕА шлунка можливо ідентифікувати тільки на основі моторного індексу.

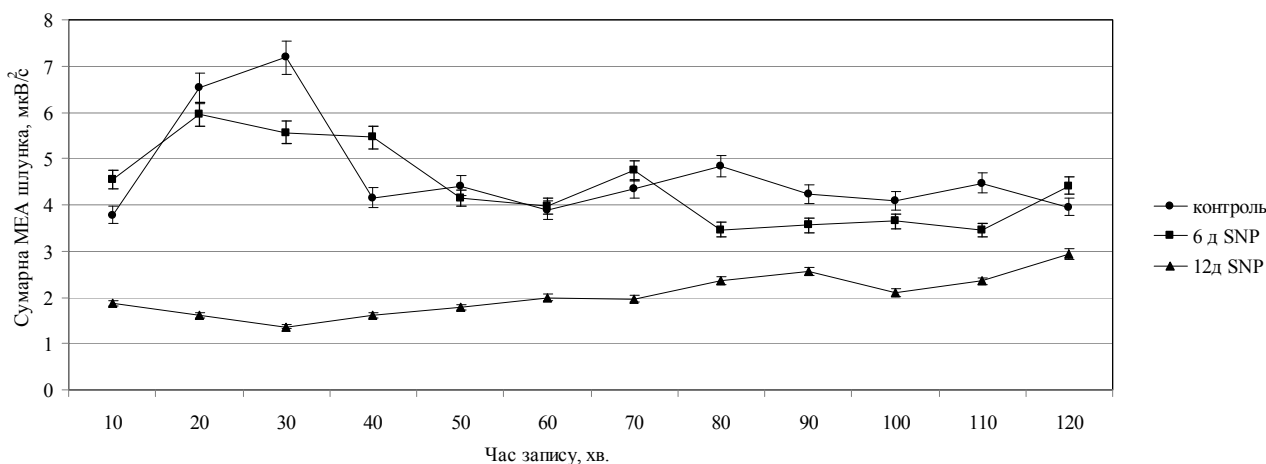


Рис. 1. Динаміка змін сумарної МЕА шлунка в умовах 6- (II) та 12-добового (III група) уведення натрію нітропрусиду (SNP) порівняно з контрольною групою тварин (I група) (*n* = 10)

За дефіциту монооксиду азоту відбувалося нав'язування шлункові ритму дванадцятипалої кишки, що супроводжувалося дуоденогастральним рефлюксом. В умовах 12-добового блокування *NO*-синтази на фоні зменшення загальної МЕА шлунка встановлено зниження МІ шлунка на 28% ($P < 0,001$), спостерігалось зникнення I фази активності (рис. 4). Тобто зареєстровано відсутність фази спокою на тлі зниженої сумарної МЕА, що свідчить про виснаження адаптаційно-компенсаторних механізмів періодичної активності шлунка.

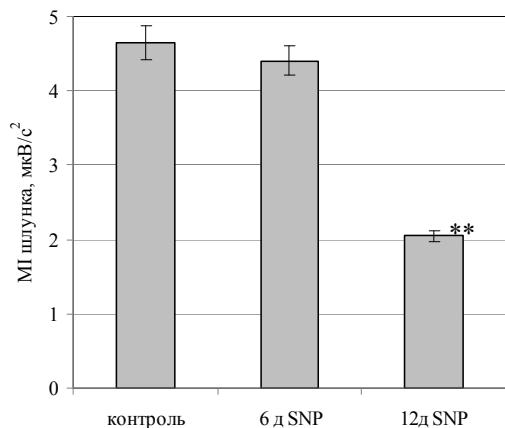


Рис. 2. Показники МІ шлунка після 6- (II) та 12-добового (III група) уведення натрію нітропрусиду (SNP) порівняно з контрольною групою тварин (I група) ($n = 10$): ** – $P < 0,01$

Отримані дані стосовно підвищення секреторної активності слизової оболонки шлунка в умовах надлишку оксиду азоту збігаються з даними (Polenov, 1998), де автор у дослідях на ізольованих головних клітинах

