



УДК 577.112.85+616-097

Оцінка методів біокон'югації для отримання синтетичних позитивних контролів для імуноферментного аналізу модифікації «IgM-пастка»

О.Ю. Галкін¹, Ю.В. Горшунов²

¹Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут», Київ, Україна

²Науково-дослідний та конструкторсько-технологічний інститут міського господарства, Київ, Україна

Запропоновано методологічний підхід до застосування синтетичних позитивних контролів в імуноферментних наборах, побудованих за принципом «IgM-пастки», який полягає у використанні кон'югату нормальних IgM людини та моноклональних антитіл до ферменту пероксидази хрому. Для виконання поставленого завдання можливо застосовувати NHS ефір-малеїмід-опосередковану кон'югацію, періодатний і глутаральдегідний методи біокон'югації. Кон'югати нормального IgM людини та моноклональних антитіл до пероксидази хрому, отримані за допомогою NHS ефір-малеїмід-опосередкованої кон'югації та періодатного методу, гомогенні за молекулярною масою, натомість кон'югат, який синтезується глутаральдегідним методом, містить щонайменше три групи біополімерів близької молекулярної маси. Синтетичні позитивні контролі, отримані різними методами, характеризуються вищим титром порівняно з високотитражною IgM-позитивною сироваткою. Разом із тим, позитивний контроль, отриманий за допомогою NHS ефір-малеїмід-опосередкованої кон'югації, характеризується найкращим профілем титрування (повільнішим спаданням активності під час імуноферментного аналізу при його розведенні).

Ключові слова: імуноферментний аналіз; IgM; позитивний контроль; кон'югація

Evaluation of bio-conjugation methods for obtaining of synthetic positive control for IgM-capture ELISA

O.Y. Galkin¹, Y.V. Gorshunov²

¹National Technical University of Ukraine "Kyiv Polytechnic Institute", Kyiv, Ukraine

²Research and Technology Institute of Urban Development, Kyiv, Ukraine

The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is the most informative and versatile method of serological diagnostics. The possibility of detecting by ELISA specific antibodies of different classes allow to differentiate primary infectious process and its remission, exacerbation and chronic disease (differential diagnosis). This approach is implemented in the methodology for evaluation of patients for the presence of humoral immune response to TORCH-infections pathogens (toxoplasmosis, rubella, cytomegalovirus, herpes simplex viruses' infections, and some others). Therefore, testing for presence of specific IgG and IgM antibodies against TORCH-infections pathogens in blood serum is an important element of motherhood and childhood protection. The essential problem in the production of IgM-capture ELISA diagnostic kits is obtaining of positive control. The classic version of positive control is human blood serum (plasma) containing specific antibodies. But specific IgM-positive sera are insignificant raw materials. This fact can seriously restrict the production of diagnostic kits, especially in the event of large-scale production. We have suggested the methodological approach to using of synthetic positive controls in IgM-capture ELISA kits based on conjugate of normal human IgM and monoclonal antibodies against horseradish peroxidase. It is found that this task can be fulfilled by means of NHS ester-maleimide-mediated conjugation (by sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-

Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут», Київ, Україна
National Technical University of Ukraine "Kyiv Polytechnic Institute", Kyiv, Ukraine

Науково-дослідний та конструкторсько-технологічний інститут міського господарства, Київ, Україна
Research and Technology Institute of Urban Development, Kyiv, Ukraine
Tel.: +38-067-2348642. E-mail: alexfbt@mail.ua

carboxylate), reductive amination-mediated conjugation (by sodium periodate) and glutaraldehyde-mediated conjugation. It was found that conjugates of normal human IgM and monoclonal antibodies against horseradish peroxidase obtained using NHS ester-mediated maleimide conjugation and periodate method were similar by molecular weight, whereas conjugate synthesized by glutaraldehyde method comprised at least three types of biopolymers with close molecular weight. It was found that synthetic positive control obtained by different methods was characterized by higher titer compared to IgM-positive high-titer serum. However, positive control obtained by NHS ester-mediated maleimide conjugation had the best titration profile characteristics.

Keywords: ELISA; IgM; positive control; conjugation

Вступ

Лабораторна діагностика – невід’ємна частина клінічного обстеження пацієнта, адже без даних лабораторного обстеження неможливе не тільки встановлення клінічного діагнозу, а і контроль за ефективністю та безпекою терапевтичних заходів (Zupanec, 2005). Серед усього комплексу методів клінічної лабораторної діагностики важливе місце посідають серологічні методи, засновані на виявленні серологічних маркерів (антигенів, алергенів, антитіл) інфекційних (вірусних, бактеріальних, грибкових і паразитарних) та неінфекційних (у т. ч. аутоімунних, алергічних, ендокринних та онкологічних) захворювань. Найінформативнішим універсальним та, як наслідок, поширеним методом серологічних досліджень є імуноферментний аналіз (ІФА) (Galkin, 2014). Можливість виявлення за допомогою ІФА специфічних антитіл різних класів дозволяє диференціювати первинний інфекційний процес і його ремісію, загострення чи хронізацію захворювання, тобто проводити диференціальну діагностику. Такий підхід реалізується у методології обстеження пацієнтів на наявність гуморальної імунної відповіді на збудників TORCH-інфекцій (токсоплазмоз, краснуха, цитомегалія, інфекції, викликані вірусами простого герпесу, та деякі інші), які здатні внутрішньоутробно інфікувати плід та спричиняти формування вад розвитку (Senchuk and Dubossarskaja, 2004). Саме тому тестування на наявність специфічних антитіл класу IgG та IgM до збудників TORCH-інфекцій є важливим елементом у системі охорони матері та дитини.

За наявними літературними даними (Holmes et al., 2005; Vazquez et al., 2007; Hunsperger et al., 2009), переважна більшість імуноферментних наборів для виявлення специфічних антитіл класу IgM до певних збудників інфекційних хвороб у сироватці (плазмі) крові людини побудовані за принципом так званої «IgM-пастки» (IgM-capture ELISA). Дана модифікація ІФА дозволяє на першому етапі зафіксувати на твердій фазі загальний пул IgM-антитіл (концентрація яких у сироватці крові значно менша за вміст IgG), а на другому – виявити саме специфічні IgM. Суттєвою проблемою у виробництві подібного роду діагностичних наборів є отримання позитивного контролю (ПК). Класичним варіантом ПК є сироватка (плазма) крові людини з умістом специфічних антитіл певного класу. Разом із тим частота виявлення IgM-позитивних сироваток незначна. Вкрай дефіцитний відповідний біологічний матеріал як сировина для отримання ПК. Дана обставина може суттєво обмежувати виробництво діагностичних наборів, особливо за умов широкомасштабного виробництва. Ми запропонували методологічний підхід до використання синтетичних ПК в імуноферментних наборах, побудованих за принципом «IgM-пастки», який полягає у використанні кон’югату

нормальних імуноглобулінів класу IgM і моноклональних антитіл (МкАт) до ферменту пероксидази хрому (ПХ).

Мета роботи – порівняти різні методи біокон’югації для синтезу синтетичних позитивних контролів для імуноферментного аналізу модифікації «IgM-пастка», засновані на оцінці біохімічних та імунохімічних властивостей отримуваних біокон’югатів.

Матеріал і методи досліджень

NHS ефір-малеїмід-опосередкована кон’югація. Синтез кон’югату проводили за допомогою базового методу (Hermanson, 2000) із власними модифікаціями. На першому етапі проводили активацію нормального IgM людини NHS ефір-малеїмідним зшивальним агентом – сульфо-сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил) циклогексан-1-карбоксилату (сульфо-SMCC). Брالی 2–3 мл розчину IgM (400–420 мг/мл) у 0,1 М фосфатному буфері з 0,15 М NaCl, pH 7,2 (ФБР). До розчину імуноглобулінів додавали 6 мг сульфо-SMCC, розмішували до повного розчинення та витримували упродовж 30 хв за кімнатної температури. Відділення сульфо-SMCC, що не прореагував, проводили на колонці 2,5 × 100 см із сефакрилом S-300, застосовуючи ФБР. Активовані імуноглобуліни елюювали з колонки, розводили до концентрації 20 мг/мл та відразу використовували для синтезу кон’югату.

Кон’югацію активованого IgM та МкАт із відновленими сульфгідрильними групами проводили таким чином. Брالی розчин МкАт до ПХ із концентрацією 5 мг/мл у ФБР із 10 ммоль/л ЕДТА. До 3 мл розчину МкАт додавали 18 мг меркаптоетиламіну (МЕА), інкубували 90 хв за температури +37 °С. Для відділення редукованих антитіл від МЕА, що не вступив у реакцію, застосовували хроматографічну колонку 1,5 × 40 см із сефадексом G-25 (Pharmacia Biotech), використовуючи ФБР із 10 ммоль/л ЕДТА. Елюцію редукованих антитіл проводили зі швидкістю 2 мл/хв. Збирали фракції об’ємом 0,5 мл і вимірювали оптичну густину при 280 нм. Зібрані фракції редукованих МкАт негайно змішували з активованими IgM у молярному співвідношенні IgM : МкАт, рівному 1 : 4. Реакційну суміш витримували 2 години за кімнатної температури. Отриманий кон’югат піддавали очищенню за допомогою імуноафінної хроматографії на колонці із сефарозою 6-В, на якій іммобілізовані МкАт до ПХ.

Періодатний метод кон’югації. Кон’югацію МкАт до ПХ із нормальним IgM людини здійснювали у молярному співвідношенні МкАт до IgM 1 : 1 методом періодатного окислення (Tijssen, 1985) із власними модифікаціями. Для окислення IgM людини (15 мг/мл) брали 0,1 М бікарбонатний буфер, pH 8,3, додаючи такий же об’єм 14 мМ водного розчину періодату натрію. Суміш інкубували протягом 2 годин за кімнатної температури. Одержаний таким чином розчин активованого

IgM людини додавали до розчину МкАт, які попередньо діалізували проти 0,1 М карбонатного розчину, *pH* 9,2. Суміш переносили у хроматографічну колонку та додавали 1/3 частину сухого сефадексу G-25, інкубували протягом 3 годин за кімнатної температури. По закінченні інкубації розчин кон'югату елюювали з колонки та зупиняли реакцію додаванням 1/20 об'ємної частини водного розчину $NaBH_4$ (5 мг/мл), залишаючи на 30 хв за кімнатної температури. Після цього ще додавали 3/20 частини розчину боргідриду натрію, інкубували протягом 60 хв. Одержаний розчин кон'югату переводили у 0,02 М фосфатний буфер з 0,15 М $NaCl$ шляхом діалізу.