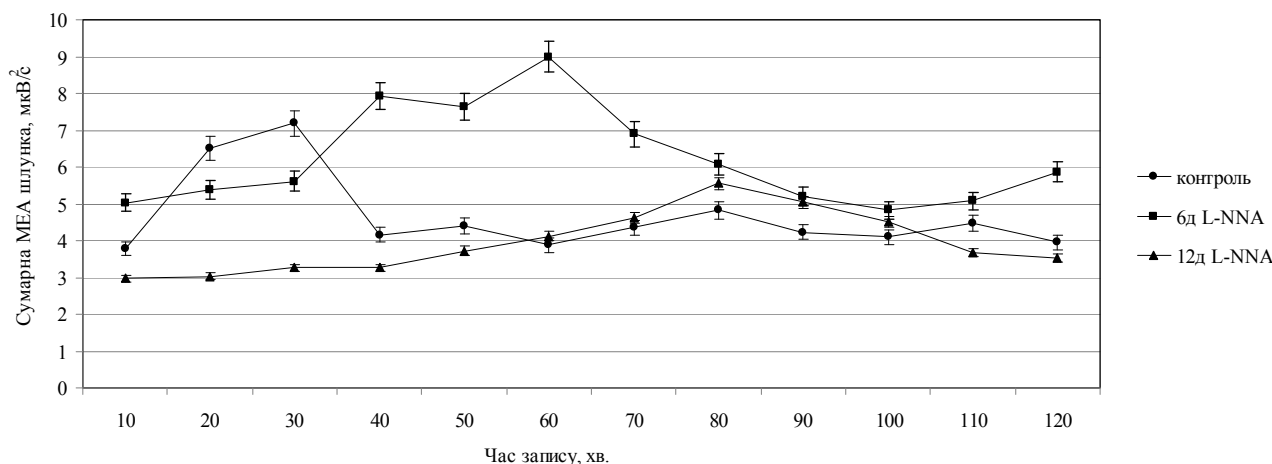


Рис. 3. Динаміка змін сумарної МЕА шлунка після 6- (IV) та 12-добового (V група) уведення блокатора оксиду азоту L-NNA порівняно з контрольною групою тварин (I група) ($n = 10$)

Роль оксиду азоту в регуляції періодичної моторної активності шлунка пов'язана як із прямою дією на гладенько-м'язові клітини, так і з присутністю NOS у нейронах, які іннервують шлунково-кишковий тракт (Cavicchi and Whittle, 1999). Стимуляція нейронів супроводжується підвищенням синтезу оксиду азоту, який, проникаючи в м'язові шари активує синтез цГМФ, що спричинює зниження рівня іонів кальцію в цитозолі клітин і послаблення зв'язку між міозином та актином. Це

шлунка свині відмічав підвищення секреції пепсину у відповідь на уведення лейкотриєнів B_4 , C_4 , D_4 та E_4 і зниження на 50–60% при уведенні L-NMMA. Виходячи з отриманих даних, С.А. Поленов пояснив, що стимулювальний ефект лейкотриєнів частково опосередкований релізінгом *NO*, а епідермальний фактор росту підвищує секрецію пепсиногену частково за рахунок генерації *NO*. Отримані дані можуть свідчити як про розвиток адаптаційно-компенсаторних реакцій, так і про порушення механізмів регуляції в умовах екзогенного уведення *NO*. До того ж, один із механізмів гальмівного впливу оксиду азоту на кислу шлункову секрецію реалізується за рахунок стимулювального впливу *NO* на циклооксигенази, у результаті чого збільшується синтез простагландинів. Останні, як відомо, гальмують стимульовану секрецію соляної кислоти (Polotnjuk et al., 2003).

Існує тісний взаємозв'язок впливу *NO* та простагландинів на кровопостачання слизової оболонки шлунка, секрецію слизу та посилення захисту від ерозивно-виразкових ушкоджень. Проте зв'язок між простагландинами та оксидом азоту в регуляції кислої шлункової секреції залишається не до кінця з'ясованим (Polotnjuk et al., 2003). Не можна виключати важливу роль *NO* й у регуляції шлункового кровотоку. Досліди з холецистокініном і прямою електричною стимуляцією блукаючого нерва показали, що *NO* опосередковує вагусну дилатацію судин шлунка (Elliott et al., 1998). За умов внутрішньошлункового уведення соляної кислоти синтез *NO* збільшує кровопостачання слизової оболонки. Цей механізм захищає слизову оболонку при посиленні зворотної дифузії H^+ у випадку порушення слизового бар'єру (Takeuchi et al., 2000).

викликає релаксацію клітин (Mauev et al., 2008). Важливо підкреслити, що через *NO* як вторинного посередника забезпечуються вазодилаторні ефекти блукаючого нерва та ефекти багатьох інших вазоактивних речовин (Elliott et al., 1998). Характер порушень у функціонуванні шлунка у піддослідних тварин за умов дефіциту оксиду азоту має певну подібність до уражень, викликаних моделюванням дуоденогастрального рефлюксу шляхом перорального уведення жовчі (Rudenko, 2007).

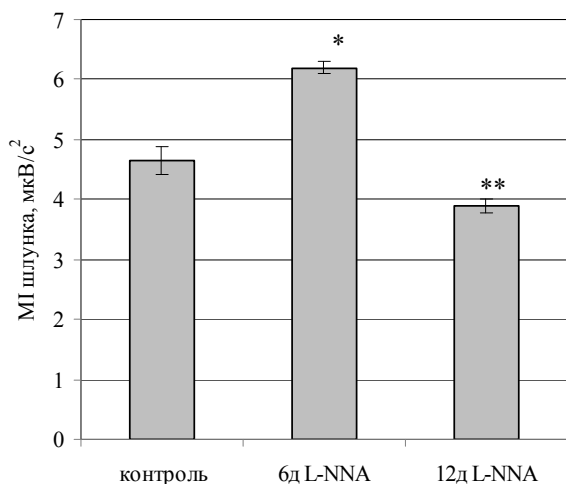


Рис. 4. Показники МІ шлунка за 6- (IV) та 12-добового (V група) уведення блокатора оксиду азоту L-NNA порівняно з контрольною групою тварин (I група) ($n = 10$): * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$

Все ще залишається необхідність дослідження шлункового соку на вміст жовчних кислот, що, беззаперечно, підтвердило б наявність факту закиду вмісту дванадцятипалої кишки до шлунка.

Висновки

Результатом тривалого уведення донатора *NO* є зміни як моторної, так і секреторної активності шлунка. Зміни моторної активності шлунка проявлялись у тенденції до зменшення показників МІ на 6-ту добу. На 12-ту добу спостерігали зміни характеру скорочень, вони в усіх фазах МЕА шлунка ставали подібними до першої фази основного електричного ритму, також спостерігалось зменшення МІ на 56%. Зміни секреторної функції шлунка проявлялися у достовірному зменшенні об'єму шлункового соку в 1,9 та 2,8 рази, підвищенні *pH*, підвищенні рівня пепсину в 1,6 та 2,3 рази, зниженні рівня ГП на 68% та у 2,4 рази на 6- та 12-ту добу відповідно. За цих змін спостерігали розбалансування механізмів регуляції секреторної активності шлунка, а ефект натрію нітропрусиду на головні та поверхневі епітеліальні клітини слизової оболонки шлунка був вираженішим за тривалішої дії чинника.