Кон'югація за допомогою глутарового альдегіду.

Синтез кон'югату проводили за допомогою базового двохетапного методу (Hermanson, 2000) із власними модифікаціями. Брали розчин IgM людини з концентрацією 10 мг/мл у ФБР, *pH* 6,8. До розчину імуноглобуліну додавали глутаровий альдегід до кінцевої концентрації 1% і витримували протягом ночі за кімнатної температури. Очищення активованого імуноглобуліну від надлишку глутарового альдегіду проводили за допомогою гель-фільтрації на колонці $2,5 \times 100$ см із сефакрилом S-300, використовуючи ФБР, *pH* 6,8. Для подальшої кон'югації брали розчин МкАт до ПХ у концентрації 10 мг/мл у 0,5 М карбонатному буферному розчині, *pH* 9,5. Змішували активовані IgM людини із МкАт у молярному співвідношенні 1 : 1 та витримували протягом ночі за температури +4 °С. Відновлення утворених основ Шиффа та імовірних слідів глутарового альдегіду проводили шляхом додавання $NaBH_4$ (10 мг/мл) та витримування протягом 1,5 години за температури +4 °С. Для відокремлення імовірних нерозчинних форм розчин отриманого кон'югату піддавали центрифугуванню при 10 000 об./хв та очищали на колонці $2,5 \times 100$ см із сефакрилом S-300, використовуючи ФБР, *pH* 7,4.

ІФА модифікації «IgM-пастка». Моноклональні антитіла, специфічні до IgM людини (Galkin and Dugan, 2009), сорбували в 0,02 М карбонат-бікарбонатному буфері в концентрації 2 мкг/мл на 96-лункові поліестеролові планшети для ІФА високої сорбційної ємності (Suzhou Conrem Biomedical Technology Co., Китай).

Планшет інкубували протягом 12 годин за +4 °С, потім тричі відмивали 0,02 М фосфатним буферним розчином із 0,15 М $NaCl$ та 0,2% твін-20 (ФБРТ), витримували у розчині бичачого сироваткового альбуміну (БСА) (10 мг/мл в ФБР) 1 годину за температури +37 °С. Після чотириразового відмивання ФБРТ лунки планшета заповнювали 100 мкл розчину кон'югату нормального IgM та МкАт до ПХ у реакційному буферному розчині (0,05 М трис- HCl буфер, *pH* 8,0, 0,15 М $NaCl$, 5 мМ ЕДТА, 0,5 мг/мл БСА, 0,2% твін-20). Планшети інкубували 30 хв за температури +37 °С та відмивали чотири рази ФБРТ. Після відмивання вносили розчин кон'югату рекомбінантних білків-антигенів цитомегаловірусу людини (ЦМВ) та пероксидази хрому (100 мкл/лунку), який інкубували 30 хв за температури +37 °С. Тричі відмивали ФБРТ і двічі дистильованою водою, після чого вносили по 100 мкл субстратно-хромогенної суміші (розчин 3,3',5,5'-тетраметилбензидину 0,25 мг/мл у 0,1 М натрій-цитратного буферу, *pH* 4,5, із додаванням 10 мкл 33% розчину перекису водню). Реакцію проявляли 20 хв у темноті та зупиняли, додаючи 50 мкл 2 М сірчаної кислоти. Оптичну густину вимірювали при 450 нм/620 нм.

Результати та їх обговорення

Грунтуючись на даних інших авторів (Harlow and Lane, 1988; Johnstone, 1997; Hermanson, 2000) та власному досвіді (Galkin, 2010), обрали три принципові методологічні підходи до синтезу кон'югатів формату «антитіло – антитіло», які піддавали оцінці для синтезу відповідного ПК (неспецифічні IgM + МкАт до ПХ): 1) NHS ефір-малеїмід-опосередкована кон'югація на прикладі сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил) циклогексан-1-карбоксилату (SMCC) як зшивального агента; 2) глутаральдегідний метод; 3) періодатний метод. Використання вищезазначених методологічних прийомів можливе за таких передумов. NHS ефір-малеїмід-опосередкована кон'югація можлива за участі двох біомолекул, одна з яких має вільні аміногрупи, а друга – вільні сульфгідрильні групи (рис. 1).

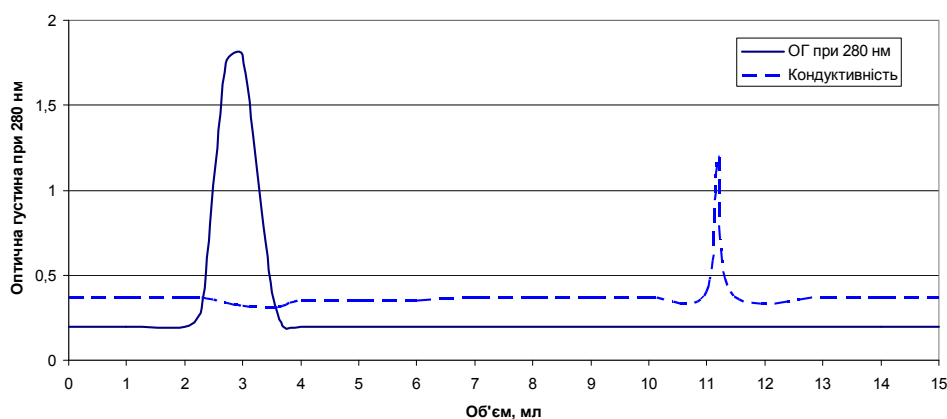


Рис. 1. Відділення редукованих МкАт до ПХ і залишків меркаптоетиламіну гель-фільтрацією на сефадексі G-25 (NHS ефір-малеїмід-опосередкована кон'югація)

Очевидно, що й IgM людини, й мишачі моноклональні антитіла мають відповідні групи, які можуть бути задіяні у даній методиці. Глутаровий альдегід реагує із ε-

аміногрупами лізинових залишків білкової молекули. Важливо зазначити, що одночасно перебігає декілька реакцій, результатом яких є утворення продукту, що

містить міцніші хімічні зв'язки, ніж у простих основах Шиффа (Hermanson, 2000). Потенційна можливість використання періодатного методу зумовлена тим, що молекула IgM людини містить до 12% вуглеводних залишків (Filiprovich, 1999). Це, у свою чергу, дозволяє проводити модифікацію молекули IgM з утворенням активних альдегідних груп, які згодом будуть реагувати з аміногрупами антитіл з утворенням основи Шиффа. Альдегідні групи у молекулі IgM утворюються під час окислювання періодатом натрію їх вуглеводних компонентів, аміногрупи якого попередньо або блоковані 1-фтор-2,4-динітробензолом, або протоновані (Hermanson, 2000). Таким чином, нам слід було на практиці оцінити прийнятність згаданих методик для синтезу біокон'югатів формату «антитіло – антитіло».

На рисунку 1 наведено результати відділення редукованих (одновалентних) МкАт до ПХ і залишків меркаптоетиламіну за допомогою гель-фільтрації на

сефадексі G-25 у процесі отримання кон'югату за допомогою NHS ефір-малеїмід-опосередкованого методу. Як видно із хроматограми, редуковані антитіла виходили з колонки у формі чіткого гомогенного за молекулярною масою піку. MEA, що не прореагував та який є меншим за своєю молекулярною масою, сходив із хроматографічної колонки дещо пізніше. Цікавими були результати очищення кон'югату, отриманого глутаральдегідним методом, гель-фільтрацією на сефакрилі S-300 (рис. 2). Отриманий кон'югат не був однорідним за молекулярною масою: у ньому виявлено щонайменше три групи кон'югованих молекул із близькими молекулярними масами. Аналогічні дослідження з кон'югатом, отриманим за допомогою періодатного методу, не проводилися, оскільки попередні дослідження вказували на отримання за даною методикою кон'югатів однорідного складу (Nikolaenko et al., 2005).

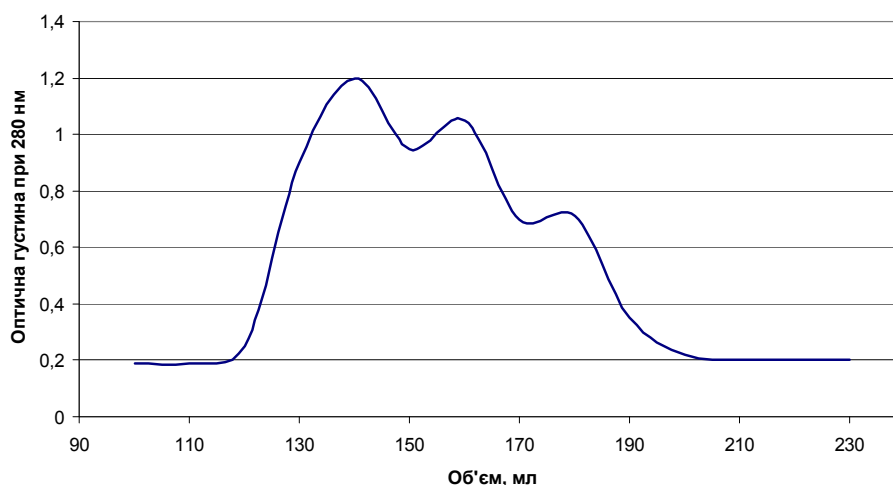


Рис. 2. Фінальне очищення кон'югату, отриманого глутаральдегідним методом, гель-фільтрацією на сефакрилі S-300

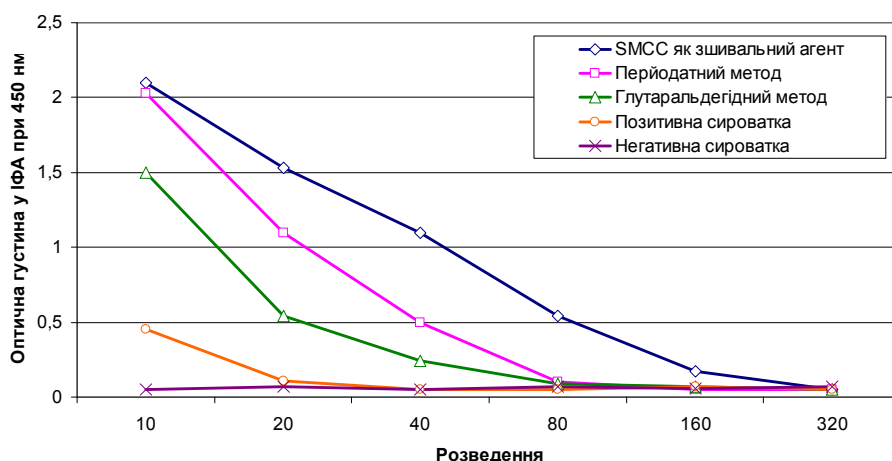


Рис. 3. Титрування синтетичних контролів, отриманих різними методами

Синтетичні ПК, отримані різними методами, оцінювали шляхом їх титрування в імуноферментному аналізі, призначеному для виявлення IgM-антитіл до цитомегаловірусу людини. Дане дослідження проводили порівняно з титруванням високотитражної сироватки з умістом IgM, специфічних до ЦМВ, а також негативної сироват-

ки (рис. 3). Найкращим результатом характеризувався ПК, отриманий унаслідок використання SMCC як зшивального агента (NHS ефір-малеїмід-опосередкована кон'югація), спадання активності під час розведення ПК, отриманих іншими методами, відбувалося більш інтенсивно. Разом із тим, усі варіанти синтезованих ПК ха-

рактизувалися сприятливішим сигналом у ІФА, ніж високотитражна ІgM-позитивна сироватка.

Висновки

Теоретично обґрунтовано методологічні підходи до отримання синтетичних позитивних контролів для імуноферментного аналізу модифікації «ІgM-пастка»: NHS ефір-малеїмід-опосередкована кон'югація на прикладі SMCC як зшивального агента, періодатний і глутаральдегідний методи біокон'югації. Кон'югати нормального ІgM людини та МкАт до ПХ, отримані за допомогою NHS ефір-малеїмід-опосередкованої кон'югації та періодатного методу, гомогенні за молекулярною масою; натомість кон'югат, що синтезується глутаральдегідним методом, містить щонайменше три групи біополімерів близької молекулярної маси. Синтетичні позитивні контролі, отримані різними методами, характеризуються вищим титром порівняно з високотитражною ІgM-позитивною сироваткою. Разом із тим, позитивний контроль, отриманий за допомогою SMCC, характеризується найкращим профілем титрування (повільнішим спаданням активності в ІФА під час його розведення).

Бібліографічні посилання

Filippovich, J.B., 1999. *Osnovy biohimii* [Fundamentals of Biochemistry]. Agar, Moscow (in Russian).

Galkin, O.Y., 2010. Approaches to the synthesis of conjugates for enzyme immunoassay test-systems and evaluation of their use for diagnostics of infectious diseases. *Ukr. J. Clin. Lab. Med.* 5(4), 54–60.

Galkin, O.Y., 2014. Parametry bioanalitichnoyi standartyzatsiyi zasobiv dlya serolohichnoyi diahnozyky [Parameters for bioanalytical standardization of medical devices for serological diagnostics]. *Materialy IV naukovo-praktychnoyi konferentsiyi "Suchasni dosyahnennya farmatsevtichnoyi tekhnolohiyi"* [Proc. 4th Sci. Conf. "Recent advances in pharmaceutical technology"]. Publishing House of the National University of Pharmacy, Kharkov (in Ukrainian).

Galkin, O.Y., Dugan, O.M., 2009. Porivnyannya skhem imunizatsiyi myshey liniyi Balb/c dlya oderzhannya monoklon-

al'nykh antytil do ІgM lyudyny [Comparison of immunization charts of Balb/c mice to produce monoclonal antibodies to human ІgM]. *Immunol. Allergol.* 1, 68–73 (in Ukrainian).

Harlow, E., Lane, D., 1988. *Antibodies. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor, New York.

Hermanson, G.T., 2000. *Bioconjugate techniques.* Academic Press, San Diego.

Holmes, D.A., Purdy, D.E., Chao, D.Y., Noga, A.J., Chang, G.J., 2005. Comparative analysis of immunoglobulin m (ІgM) capture enzyme-linked immunosorbent assay using virus-like particles or virus-infected mouse brain antigens to detect ІgM antibody in sera from patients with evident flaviviral infections. *J. Clin. Microbiol.* 43(7), 3227–3236.

Hunsperger, E.A., Yoksan, S., Buchy, P., Nguyen, V.C., Sekaran, S.D., Enria, D.A., Pelegrino, J.L., Vázquez, S., Art-sob, H., Drebot, M., Gubler, D.J., Halstead, S.B., Guzmán, M.G., Margolis, H.S., Nathanson, C.M., Rizzo, L.N.R., Bes-soff, K.E., Kliks, S., Peeling, R.W., 2009. Evaluation of commercially available anti-dengue virus immunoglobulin M tests. *Emerg. Infect. Dis.* 15(3), 436–440.

Johnstone, A., 1997. *Immunochemistry 2: A practical approach.* IRL Press, Oxford.

Nikolaenko, I.V., Galkin, A.J., Raevskaja, G.E., Donskaja, E.S., Kas'janenko, T.V., Tereshhenko, M.I., Spivak, N.J., 2005. Poluchenie monoklonal'nyh antitel k Fc-fragmentu ІgG cheloveka i primeneniye immunofermentnyh konjugatov na ih osnove [Preparation of monoclonal antibodies to Fc-fragments of human ІgG and usage of its conjugates in immunoassays]. *Klinicheskaja Laboratornaja Diagnostika* 11, 8–11 (in Russian).

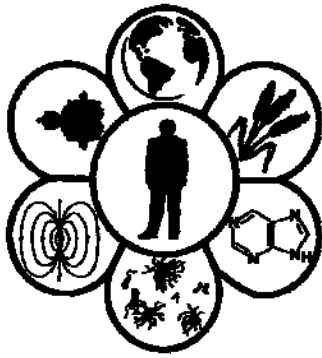
Senchuk, A.J., Dubossarskaja, Z.M., 2004. *Perinatal'nye infekcii. Prakticheskoe posobie* [Perinatal infection. A practical guide]. MIA, Moscow (in Russian).

Tijssen, P., 1985. Practice and theory of enzyme immunoassays. *Lab. Tech. Biochem. Mol. Biol.* 15, 329–384.

Vazquez, S., Hafner, G., Ruiz, D., Calzada, N., Guzman, M.G., 2007. Evaluation of immunoglobulin M and G capture enzyme-linked immunosorbent assay Panbio kits for diagnostic dengue infections. *J. Clin. Virol.* 39(3), 194–198.

Zupanec, I.A., Misjureva, S.V., Propisnova, V.V., 2005. *Klinicheskaja laboratornaja diagnostika: Metody issledovaniya* [Clinical laboratory diagnostics: Research methods]. Publishing House of the National University of Pharmacy, Kharkov (in Russian).

Надійшла до редколегії 15.10.2014



УДК 579:61

Фаготип і чутливість до антибіотиків плівкотвірних штамів *Staphylococcus aureus*, виділених із дихальних шляхів

О.С. Воронкова, О.А. Сірокваша, Т.М. Шевченко, А.І. Вінніков

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпропетровськ, Україна

Проведено фаготипування штамів стафілококів, здатних до утворення біоплівки. В експерименті встановлено, що здатністю до утворення біоплівки володіли 61,5% виділених штамів золотистого стафілокока. Чутливість до фагів із Міжнародного набору проявляли 53,8% досліджених штамів золотистого стафілокока. Із штамів, що давали позитивну відповідь, 64,3% – чутливі до одного з фагів, до двох і трьох фагів чутливі 21,4% та 14,3% відповідно. Виділені штами чутливі до таких фагів: 81 – 42,9%, 75 – 35,7%, 47 та 53 – по 28,6%. Усі випадки виявлення чутливості до фага 47 збігалися зі здатністю утворювати біоплівку та стійкістю до еритроміцину, амоксициліну та тетрацикліну та у 50% випадків – зі стійкістю до гентаміцину, у 25% – до ципрофлоксацину. Серед неплівкотвірних штамів чутливих до фага 47 не було.

Ключові слова: біоплівка; фаготипування; діагностичні препарати бактеріофагів; стафілококи; стійкість до антибіотиків

Phage type and sensitivity to antibiotics of *Staphylococcus aureus* film-forming strains isolated from airway mucosa

O.S. Voronkova, O.A. Sirokvasha, T.N. Shevchenko, A.I. Vinnikov

Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Dnipropetrovsk, Ukraine

Today film-forming strains of bacteria play very important role in clinical pathology. Staphylococci are ones of most dangerous of them. This bacteria can determine different pathological processes, for example, complication of airway mucosa. The ability to form a biofilm is one of the main properties of nosocomial strains. These strains should be monitored and their carriers are to be properly treated. To determine the origin of staphylococci strains we used bacteriophages from the International kit. The aim of research was to determine the phage type of staphylococci film-forming strains, that were isolated from naso-pharyngeal mucosa. Phage typing has been carried out for 16 film-forming strains of *S. aureus*. To solve this problem, we used the International phage kit by Fisher's method. As a result, sensitivity to phages from the International kit showed 53.8% of studied strains of *S. aureus*. 64.3% of sensitivity strains were lysed by one of the phage, 21.4% – were by two of the phages, 14.3% – by three of the phages. Isolates were sensitive to phages: 81 – 42.9%, 75 – 35.7%, 28.6% were sensitive to phages 47 and 53. All cases of detection of sensitivity to phage 47 coincided with the ability to form biofilm. Among non-film-forming strains there was no sensitive strains for this phage. Film-forming strains resist to erythromycin (62.5%), ciprofloxacin (43.8%), gentamicin (56.3%), tetracycline (87.5%), amoxicillin (93.8%), and cefuroxime (37.5%). All cases of sensitivity to phage 47 coincided with resistance to erythromycin, amoxicillin and tetracycline. For two of these strains, we also defined resistance to gentamicin and for one of them – to ciprofloxacin. Results of research allowed to relate the bacterial cultures for determining the type. This may have implications for studying of film-forming ability, because surface structures of bacterial cell take place in this process. Belonging of an isolate to specific phage type may indicate possible differences in the structure of the cell wall, composition of the cytoplasmic membrane, receptors, etc. So, phage typing may be used as one of tests to study film-forming processes. Besides, phage typing can be helpful in finding of the source and modes of transmission of nosocomial strains of bacteria. Given the increased level of antibiotic resistance among film-forming strains of staphylococci, the importance of this monitoring is indisputable, because spreading of these strains may cause the failure of therapy.