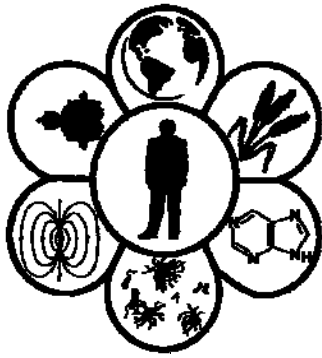
Тривалий дефіцит *NO* викликає дисбаланс періодичної активності шлунка, порушення міоелектричної активності в напрямку декомпенсаторних проявів. При уведенні блокатора *NO* картина міоелектричної активності стала подібною до переходу між II та III фазами МЕА. Відмічали збільшення МІ в 1,3 рази на 6-ту добу уведення блокатора. На 12-ту добу відмічали зміни характеру скорочень у всіх фазах МЕА шлунка та зниження МІ на 28%. Зміни секреторної функції шлунка проявлялися у достовірному збільшенні об'єму шлункового соку на 78 і 85%; значному зростанні його *pH*. У даному випадку ми констатували порушення кислототвірної функції шлунка та порушення активності пілоричного сфінктера, що стає причиною закиду дуоденального вмісту до шлунка. Зазначимо, що дане питання потребує подальшого вивчення.

Бібліографічні посилання

- Bentz, M., Zaouter, C., Shi, Q., Fahmi, H., Moldovan, F., Fernandes, J.C., Benderdour, M., 2012. Inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents lipid peroxidation in osteoarthritic chondrocytes. *J. Cell. Biochem.* 113(7), 2256–2267.
- Cavicchi, M., Whittle, B.J., 1999. Potentiation of cytokine induced iNOS expression in the human intestinal epithelial cell line, DLD-1, by cyclic AMP. *Gut* 45(3), 367–374.
- Currò, D., Preziosi, P. 1998. Non-adrenergic non-cholinergic relaxation of the rat stomach. *Gen. Pharmacol.* 31(5), 697–703.
- Elliott, S.N., Wallace, J.L., 1998. Nitric oxide: A regulator of mucosal defense and injury. *J. Gastroenterol.* 33(6), 792–803.
- Ivashkin, V.T., Drapkina, O.M., 2011. Klinicheskoe znachenie oksida azota i belkov teplovogo shoka [The clinical significance of nitric oxide and heat shock proteins]. Moscow (in Russian).
- Jesedov, J.M., Magomedjeminova, A.S., 2010. Soderzhanie oksida azota v zheludochnom soke v zavisimosti ot kislотноsti zheludochnoj sekrecii u bol'nyh s zabolovanijami verhnego otdela pishhevaritel'nogo trakta [Gastric juice levels of nitric oxide in relation to gastric acidity in patients with upper digestive tract diseases]. *Klinicheskaja Laboratornaja Diagnostika* 7, 48–50 (in Russian).
- Kamata, K., Kohzuki, M., Misawa, M., Kasuya, Y., 1993. Involvement of nitric oxide pathway in non-adrenergic non-cholinergic (NANC) relaxation in the rat stomach: Differential innervation of nanc nerves in the longitudinal and circular muscle of the fundus. *Gen. Pharmacol.* 24(6), 1403–1410.
- Khattab, M.M., Gad, M.Z., Abdallah, D., 2001. Protective role of nitric oxide in indomethacin-induced gastric ulceration by a mechanism independent of gastric acid secretion. *Pharmacol. Res.* 43(5), 463–467.
- Kmonickova, E., Kverka, M., Tlaskalová-Hogenová, H., Kostecka, P., Zidek, Z., 2012. Stimulation of nitric oxide, cytokine and prostaglandin production by low-molecular weight fractions of probiotic *Lactobacillus casei* lysate. *Neuro Endocrinol. Lett.* 33(3), 166–172.
- Kochar, N.I., Chandewal, A.V., Bakal, R.L., Kochar, P.N., 2011. Nitric oxide and the gastrointestinal tract. *Int. J. Pharm.* 7(1), 31–39.
- Kovalyov, I.V., Baskakov, M.B., Kapilevich, L.V., Medvedev, M.A., 2004. Rol' oksida azota v reguljacii jelektricheskoi i sokratitel'noj aktivnosti gladkih myshc [Role of nitric oxide in the regulation of electrical and contractive activity of unstriated muscles]. *Bull. Sib. Med.* 1(1), 7–26 (in Russian).
- Lamarque, D., Whittle, B.J., 1996. Involvement of peroxynitrite in the lipid peroxidation induced by nitric oxide in rat gastric mucosa. *Eur. J. Pharmacol.* 313(1), 5–7.
- Mayev, I.V., Trukhmanov, A.S., Cheremushkina, N.V., 2008. Nitric oxide and its role in pathogenesis of gastroesophageal reflux disease. *The Russian Medical Vesti* 8(2), 3–9.
- Mungrue, I.N., Gros, R., You, X., Pirani, A., Azad, A., Csont, T., Schulz, R., Butany, J., Stewart, D.J., Husain, M., 2002. Cardiomyocyte overexpression of iNOS in mice results in peroxynitrite generation, heart block, and sudden death. *J. Clin. Invest.* 109(6), 735–743.
- Pacher, P., Beckman, J.S., Liaudet, L., 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.* 87(1), 315–424.
- Petrin, A., Sjebin, K., 2003. Nagljadnaja statistika v medicine [Visual statistics in medicine]. Geotar-Med, Moscow (in Russian).
- Pokrovskij, V.I., 1997. Biomedicinskaja jetika [Biomedical ethics]. Medicina, Moscow (in Russian).
- Polenov, S.A., 1998. Okis' azota v reguljacii funkcij zheludochno-kishechnogo trakta [Nitric oxide in the regulation of the gas-