Keywords: biofilm; phage typing; diagnostic bacteriophages kit; staphylococci; antibiotic resistance

Вступ

Стафілококи посідають сьогодні одне з провідних місць у структурі захворюваності, зумовленої умовно-патогенними мікроорганізмами. Вони є одними з найчастіше виявлених бактерій як у здорових осіб (носійство), так і серед пацієнтів лікарняних закладів. Носійство стафілококів майже здоровими людьми та особливо медичним персоналом вельми поширене, але воно майже не реєструється та виявляється лише при травмах і зниженні захисних сил макроорганізму (Murchan and Carter, 2000; Savchuk, 2003; Paul-Satyaseela et al., 2011; Kaimal et al., 2012; Falova et al., 2013).

Серед причин стафілококових захворювань можна відзначити численні епідеміологічні аспекти, пов'язані зі збільшенням контингенту осіб зі зниженою опірністю організму, концентрацією міського населення, внутрішньоликарняною циркуляцією полірезистентних штамів, дефектами у тактиці антибіотикотерапії тощо (Labinskaia and Volina, 2008; Bondarenko, 2011). У зв'язку із цим необхідний моніторинг штамів стафілококів, які циркулюють у лікарняних закладах та поза ними, що має на меті виявлення джерел поширення цих бактерій (Kali et al., 2013). Для моніторингу штамів використовують Міжнародний набір фагів для типування золотистого стафілокока (Blair and Williams, 1961; Akimkin et al., 2010).

Певної значущості питання фаготипування набуває у зв'язку з поширенням серед клінічних ізолятів стафілококів, здатних до утворення біоплівки. Перебування в останньому стані надає штамам переваг виживаності за негативних умов оточення, особливо за умов використання з лікувальною метою антибіотиків. У структурі біоплівки бактерії набувають ознак підвищення резистентності до антимікробних препаратів (Fujisawa and Ishihara, 1968; Olson et al., 2002; Ilyina, 2004; Mehndiratta et al., 2010). Фаготипування може допомогти вирішити проблему встановлення джерела поширення стафілококів, що дозволить розробити ефективні заходи санації (Pantucek et al., 2004).

Відповідно до цього, метою даної роботи було визначити фаготипи штамів золотистого стафілокока, здатних до утворення біоплівки, виділених із верхніх дихальних шляхів.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження зі штамми стафілококів проводили на базі лабораторії мікробіології НДІ гастроентерології НАМН України (м. Дніпропетровськ). Матеріал від здорових осіб відбирали з носоглотки та зіва двома стерильними ватними тампонами промислового виробництва. Ідентифікацію стафілококів проводили за ознаками, наведеними у Визначнику бактерій Берджі (Holt et al., 1994).

Для досліджень відбирали всі зразки, що містили грампозитивні коки (Volkov, 1999; Labinskaia and Volina, 2008). За умов виявлення останніх методом мікроскопії висівали матеріал штрихом на живильні середовища: сольовий агар, 5% кров'яний агар, цукровий бульйон і

середовище для контролю стерильності. Інкубували за +37 °С протягом 18–24 годин. У разі виявлення росту проводили відсівання окремих колоній на жовтково-сольовий агар (About unification..., 1985; Holt et al., 1994). Із колоній відбирали матеріал для подальшої ідентифікації. Належними до роду *Staphylococcus* вважали бактерії, що давали ріст на середовищі Чистовича, ферментували глюкозу в анаеробних умовах з утворенням кислоти. Для встановлення належності до *S. aureus* проводили тест на виявлення плазмокоагулази та ферментацію маніту в анаеробних умовах з утворенням кислоти. За наявності плазмокоагулази та утворення кислоти з маніту при анаеробіозі штамп вважали належним до вказаного виду.

Для визначення здатності до формування біоплівки чисту культуру виділеного штаму висівали в лунки імунологічного планшета у кількості не менше 10^5 КУО/мл. Планшет інкубували за +37 °С протягом 3 діб. Якщо у цей період формувалася біоплівка (поверхневий чи придонний ріст у лунці, що давав плівку, яка у разі видалення середовища осідала на стінках) штамп вважали плівкотвірним. На один 96-лунковий імунологічний планшет засівали по 3 комірки для кожного штаму. Відповідь про здатність до плівкоутворення вважали позитивною, якщо принаймні у одній лунці з трьох формувалася плівка протягом 72 годин.

Вивчення чутливості до антибіотиків проводили відповідно до наказу МОЗ України «Про затвердження методичних вказівок щодо визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів» (Approval ..., 2007). Із добової культури готували суспензію з умістом клітин 1×10^6 кл./мл. На стерильну чашку з МПА наносили 0,1 мл отриманої суспензії. Шпателем розтирали краплю по поверхні для рівномірного розподілу матеріалу. Стерильним пінцетом диски з антибіотиками розкладали по поверхні живильного середовища, засіяного культурою стафілокока. На одну чашку уміщували 6 дисків з антибіотиками еритроміцином, ципрофлоксацином, гентаміцином, тетрацикліном, амоксициліном і цефуроксимом. Облік результатів проводили через 24 години після розкладання дисків. Чутливість штаму визначали на основі вимірювання зони затримання росту навколо диска.

Для визначення чутливості штамів до бактеріофагів застосовували метод Фішера. Готували суспензію клітин чистої добової агарової культури вивчених ізолятів, яка містила 1×10^5 кл./мл. Отриману суспензію у об'ємі 0,5 мл наносили на поверхню добре підсушеного МПА та розтирали шпателем. Підсушували за кімнатної температури протягом 20–30 хвилин. На отриманий газон із нанесеною культурою інсуліновим шприцом по одній краплі (близько 0,05 мл) наносили зразки препаратів фагів. Після підсихання крапель фагів чашки інкубували у термостаті за +37 °С протягом 18–24 годин. Наявність зони лізису свідчила про чутливість вивченого штаму до фага (Blair and Williams, 1961; Dzahurov and Rezerov, 1995; Labinskaia and Volina, 2008).

Для фаготипування використовували фаги 42E, 42D, 47, 53, 55, 75 та 81 зі стандартного Міжнародного набору для фаготипування. Позитивну оцінку чутливості до фагів визначали на підставі трьох окремих досліджень.

Результати та їх обговорення

За наслідками ідентифікації ізолятів бактерій, виділених від осіб із хронічним носійством, визначено, що 26 штампів належали до *Staphylococcus aureus*. Із них 16 (61,5%) штампів здатні до утворення біоплівки. Для цих штампів досліджено фаговий профіль (табл.).

Таблиця

Фаготипи виділених штамів *Staphylococcus aureus*

| Штам <i>S. aureus</i> | Фаговий профіль |
|-----------------------|-----------------|
| 1 | 47 |
| 2 | 53, 55 |
| 3 | 47, 75, 81 |
| 4 | 81 |
| 5 | 81 |
| 6 | – |
| 7 | – |
| 8 | – |
| 9 | 53 |
| 10 | 47, 75, 81 |
| 11 | 47 |
| 12 | – |
| 13 | 53 |
| 14 | – |
| 15 | – |
| 16 | – |

До застосованих фагів проявили чутливість 9 (56,3%) штамів золотистого стафілокока, решта – 7 (43,7%) – не чутливі до жодного з використаних фагів. Із штамів, що давали позитивну відповідь, 64,3% чутливі до одного з фагів, до двох та трьох фагів чутливі 21,4% та 14,3% відповідно. Найчастіше виділені штами виявлялися чутливими до фагів: 81 – 42,9%, 75 – 35,7%, 47 та 53 – по 28,6%. До фагів 42E та 42D чутливих штамів не визначено.

За низкою даних (Ekmuzheva and Khadzegova, 2003; Falova et al., 2013) фаговий профіль і взагалі сама можливість фаготипування культур можуть відрізнятися залежно від того, звідки вони виділені. Вказується на відмінності згаданих ознак для штамів стафілококів, виділених із поверхні шкіри здорових осіб і осіб із дерматитами (Falova et al., 2013). Розбіжність у відсотках штамів, що можуть бути фаготиповані, невелика, натомість фаговий профіль для штамів стафілококів, виділених від осіб із дерматитами, значно більший. Крім того, відмічено, що найбільший відсоток штамів типовано фагами третьої групи. Подібні ж тенденції описано і для штамів стафілококів, виділених із піхви здорових жінок (Ekmuzheva and Khadzegova, 2003). У наших дослідженнях також показано, що більшість штамів типувалися фагами третьої групи: 7 з 9 штамів (77,8%) типувалися принаймні одним із фагів групи 3. До змішаної групи належали 2 штами, які одночасно типувалися більше ніж 2 фагами, і один штам взаємодіяв із фагом 55, належним до другої групи. Із фагом четвертої групи – 42D – реакції не було.

Усі випадки виявлення чутливості до фага 47 збігалися зі здатністю утворювати біоплівку, жоден із неплівкотвірних штамів не був чутливим до цього фага. Інші фаги викликали лізис у штамів як здатних, так і не здатних до утворення біоплівки. У складі біоплівки бактерії набувають ознак підвищеної резистентності до

антибіотиків. У нашому дослідженні показано, що виділені плівкотвірні штами були стійкими до еритроміцину (62,5%), ципрофлоксацину (43,8%), гентаміцину (56,3%), тетрацикліну (87,5%), амоксициліну (93,8%) та цефуроксиму (37,5%). Всі випадки визначення чутливості до фага 47 збігалися з резистентністю щонайменше до трьох із застосованих антибіотиків. Усі чотири чутливі до вказаного фага штами стійкі до еритроміцину, амоксициліну та тетрацикліну. Для двох із цих штамів також визначено стійкість до гентаміцину, а для одного – до ципрофлоксацину. Отримані дані частково погоджуються з матеріалами інших дослідників (Agunava et al., 2013): вказується на зв'язок між чутливістю до фага 47 та стійкістю до антибіотиків, що збігається з отриманими нами даними, натомість у нашому дослідженні взагалі не визначено чутливості до фага 42E, яка також відмічена для антибіотикорезистентних штамів стафілококів у вказаній роботі.

За ознакою специфічності виділяють полівалентні бактеріофаги, які лізують культури з однієї родини або роду бактерій, моновалентні (монофаги) – лізують культури тільки одного виду бактерій, а також типові бактеріофаги, які вирізняються найвищою специфічністю та здатні викликати лізис тільки певних типів (варіантів) бактеріальної культури всередині виду бактерій. Із цього погляду, зроблений нами аналіз штамів, відповідно до їх специфічності, дозволяє чітко віднести культури до певних фаготипів. Це може вказувати на можливу наявність відмінностей у структурі клітинної стінки, складі цитоплазматичної мембрани, рецепторів тощо, що, у свою чергу, може мати ключове значення для вивчення формування біоплівок. В останньому процесі важливу роль відіграють саме поверхневі структури бактеріальної клітини. Отже, тест на фаготип може стати одним із тестів для відстеження динаміки процесу плівкоутворення.

За допомогою методу фаготипування можна встановити джерело та шляхи передачі інфекційного захворювання, тобто провести його епідеміологічний аналіз, оскільки він дозволяє порівнювати фаготип (фаговари) чистих культур бактерій, виділених у ході бактеріологічного дослідження від хворого й осіб що оточують його, можливих бактеріоносіїв (Pantucek et al., 2004; Labinskaia and Volina, 2008). Подібне дослідження може стати в нагоді під час розробки методів виявлення та санації носійства нозокоміальних штамів серед персоналу лікувально-профілактичних закладів. Особливу значущість цей моніторинг має щодо здатних до плівкоутворення штамів стафілококів, поширення яких зумовлює зростання рівня резистентності до антибіотиків і спричинює невдачі терапії (Donlan and Costerton, 2002; Mehndiratta et al., 2010).

Висновки

Здатність до плівкоутворення виявлена у 16 (61,5%) штамів золотистого стафілокока, виділених із верхніх дихальних шляхів людей. 64,3% досліджених штамів золотистого стафілокока чутливі до одного з фагів із Міжнародного набору для фаготипування стафілококів,

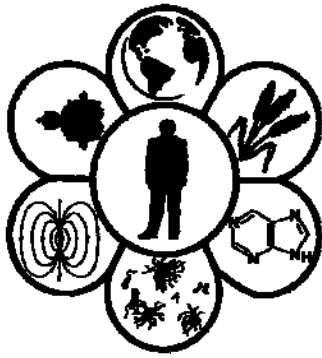
до двох та трьох фагів чутливі 21,4% та 14,3% відповідно. Чутливість досліджених штамів показана до фагів: 81 – 42,9%, 75 – 35,7%, 47 та 53 – по 28,6%. До фагів 42E та 42D чутливих штамів не визначено. Всі випадки виявлення чутливості до фага 47 збігалися зі здатністю утворювати біоплівку.

Виділені плівкотвірні штами стійкі до еритроміцину (62,5%), ципрофлоксацину (43,8%), гентаміцину (56,3%), тетрацикліну (87,5%), амоксициліну (93,8%) та цефуроксиму (37,5%). Усі випадки визначення чутливості до фага 47 збігалися з резистентністю до еритроміцину, амоксициліну та тетрацикліну. Для двох із чутливих до фага 47 штамів також визначено стійкість до гентаміцину, а для одного – до ципрофлоксацину.

Бібліографічні посилання

- Akimkin, V.H., Darbeeva, O.S., Kolkov, V.F., 2010. Bakteriophagy: Istoricheskie i sovremennye aspekty ih primeneniia: Opit i perspektivi [Bacteriophages: Historical and contemporary aspects of their application: Experience and prospects]. *Clinical Practice* 4, 48–54 (in Russian).
- Arunava, K., Selvaraj, S., Umadevi, S., Shailesh, K., Noyal, M., Sreenivasan, S., Joshy, M.E., 2013. Bacteriophage types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a tertiary care hospital. *Australas. Med. J.* 6(10), 496–503.
- Blair, J.E., Williams, R.E.O., 1961. Phage typing of staphylococci. *Bull WHO* 24, 771–778.
- Bondarenko, V.M., 2011. Rol uslovno-patogennih bakterii pri chronicheskikh vospalitelnykh processakh razlichnoi lokalizatsii [The role of opportunistic bacteria in chronic inflammatory processes of different localization]. *Triada, Tver* (in Russian).
- Donlan, R.M., Costerton, J.W., 2002. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15(2), 167–193.
- Dzahurov, S.H., Rezepov, F.F. (Eds.), 1995. Spravochnik po primneniiu bakteriinih i virusnih preparatov [Handbook of bacterial and viral preparations application]. *Medicine, Moscow* (in Russian).
- Ekmuzheva, D.Z., Khadzegova, S.B., 2003. Kharakteristika normalnoy mikroflory vlagalisha u zdorovykh zhenshin reproduktivnogo vozrasta [Characteristic of the normal vaginal microflora in healthy women of reproductive age]. *Uspekhi Sovremennogo Estestvoznaniya* 6, 50–51.
- Falova, O.E., Potaturkina-Nesterova, N.I., Ilina, E.N., 2013. Vzaimosviaz vnutrividovogo raznobraziia i geneticheskikh determinant patogenosti stafilokokkov kozhi [Interrelation of intraspecific variety and genetic determinants of skin's staphylococcus pathogenicity]. *Fundamental Research* 12, 131–134 (in Russian).
- Fujisawa, H., Ishihara, K., 1968. Penicillin resistance correlated with phage types in *Staphylococcus aureus*. *Japan. J. Microbiol.* 12(1), 1–6.
- 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 sushestvovaniia bakterii v okruzhaiushei srede i orhanisme hoziaina: Fenomen, heticheskii kontrol 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]. *Genetic.* 40, 1–12 (in Russian).
- Kaimal, S., D'Souza, M., Sistla, S., Parija, S.C., 2012. Phage typing in dermatitis cruris pustulosa et atrophicans: Does staphylococcal carrier status have a role? *Int. J. Dermatol.* 51(11), 1335–1339.
- Kali, A., Stephen, S., Sivaraman, U., Kumar, S., Joseph, N.M., Srirangaraj, S., Easow, J.M., 2013. Bacteriophage types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a tertiary care hospital. *Australas. Med. J.* 6(10), 496–503.
- Labinskaia, A.S., Volina, Y.H. (Eds.), 2008. *Rukovodstvo po medicinskoj mikrobiologii. Obshaia i sanitarnaia mikrobiologia* [Manual of medical microbiology. General and sanitary microbiology]. *Binom, Moscow* (in Russian).
- Mehndiratta, P.L., Gur, R., Saini, S., Bhalla, P., 2010. *Staphylococcus aureus* phage types and their correlation to antibiotic resistance. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 53(4), 738–741.
- Murchan, S., Carter, M., 2000. Strain identities of phage nontypable MRSA in the UK. *J. Hosp. Infect.* 46, 157–158.
- Ob unifikatsii mikrobiologicheskikh (bakteriologicheskikh) metodov issledovaniia, primeniaemih v kliniko-diahnosticheskikh laboratoriiakh lechebno-profilacticheskikh ucherezhdenii, 1985 [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).
- Olson, M.E., Ceri, H., Morck, D.W., Buret, A.G., Read, R.R., 2002. Biofilm bacteria: Formation and comparative susceptibility of antibiotics. *Can. J. Vet. Res.* 66(2), 86–92.
- Pantucek, R., Doskar, J., Ruzickova, V., Kasperek, P., Oracova, E., Kvardova, V., Rosypal, S., 2004. Identification of bacteriophage types and their carriage in *Staphylococcus aureus*. *Arch. Virol.* 149, 1689–1703.
- Paul-Satyaseela, M., Belkum, A., Shivannavar, C.T., Gaddad, S.M., 2011. Comparison of capsular typing of *Staphylococcus aureus* with bacteriophage typing: A study in Gulbarga, India. *Indian J. Med. Microbiol.* 51(3), 359–362.
- Pro zatverdzhennia metodichnih vkazivok schodo viznachennia chutlivosti mikroorganizmiv do antibakterialnih preparativ, 2007 [Approval of guidelines for determining the sensitivity of microorganisms to antibiotics. The order № 167 (2007)]. *Ministry of Health of Ukraine, Kyiv* (in Ukrainian).
- Savchuk, T.D., 2003. Stafilokokkovaia infektsiia [Staphylococcal infections]. *Medicine, Moscow* (in Russian).
- Volkov, I.I., 1999. Sovershenstvovanie mikrobiologicheskoi diahnostiki stafilokokkovih infektsii i ekolohicheskie aspekty ih vzbuditelei [Improving the microbiological diagnosis of staphylococcal infections and environmental aspects of their pathogens] *Autoref. of candidate dissertation*. Available from <http://nature.web.ru/db/msg.html?mid=1163020>.

Надійшла до редакції 22.10.2014



УДК 612.351.11-06:616.36-099:615.281.8:546.766]-085.246.2-092.9

Структура та функцій печінки в умовах хромово-ізоніазидо-рифампіцинового ураження щурів після застосування сорбексу

Н.І. Бурмас, Л.С. Фіра

ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України», Тернопіль, Україна

Ураження щурів різного віку ізоніазидом (0,05 г/кг), рифампіцином (0,25 г/кг) та біхроматом калію (3 мг/кг) спричинило порушення активності маркерних ферментів печінки (АлАТ, АсАТ і ЛФ). Установлено підвищення активності амінотрансфераз у сироватці крові та їх зниження у печінці, що є підтвердженням токсичної дії сполук Cr^{6+} і туберкулостатиків на організм тварин різного віку, і супроводжується порушенням проникності плазматичних мембран гепатоцитів, зумовлює потрапляння значної кількості ензимів у кров. Це викликало розвиток запального процесу у печінці, що підтверджується порушенням жовчоутворення в ній (збільшення вмісту ЗБ та ЖК у сироватці крові). Найбільш виражені метаболічні порушення за даного ураження відмічені в організмі тварин статевозрілого та старечого віку порівняно зі зрілими тваринами. Ентеросорбент сорбекс після уведення в організм викликав нормалізацію цих показників. Максимальний коригувальний вплив на активність ензимів сорбекс проявив у печінці зрілих тварин в останній термін дослідження. Застосування ентеросорбенту викликало зниження вмісту ЗБ і ЖК у сироватці крові уражених тварин, що може вказувати на відновлення синтетичної та жовчотвірної функцій печінки.