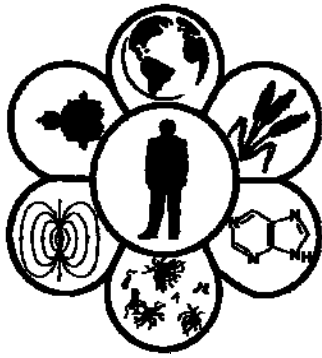
- trointestinal tract]. *Rossijskij Zhurnal Gastrojenterologii, Gepatologii, Koloproktologii* 1, 53–60 (in Russian).
- Polotnjuk, S.Y., Shtanova, L.Y., Shtanova, T.V., Beregova, T.V., 2003. Doslidzhennja roli prostaglandiniv u reguljacii oksidom azotu kisloto-sekretornoji funkciji shlunka u shhuriv [Investigation of the role of prostaglandins in the regulation of nitric oxide acid-secretory function of the stomach in rats]. *Ukrains'ki Medichni Visti* 5(1), 97 (in Ukrainian).
- Price, K.J., Hanson, P.J., Whittle, B.J., 1996. Localization of constitutive isoforms of nitric oxide synthase in the gastric glandular mucosa of the rat. *Cell Tissue Res.* 285(1), 157–163.
- Razuvaeva, O.V., Murzin, O.B., Rudenko, A.I., 2009. Dijal'nist' sekretornyh zaloz shlunka ta nitregerichni mehanizmy i'i reguljacii' za umov modeljuvannja adrenalinovoi' vyrazky [Activity of stomach secretory glands and the nitregeric mechanisms of their regulation under the condition of the adrenalin ulcer simulation]. *Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Ekol.* 17(1), 193–198 (in Ukrainian).
- Rudenko, A.I., 2007. Motorna dijal'nist' gastroduodenal'noi' zony pry duodenogastral'nomu refljuxi u shhuriv [Motor activity in gastroduodenal duodenogastric reflux in rats]. *Gastroenterologija* 38, 119–127 (in Ukrainian).
- Schuman, E.M., Madison, D.V., 1993. Nitric oxide as an intercellular signal in long-term potentiation. *Semin. Neurosci.* 5(3), 207–215.
- Shapoval, L.N., Pobegailo, L.S., Stepanenko, L.G., Dmytrenko, O.V., Bouryi, V.A., Sagach, V.F., 2011. Impact of swimming exercise training on the effects of modulation of mitochondrial permeability transition and NOS-1 activation in medullary cardiovascular neurons of rats. *Neurophysiology* 43(4), 299–308.
- Sharma, J.N., Al-Omran, A., Parvathy, S.S., 2007. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology* 15(6), 252–259.
- Stepanov, Y.M., Tverdokhlebl, I.V., Sirenko, O.Y., 2012. L-arginin: Svojstva, primenenie v medicine, toksichnost' i arginin-inducirovannoe porazhenie podzheludochnoj zhelezy [L-arginine: Properties, application in medicine, toxicity, and arginine-induced acute pancreatitis]. *Suchasna Gastroenterologija* 65(3), 63–70 (in Ukrainian).
- Takeuchi, K., Araki, H., Kawauchi, S., Kunikata, T., Mizoguchi, H., Tashima, K., 2000. Regulatory mechanism of acid secretion in the damaged stomach: Role of endogenous nitric oxide. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 15, 37–45.
- Tani, S., Itoh, H., Okabayashi, Y., Nakamura, T., Fujii, M., Fujisawa, T., Koide, M., Otsuki, M., 1990. New model of acute necrotizing pancreatitis induced by excessive doses of arginine in rats. *Dig. Dis. Sci.* 35(3), 367–374.
- van Griensven, M., Zeichen, J., Skutek, M., Barkhausen, T., Krettek, C., Bosch, U., 2003. Cyclic mechanical strain induces NO production in human patellar tendon fibroblasts – a possible role for remodelling and pathological transformation. *Exp. Toxicol. Pathol.* 54(4), 335–338.
- Zvenigorodskaja, L.A., Nilova, T.V., 2008. Oksid azota kak marker vospalenija pri steatogepatite u bol'nyh s metabolicheskim sindromom [Nitric oxide as a marker of inflammation in steatohepatitis in patients with metabolic syndrome]. *Bolezni Organov Pishhevarenija* 10(2), 47–49 (in Russian).
- Zvjagintseva, T.D., Gridneva, S.V., 2005. Vascular endothelium in norm and at gastrointestinal diseases. *Contemporary Gastroenterology* 22(2), 51–55.