Ключові слова: ізоніазид; рифампіцин; сполуки шестивалентного хрому; печінка; сорбекс

Structure and function of the liver in conditions of chrome-isoniazid-rifampicin affection of rats after applying of sorbex

N.I. Burmas, L.S. Fira

HSEI "I.Y. Horbachevsky Ternopil State Medical University of MPH of Ukraine", Ternopil, Ukraine

The aim of this research was to assess the activity of marker enzymes of the liver and its biliary formation function in conditions of the affection of animals by hexavalent chromium compounds, isoniazid and rifampicin, after applying of sorbex. The experimental affection of rats of different age was carried in the conditions of combined injection of hexavalent chromium compounds (solution of potassium dichromate, 3 mg/kg), isoniazid (0.05 g/kg) and rifampicin (0.25 g/kg) during the 7th and 14th days, and sorbex enterosorbent was introduced in quantity of 150 mg/kg. The activity of marker enzymes of the liver was evaluated by the activity of alanine and aspartate aminotransferases (ALT and AST) and alkaline phosphatase (ALP). The state of biliary formation function of the liver was evaluated by the content of total bilirubin (TB) and bile acids (BA) in blood. The most significant changes in ALT activity were observed in the liver of old animals by the combined effects of the abovementioned xenobiotics – the activity of ALT was decreased by the end of the experiment by 58% compared with the animals of intact control. Using of sorbex led to decreasing in blood serum and increasing in the liver of affected animals of the different age of ALT activity throughout the experiment. AST activity in blood serum increased, and it was the highest in old animals upon chrome-isoniazid-rifampicin affection on the 14th day of the research. With the use of sorbex, there was a tendency to normalization of this index in blood serum and liver of affected animals on the 7th day from the beginning of the experiment. It was found that the largest increase in ALP took place in blood serum of immature animals by the combined effects of toxicants. In the liver of affected animals the activity of ALP decreased throughout the experiment in all age groups of animals. Maximum corrective effect on the activity of ALP was shown by the enterosorbent in the liver of mature animals on 14th day of the experiment and this index was equal to 99% compared with intact animals. During the affection of animals by toxins, we observed the increase in the content of total bilirubin and bile acids, especially in rats of

ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України», вул. Майдан Волі, 1, Тернопіль, 46001, Україна

*HSEI "Ternopil State Medical University by I.Y. Horbachevsky of MPH of Ukraine", Freedom Square str., 1, 46001, Ternopil, Ukraine
Tel.: +38-097-612-34-34. E-mail: natashenka-burmas@rambler.ru*

immature age and mature age. After the injection of sorbex enterosorbent in the organism of animals, normalization of its indicators on the 7th day from the beginning of the experiment was established. It is proved that sorbex has normalized the activity of marker enzymes of the liver and its biliary formation function in the organism of affected animals. Therefore, it can be used as an enterosorbent in the conditions of chemical affection on the background of drug-induced hepatitis.

Keywords: isoniazid; rifampicin; hexavalent chromium compounds; liver; sorbex

Вступ

До широко розповсюджених і небезпечних ксенобіотиків належать солі важких металів (Porter et al., 2005). Отруєння ними може спричинити порушення метаболічних процесів, важкі захворювання (Duffus, 2002; Hantson et al., 2005). Згідно з деякими прогнозами, в майбутньому сполуки важких металів як загроза екологічному стану довкілля можуть вийти на перше місце, випереджаючи в цьому відношенні відходи атомних станцій та органічні антропогенні забруднення (Banfalvi, 2011). Тому вивчення молекулярних основ хімічного ураження організму набуло загальнобіологічного та медичного значення.

Нині багато людей зайняті у виробничій сфері, пов'язані зі сполуками шестивалентного хрому (кольорова металургія, лакофарбова та деревообробна промисловості тощо), що є фактором професійного ризику розвитку патологій, пов'язаних саме із цим металом (Proctor et al., 2002; Maeng et al., 2004; Hantson et al., 2005).

Важливими є проблема токсичного впливу протитуберкульозних препаратів на печінку, що спричинює розвиток медикаментозних гепатитів, дистрофічних процесів в органі, загострення хронічних захворювань, з одного боку, а з іншого – проблема негативного впливу захворювань печінки на ефективність антимікобактеріальних препаратів, спричинення геморагічних та інших ускладнень (Hussian et al., 2003; Maw et al., 2003; Yew et al., 2006). Найчастіше розвиток медикаментозних уражень печінки пов'язують із застосуванням ізоніазиду, рифампіцину, етіонаміду, піразинаміду (Preziosi, 2007; Santhosh et al., 2007). Гепатотоксичні ефекти за умов поєднаного впливу ізоніазиду та рифампіцину зумовлені тим, що метаболізм препаратів відбувається переважно у печінці, і це викликає білкову та жирову дистрофію гепатоцитів, їх ліпоїдну інфільтрацію (Manna, 2000; Pal et al., 2006).

Розвиток токсичних уражень організму, спричинених ксенобіотиками, супроводжується синдромом ендогенної інтоксикації, для усунення якого застосовують ентеросорбенти. Вони знижують ступінь ендотоксемії, поліпшують функціональний стан нирок, що дозволяє зменшити навантаження на печінку та зберегти її від ушкодження (Bondarev et al., 2008). Разом із цим, у сучасній медицині недостатньо висвітлено диференційований підхід до застосування ентеросорбентів за умов хімічного ураження на тлі медикаментозного гепатиту, відсутній підхід розробки методів гепатопротекції. Виходячи із цього, актуально з'ясувати активність маркерних ферментів печінки та її жовчотвірної функції в умовах ураження тварин сполуками шестивалентного хрому, ізоніазидом і рифампіцином після застосування сорбексу.

Матеріал і методи досліджень

Досліди проводили на білих безпородних щурах-самцях трьох вікових періодів: статевого дозрівання

(3-місячні тварини, масою 90–110 г), статеві зрілості (6-місячні тварини, масою 150–170 г) та старіння (тварини 18-місячного віку, масою 280–300 г), яких утримували на стандартному раціоні віварію Тернопільського державного медичного університету імені І.Я. Горбачевського.

Утримання тварин і маніпуляції з ними проводили згідно з положеннями статті 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21.02.2006 р. № 3447-IV, «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних і наукових цілей», «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», затверджених 20.09.2001 р. І Українським національним конгресом із біоетики, та з урахуванням положень, викладених у NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Guide ..., 2011).

Експериментальне ураження тварин здійснювалось за умов поєднаного уведення ізоніазиду, рифампіцину та сполук шестивалентного хрому. Ізоніазид та рифампіцин тварини отримували щодобово внутрішньошлунково у вигляді водного розчину в дозі 0,05 та 0,25 г/кг відповідно протягом 7 та 14 діб. Сполуки шестивалентного хрому вводили тваринам аналогічно у вигляді розчину біхромату калію в дозі 3 мг/кг. Сорбекс тварини отримували щоденно внутрішньошлунково у вигляді крохмальної суспензії у дозі 150 мг/кг маси тіла протягом усього експерименту.

Тварин кожного віку поділили на три групи: 1 – контрольні щури (уводили фізіологічний розчин), 2 – тварини, які уражалися поєднаним впливом $K_2Cr_2O_7$, ізоніазидом і рифампіцином, 3 – уражені тварини (поєднана дія ксенобіотиків), яким протягом експерименту вводили ентеросорбент сорбекс.

Евтаназію тварин проводили з використанням тіопенталу натрію на 7-му та 14-ту добу після останнього уведення токсикантів. Дослідженням піддавали гомогенат печінки та сироватку крові. Кров забирали із серця тварин, яку центрифугували при 3 000 об./хв протягом 30 хв. Отриману сироватку крові (надосадову рідину) використовували для проведення досліджень. Відібрану печінку (250 мг) використовували для отримання гомогенату методом диференційного гомогенізування, яке проводили після попередньої перфузії з 2,5 мл фізіологічного розчину.

Активність маркерних ферментів печінки оцінювали за активністю аланін- і аспартатамінотрансфераз (АлАТ, АсАТ) і лужної фосфатази (ЛФ) у сироватці крові та гомогенаті печінки. Визначення АлАТ проводили шляхом амінування 2-оксоглутарової кислоти L-аланіном, яке відбувається під дією аланінамінотрансферази (утворюються L-глутамінова та піровиноградна кислоти). За взаємодії ПВК із 2,4-динітрофенілгідразиним у лужному середовищі утворюються 2,4-динітрофенілгідрозони, які мають високий коефіцієнт молярної екстинції, тому оптична щільність їх, яка реєструється на ФЕКу, прямо пропорційна активності ферменту. Розрахунок активності ферменту проводили за калібрувальним

графіком, побудованим за вмістом ПВК, і виражали в мкмоль/(л•год) (Reitman, 1957). Визначення АсАТ базувалося на вимірюванні оптичної густини 2,4-нітрофенілгідразонів 2-оксоглютарової та піровиноградної кислот у лужному середовищі. Оскільки гідразон піровиноградної кислоти має вищий коефіцієнт молярної екстинкції, спостерігається пряма залежність оптичної густини реакційного розчину від активності ферменту. Розрахунок активності фермента проводили за калібрувальним графіком, побудованим за вмістом ПВК і виражали в мкмоль/(л•год) (Reitman, 1957). Визначення активності лужної фосфатази ґрунтувалося на властивості ферменту гідролізувати ефірний зв'язок у β-гліцерофосфаті з відщепленням фосфатної кислоти. Фосфор визначали колориметричним методом за реакцією з молібденовим реактивом за присутності відновника ейконогену або аскорбінової кислоти. Продукт реакції – молібденовий синій, інтенсивність забарвлення якого пропорційна кількості фосфору у пробі (Kind, 1954).

Стан жовчотвірної функції печінки у тварин оцінювали за вмістом загального білірубину (ЗБ) і жовчних кислот (ЖК) у сироватці крові. Вміст ЗБ визначали за присутності кофеїнового реактиву, який із діазотованою сульфаніловою кислотою утворює азобілірубін рожево-фіолетового кольору. Інтенсивність забарвлення дослідного розчину прямо пропорційна концентрації загального білірубину у пробі. Розрахунок концентрації загального білірубину у сироватці крові проводили за калібрувальним графіком. Концентрацію вираховували в мкмоль/л (Kolb and Kamyshnikov, 1982). Визначення

вмісту ЖК базувалося на реакції утворення забарвлених продуктів конденсації у разі взаємодії жовчних кислот з оксиметилфурфуролом. Останній утворюється з фруктози, що є продуктом гідролізу внаслідок додавання до сахарози концентрованої сульфатної кислоти. Розрахунок вмісту жовчних кислот проводили за калібрувальним графіком, побудованим за вмістом таурохолевої кислоти, та виражали в г/л (Kolb and Kamyshnikov, 1982).

Статистичну обробку даних проводили у пакеті Statistica 6.0: розраховували середні величини, їх похибки, відмінності вибірових середніх оцінювали за критерієм Ст'юдента (Larach et al., 2000). Зміни вважали достовірними за $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення

На 14-ту добу експерименту відмічене зростання активності АлАТ (табл. 1) у сироватці крові всіх вікових груп тварин, уражених протитуберкульозними препаратами та біхроматом калію. Активність даного ензиму у статевонезрілих тварин у 2,9 раза перевищувала таку у контрольній групі, у 2,5 раза – у статевозрілих тварин і у 3,2 раза – у тварин старечого віку. Найбільші зміни активності АлАТ відмічено у печінці останніх за поєднаної дії вищевказаних ксенобіотиків – активність АлАТ у них зменшилась до кінця експерименту на 58% ($P < 0,05$), тоді як у статевонезрілих – на 55%, у статевозрілих – на 45% порівняно з інтактними тваринами.

Таблиця 1

Активність АлАТ у сироватці крові (мкмоль/(л•год)) та печінці (мкмоль/(кг•год)) тварин, уражених $K_2Cr_2O_7$, ізоніазидом і рифампіцином після уведення сорбексу ($M \pm m$)

| Матеріал | Група тварин | Вікова група тварин | | | | | |
|-----------------|---------------------------------------|-------------------------|---------------|---------------|---------------|----------------|---------------|
| | | статевонезрілі | | статевозрілі | | старечого віку | |
| | | строк дослідження, доба | | | | | |
| | | 7-ма | 14-та | 7-ма | 14-та | 7-ма | 14-та |
| Сироватка крові | інтактний контроль, n = 6 | 0,83 ± 0,05 | | 2,96 ± 0,18 | | 2,34 ± 0,15 | |
| | уражені токсикантами, n = 6 | 2,21 ± 0,12* | 2,38 ± 0,14* | 4,69 ± 0,19* | 7,46 ± 0,42* | 5,87 ± 0,30* | 7,57 ± 0,26* |
| | уражені токсикантами + сорбекс, n = 6 | 1,06 ± 0,08** | 1,20 ± 0,10** | 2,69 ± 0,18** | 3,13 ± 0,23** | 3,01 ± 0,16** | 3,09 ± 0,18** |
| Печінка | інтактний контроль, n = 6 | 5,40 ± 0,12 | | 8,30 ± 0,21 | | 6,08 ± 0,33 | |
| | уражені токсикантами, n = 6 | 3,18 ± 0,22* | 2,42 ± 0,12* | 5,78 ± 0,31* | 4,54 ± 0,21* | 3,17 ± 0,23* | 2,57 ± 0,14* |
| | уражені токсикантами + сорбекс, n = 6 | 3,81 ± 0,18 | 4,38 ± 0,27** | 7,69 ± 0,27** | 7,99 ± 0,27** | 4,94 ± 0,17** | 5,45 ± 0,16** |

Примітки: * – достовірні зміни між тваринами інтактного контролю та ураженими, $P < 0,05$, ** – достовірні зміни між ураженими тваринами та тваринами, які піддавались корекції сорбексом, $P < 0,05$.

Застосування сорбексу викликало зниження в сироватці крові та підвищення у печінці уражених тварин активності АлАТ у всі досліджені терміни (табл. 1). Найнижча активність АлАТ після застосування сорбексу відмічена у сироватці крові шурів молодого віку на 7-му добу від початку експерименту (1,06 ± 0,08 мкмоль/(л•год), що в 2,1 раза нижче рівня отруєних тварин). Максимальний коригувальний вплив на активність АлАТ як у сироватці крові, так і у печінці, сорбекс спричинив в організмі зрілих тварин в останній термін дослідження (106% і 96% відповідно, порівняно з нормою).

Оскільки визначення активності амінотрансфераз у сироватці крові є індикатором активності патологічного процесу у печінці, ми досліджували активність ще одного ферменту – АсАТ (табл. 2). Активність АсАТ у сироватці крові зростала і була найвищою у старих тварин за хромово-ізоніазидо-рифампіцинового ураження на 14-ту добу дослідження (у 3,7 раза перевищувала норму). У статевонезрілих і зрілих шурів активність АсАТ збільшилась у 3,0 та 2,1 раза відповідно порівняно з групою інтактного контролю.

Максимальне зниження активності АсАТ відмічене у печінці тварин старечого віку на 14-ту добу дослідження

за дії токсикантів. Зниження у печінці активності АсАТ, очевидно, свідчить про пригнічення процесу переамінування аспартату, відповідно відбувається гальмування інтенсивності перебігу циклу трикарбонових кислот і незначний вихід цих ензимних білків із клітин тканин у кров. Уже на 7-му добу після застосування сорбексу активність ензиму зменшилася на 50% у сироватці крові

молодих тварин і на 162% на 14-ту добу порівняно з ураженими тваринами (табл. 2). У випадку застосування сорбексу спостерігалась тенденція до нормалізації даного показника у печінці уражених тварин вже на 7-му добу від початку експерименту. У старих тварин активність АсАТ збільшилася на 21%, що свідчить про відновлення білоксинтезувальної функції печінки.

Таблиця 2

Активність АсАТ у сироватці крові (мкмоль/(л*год)) та печінці (мкмоль/(кг*год)) тварин, уражених $K_2Cr_2O_7$, ізоніазидом і рифампіцином після уведення сорбексу ($M \pm m$)

| Матеріал | Група тварин | Вікова група тварин | | | | | |
|-----------------|---------------------------------------|-------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | | статевонезрілі | | статевозрілі | | старого віку | |
| | | строк дослідження, доба | | | | | |
| | | 7-ма | 14-та | 7-ма | 14-та | 7-ма | 14-та |
| Сироватка крові | інтактний контроль, n = 6 | 0,70 ± 0,06 | | 0,64 ± 0,04 | | 1,05 ± 0,20 | |
| | уражені токсикантами, n = 6 | 1,21 ± 0,07* | 2,07 ± 0,14* | 1,19 ± 0,06* | 1,34 ± 0,08* | 3,22 ± 0,14* | 3,85 ± 0,18* |
| | уражені токсикантами + сорбекс, n = 6 | 0,86 ± 0,04** | 0,94 ± 0,05** | 0,79 ± 0,04** | 0,88 ± 0,04** | 1,63 ± 0,08** | 1,73 ± 0,07** |
| Печінка | інтактний контроль, n = 6 | 1,21 ± 0,11 | | 2,66 ± 0,06 | | 2,48 ± 0,12 | |
| | уражені токсикантами, n = 6 | 0,87 ± 0,03* | 0,75 ± 0,04* | 1,45 ± 0,10* | 1,25 ± 0,06* | 1,34 ± 0,04* | 1,13 ± 0,04* |
| | уражені токсикантами + сорбекс, n = 6 | 1,44 ± 0,06** | 1,65 ± 0,05** | 2,46 ± 0,11** | 2,76 ± 0,09** | 1,85 ± 0,06** | 2,09 ± 0,12** |

Примітка: див. табл. 1.

Активність лужної фосфатази (табл. 3) є маркером розвитку запального процесу у печінці. Відмічене підвищення активності даного ензиму у сироватці крові щурів усіх вікових груп після надходження до їх організму досліджуваних токсикантів, що зумовлено вивільненням ЛФ з ушкоджених гепатоцитів, а також з індуктивним її синтезом у жовчних каналцях. Найбільшого підвищення зазнав вміст ЛФ у сироватці крові статевонезрілих тварин за поєднаної дії біхромату калію, ізоніазиду та рифампіцину. Її активність підвищилась на 100% через 7 діб після ураження і на 127% – через 14 діб порівняно з інтактними тваринами.

У печінці уражених тварин активність ЛФ знижувалась протягом усього експерименту в усіх дослідних групах (табл. 3). У статевонезрілих тварин активність ензиму знизилась на 30% на 7-му добу експерименту, у зрілих – на 34%, у тварин старого віку – на 29% відносно норми.

Після введення отруєним тваринам молодого віку сорбексу активність ЛФ виявилась практично на рівні інтактних тварин в останній термін експерименту. На 14-ту добу від початку дослідження активність ензиму становила 95%, що на 132% нижче рівня уражених щурів. Аналогічна тенденція до нормалізації даного показника у сироватці крові спостерігалась й у тварин старшого віку. Уведення в організм ентеросорбенту на 7-му добу дослідження викликало достовірне ($P < 0,05$) збільшення активності ЛФ в печінці старих тварин порівняно з ураженими тваринами, але вона ще була нижчою від такої в інтактних щурів і наприкінці дослідження становила 94% від їх рівня.

Гостре експериментальне ураження печінки у щурів спричиняє порушення процесів жовчоутворення, що підтверджується результатами наших досліджень (табл. 4).

Таблиця 3

Активність лужної фосфатази в сироватці крові (нмоль/(с*л)) та печінці (нмоль/(с*г)) тварин, уражених $K_2Cr_2O_7$, ізоніазидом і рифампіцином після уведення сорбексу ($M \pm m$)

| Матеріал | Група тварин | Вікова група тварин | | | | | |
|-----------------|---------------------------------------|-------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | статевонезрілі | | статевозрілі | | старого віку | |
| | | строк дослідження, доба | | | | | |
| | | 7-ма | 14-та | 7-ма | 14-та | 7-ма | 14-та |
| Сироватка крові | інтактний контроль, n = 6 | 1925 ± 113 | | 2406 ± 159 | | 3007 ± 241 | |
| | уражені токсикантами, n = 6 | 3849 ± 159* | 4361 ± 183* | 4691 ± 104* | 4751 ± 145* | 4962 ± 138* | 5353 ± 159* |
| | уражені токсикантами + сорбекс, n = 6 | 1699 ± 55** | 1834 ± 101** | 2120 ± 127** | 2406 ± 120** | 2286 ± 145** | 2646 ± 129** |
| Печінка | інтактний контроль, n = 6 | 740 ± 31 | | 1338 ± 54 | | 1705 ± 74 | |
| | уражені токсикантами, n = 6 | 514 ± 21* | 457 ± 14* | 878 ± 21* | 773 ± 30* | 1206 ± 27* | 1107 ± 22* |
| | уражені токсикантами + сорбекс, n = 6 | 653 ± 23** | 698 ± 19** | 1335 ± 33** | 1320 ± 47** | 1513 ± 56** | 1603 ± 31** |

Примітка: див. табл. 1.