Надійшла до редколегії 14.04.2014



Зміст

Кузьмінов О.Б., Остапів Д.Д., Альохіна Т.А. Оцінка цитотоксичної дії антигістамінних препаратів лоратадину та дезлоратадину з використанням тест-об'єкта – спермійів бугаїв	3
Сидашенко О.И., Воронкова О.С., Сирокваша Е.А., Винников А.И. Влияние цефтриаксона и тетрациклина на формирование биопленки штаммами <i>Staphylococcus epidermidis</i>	7
Кеца О.В., Зазулик М.В., Хімчак М.В. Інтенсивність окисних процесів у мікосомній фракції печінки щурів за умов різного забезпечення поліненасиченими жирними кислотами	12
Чапля О.В., Гонтар Ю.В., Білько Н.М. Доімплантаційний розвиток ембріонів жінок старшого репродуктивного віку	17
Ящук О.В., Черевач Н.В., Винников А.И. Моніторинг розповсюдження вірусів серед домашніх котів і собак у м. Дніпропетровськ	23
Соколенко В.Л., Соколенко С.В. Роль системи Нр в адаптації показників специфічного імунітету до впливу помірних фізичних навантажень	28
Коцюба К.Р., Воронкова О.С., Винников А.И., Шевченко Т.М. Механізми стійкості до антибіотиків представників родини Enterobacteriaceae	33
Аваков В.В., Рожко М.М. Оцінка якості реставрацій постійних зубів у дітей, які проживають у місцевості, забрудненій солями важких металів	39
Бубало К.В., Голодок Л.П., Винников А.И. Частота виявлення мікоплазм урогенітального тракту жінок у м. Дніпропетровськ	45
Варигин А.Ю. Фенотипическая пластичность в соотношении полов у <i>Idotea baltica basteri</i> (Crustacea, Isopoda) в Одесском заливе Черного моря	49
Гордієнко Ю.А. Активність матриксних металопротеїназ ММП2 та ММП9 у пацієнтів з мієло- та лімфопроліферативними захворюваннями	54
Лисунець О.М., Недзвецкий В.С. Аутоімунна реакція проти нейроспецифічних білків та якість життя пацієнтів з уродженою вадою серця	58
Сухаренко О.В. Використання специфічних біомаркерів донних риб Керченської протоки для оцінки забруднення водних біоресурсів	62
Кириченко С.В., Недзвецкий В.С. Вплив гіпертиреозу на процеси навчання та стан гліальних проміжних філаментів головного мозку щурів	66
Севериновська О.В., Галінський О.О., Руденко А.И., Мурзін О.Б., Бабічева В.В., Скубицька Л.Д. Особливості періодичної активності шлунка за умов дисбалансу NO-ергічної системи	71



Content

Kuzminov O., Ostapiv D., Alekhina T. Evaluation of cytotoxic action of antihistamines desloratadine and loratadine using bulls spermatozoa as a test object	3
Sidashenko O.I., Voronkova O.S., Sirokvasha Y.A., Vinnikov A.I. Ceftriaxone and tetracycline effect on biofilm-formation strains of <i>Staphylococcus epidermidis</i>	7
Ketsa O.V., Zazulyk M.V., Himchak M.V. Oxidation process intensity in microsomal fraction of rat liver under conditions of different supplementation with polyunsaturated fatty acids	12
Chaplia O.V., Gontar J.V., Bilko N.M. Preimplantation development of embryos in women of advanced maternal age	17
Yashchuk L.V., Cherevach N.V., Vinnikov A.I. Monitoring of viruses spread among domestic cats and dogs in Dnipropetrovsk	23
Sokolenko V.L., Sokolenko S.V. Role of Hp system in adaptation of specific immunity indices to the influence of moderate physical activity	28
Kotsyuba K.R., Voronkova O.S., Vinnikov A.I., Shevchenko T.M. Mechanisms of antibiotic resistance of Enterobacteriaceae family representatives	33
Avakov V.V., Rozhko N.N. Evaluation of quality of permanent teeth restorations in children of areas contaminated by heavy metal salts	39
Bubalo K.V., Golodok L.P., Vinnikov A.I. Frequency of urogenital mycoplasma detection in women of Dnipropetrovsk	45
Varigin A.Y. Phenotypic plasticity in the <i>Idotea baltica basteri</i> (Crustacea, Isopoda) sex ratio in Odessa bay, Black Sea	49
Gordiienko I.A. Activity of MMP2 and MMP9 matrix metalloproteinases in patients with myeloproliferative and lymphoproliferative diseases	54
Lisunets H.M., Nedzvetsky V.S. Autoimmune reaction against neurospecific proteins and life quality of patients with congenital heart failure	58
Sukharenko H.V. Assessment of Kerch Bay environmental pollution using neuroglial proteins of ground fish	62
Kyrychenko S.V., Nedzvetsky V.S. Hyperthyreosis effects on the learning and glial intermediate filaments of rat brain	68
Severynovska O.V., Galinskij O.O., Rudenko A.I., Mursin O.B., Babicheva V.V., Skubytka L.D. Features of the gastric periodic activity in conditions of <i>NO</i> -ergic system disbalance	71

Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Медицина

Заснований у 2010 р.

Том 5(1)

Українською, російською та англійською мовами

Свідоцтво державної реєстрації серія КВ № 19822-9622Р від 15.03.2013 р.

Редактор В.Д. Маловик
Оригінал-макет виготовив В.В. Бригадиренко

Підписано до друку 25.05.2014. Формат 60×84 ¹/₈. Папір друкарський. Друк плоский. Ум. друк. арк. 12,3.
Ум. фарбовідб. 12,3. Обл.-вид. арк. 12,3. Тираж 100 пр. Замовлене 4946.

Віддруковано в ТОВ «Роял Принт»
пр. Кірова, 91, м. Дніпропетровськ, 49054
тел. (056) 794-61-04(05)
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи
серія ДК № 4121 від 27.07.2011.