Вміст загального білірубіну (мкмоль/л) та жовчних кислот (г/л) у сироватці крові тварин, уражених $K_2Cr_2O_7$, ізоніазидом і рифампіцином після уведення сорбексу ($M \pm m$)

| Показник | Група тварин | Вікова група тварин | | | | | |
|---------------------|---------------------------------------|-------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | | статевонезрілі | | статевозрілі | | старого віку | |
| | | строк дослідження, доба | | | | | |
| | | 7-ма | 14-та | 7-ма | 14-та | 7-ма | 14-та |
| Загальний білірубін | інтактний контроль, n = 6 | 12,19 ± 0,55 | | 12,49 ± 0,47 | | 15,09 ± 0,78 | |
| | уражені токсикантами, n = 6 | 16,97 ± 1,62* | 23,53 ± 1,61* | 23,10 ± 1,55* | 25,67 ± 1,28* | 23,82 ± 1,09* | 28,08 ± 1,44* |
| | уражені токсикантами + сорбекс, n = 6 | 12,29 ± 0,73** | 12,67 ± 0,64** | 16,53 ± 1,17** | 17,97 ± 1,40** | 16,25 ± 1,17** | 16,82 ± 1,15** |
| Жовчні кислоти | інтактний контроль, n = 6 | 6,95 ± 0,43 | | 9,48 ± 0,58 | | 12,02 ± 0,64 | |
| | уражені токсикантами, n = 6 | 14,26 ± 0,55* | 16,61 ± 0,43* | 18,23 ± 0,75* | 21,37 ± 0,87* | 22,42 ± 0,81* | 24,16 ± 0,95* |
| | уражені токсикантами + сорбекс, n = 6 | 7,96 ± 0,48** | 9,69 ± 0,67** | 14,33 ± 0,67** | 15,17 ± 0,82** | 16,34 ± 0,81** | 17,06 ± 0,63** |

Примітка: див. табл. 1.

Найвищий вміст загального білірубіну відмічено наприкінці дослідження у тварин зрілого віку: 206% порівняно з інтактними тваринами, що на 13% і 20% вище даного показника у тварин статевонезрілого та старечого віку відповідно. У випадку використання сорбексу вміст загального білірубіну зменшився на 38% у статевонезрілих тварин на 7-му добу експерименту порівняно з ураженими тваринами, та практично не відрізнявся від рівня інтактних тварин.

У разі введення в організм тварин токсинів відмічене максимальне зростання вмісту жовчних кислот у молодих щурів наприкінці експерименту (239% порівняно з тваринами інтактного контролю). Максимальний коригувальний вплив на даний показник ентеросорбент чинив на 7-му добу від початку експерименту в усіх вікових групах тварин. У щурів молодого віку вміст ЖК становив 115%, у зрілих – 151%, у старих тварин – 134% порівняно з нормою.

Висновки

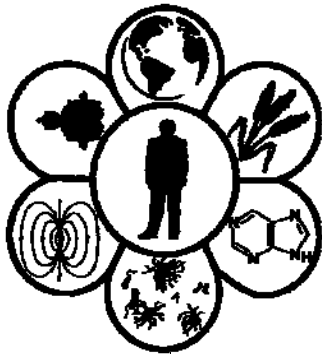
Ентеросорбент сорбекс у разі введення в уражений туберкулозостатиками та сполуками шестивалентного хрому організм тварин різного віку знешкоджує екзогенні токсини і, таким чином, зменшує їх вплив на структуру плазматичних мембран гепатоцитів, що підтверджується зниженням активності амінотрансфераз і лужної фосфатази у сироватці крові та їх збільшенням у печінці. Позитивний ефект на процеси жовчоутворення сорбекс проявив у статевонезрілих тварин протягом усього експерименту порівняно з тваринами зрілого та старечого віку.

Бібліографічні посилання

- Banfalvi, G., 2011. Heavy metals, trace elements and their cellular effects. Cellular effects of heavy metals. Springer, Dordrecht, 3–28.
- Bondarev, E.V., Shtrygol, S.Y., Dyryavuy, S.B., 2008. Prime-nenie enterosorbentov v meditsinskoj praktike [Use of enterosorbents in medical practice]. Pharmacist [Provizor] 13–14, 39–43 (in Russian).

- Duffus, J.H., 2002. Heavy metals – a meaningless term? Pure Appl. Chem. 74(5), 793–807.
- Guide for the care and use of laboratory animals: Eighth edition, 2011. The National Academies Press, Washington, DC.
- Hantson, P., Caenegem, O.V., Decordier, I., 2005. Hexavalent chromium ingestion: Biological markers of nephrotoxicity and genotoxicity. Clin. Toxicol. (Phila.) 43(2), 111–112.
- Hussain, Z., Kar, P., Hussain, S.A., 2003. Antituberculosis drug-induced hepatitis: Risk factors, prevention and management. Indian J. Exp. Biol. 41(6), 1226–1232.
- Kind, J., 1954. Determination of the activity of alkaline phosphatase. J. Clin. Path. 7, 322.
- Kolb, V.G., Kamyshnikov, V.S., 1982. Spravochnik po klinicheskoy himii [Handbook of clinical chemistry]. Belarus, Minsk (in Russian).
- Lapach, S.N., Chubenko, A.V., Babich, P.N., 2000. Statisticheskie metody v medikobiologicheskikh issledovaniyah s ispolzovaniem Excel [Statistical methods in medical-biological researches with using of Excel]. Morion, Kyiv (in Russian).
- Maeng, S.H., Chung, H.W., Kim, K.J., 2004. Chromosome aberration and lipid peroxidation in chromium-exposed workers. Biomarkers 9(6), 418–434.
- Manna, A., 2000. Simultaneous estimation of rifampicin and isoniazid in combined dosage forms. Indian J. Pharm. Sci. 62(3), 185–186.
- Maw, G., Aitken, P., 2003. Isoniazid overdose: A case series, literature review and survey of antidote availability. Clin. Drug Investig. 23(7), 479–485.
- Pal, R., Vaiphei, K., Sikander, A., 2006. Effect of garlic on isoniazid and rifampicin – induced hepatic injury in rats. World J. Gastroenterol. 12(4), 636–639.
- Porter, R., Jachymova, M., Martasek, P., 2005. Reductive activation of Cr(VI) by nitric oxide synthase. Chem. Res. Toxicol. 18(5), 834–843.
- Preziosi, P., 2007. Isoniazid: Metabolic aspects and toxicological correlates. Curr. Drug Metab. 8(8), 839–851.
- Proctor, D.M., Otani, J.M., Finley, B.L., 2002. Is hexavalent chromium carcinogenic via ingestion? A weight-of-evidence review. J. Toxicol. Environ. Health 65, 701–746.
- Reitman, S., Frankel, S., 1957. Definition of biochemical indicators of the toxicity of liver. Amer. J. Clin. Path. 28(1), 56–60.
- Santhosh, S., Sini, T.K., Anandan, R., 2007. Hepatoprotective activity of chitosan against isoniazid and rifampicin-induced toxicity in experimental rats. Eur. J. Pharmacol. 572(1), 69–73.
- Yew, W.W., Leung, C.C., 2006. Antituberculosis drugs and hepatotoxicity. Respirology 11, 699–707.

Надійшла до редколегії 16.09.2014



УДК 616.155.392-097:615.277

Вплив протипухлинної терапії на експонування Tn-антигену на мембранах лейкоцитів хворих на лейкози

Г.С. Маслак

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

Проаналізовано експонування Tn-антигену на поверхні лімфоцитів, моноцитів і гранулоцитів у групах хворих на мієлопроліферативні захворювання: еритремію, сублейкемічний мієлоз і у хворих із хронічним лімфолейкозом. Оцінено вплив цитостатичних терапій за схемами: COP (циклофосфамід, вінкрисдин, преднізолон) та FC (комбінація флударабіну із циклофосфамідом) на інтенсивність експонування Tn-антигену під час лікування хворих на хронічний лімфолейкоз. Цей вуглеводний антиген не виявлено на поверхні клітин крові (лімфоцитів, моноцитів, гранулоцитів) у хворих на еритремію та сублейкемічний мієлоз. За допомогою проточної цитометрії ідентифіковано Tn-антиген на поверхні понад 80% лімфоцитів, показано значне (в 100 разів) зростання інтенсивності його експонування на цих клітинах за хронічного лімфолейкозу. Після лікування таких хворих за схемами COP та FC виявлено зниження кількості лімфоцитів із поверхневим Tn-антигеном до $28,1 \pm 0,8\%$ та до $9,5 \pm 0,5\%$, відповідно. Показано позитивний вплив цитотоксичних терапій, використаних у лікуванні хворих на хронічний лімфолейкоз, на інтенсивність експонування Tn-антигену на поверхні лімфоцитів. Більш дієва щодо зниження кількості поверхневого Tn-антигену під час лікування хронічного лімфолейкозу терапія комбінацією флударабіну з циклофосфамідом.

Ключові слова: Tn-антиген; лімфоцити; цитостатична терапія; хронічний лімфолейкоз

Effect of anticancer therapy on Tn antigen exposure on the leucocyte membranes in patients with leukemia

G.S. Maslak

State Institution "Dnipropetrovsk Medical Academy", Dnipropetrovsk, Ukraine

Tn-antigen (Thomsen-nouvelle antigen) is tumor-associated carbohydrate antigen with only one GalNAc residue attached to serine or threonine of polypeptide chain. There is not enough data about the expression of this glycotope in hematologic processes. But the correlations between increasing Tn-antigen expression on the cell surface and tumor growth progression, invasion, and activation of cell migration are well known. Therefore, the currently important area of modern research is studying of the impact of anticancer therapy by expression of this carbohydrate antigen in the onco-proliferative process. There are two types of cytostatic therapies in clinical hospitals of Ukraine: COP-therapy (cyclophosphamide, vincristine, prednisone) and FC-therapy (fludarabine, cyclophosphamide), which are the most popular due to their effectiveness and low price. The aim of our study was to investigate Tn-antigen exposure on the surface of lymphocytes, monocytes and granulocytes in polycythemia vera and subleukemic myelosis; to examine the influence of COP- and FC-therapies on Tn-antigen exposition in patients with chronic lymphocytic leukemia. The objects of the study were blood cells of patients with chronic lymphocytic leukemia ($n = 25$), polycythemia vera ($n = 15$) and subleukemic myelosis ($n = 15$) aged 58–66 years. Healthy hematologic volunteers ($n = 15$) aged 55 to 65 years were in the control group. Lymphocytes of patients with chronic lymphocytic leukemia ($n = 25$) were also studied after the chemotherapy treatment of patients divided into two groups: those who took COP-therapy ($n = 13$); and those who treated with FC-therapy ($n = 12$). Tn-antigen exposure on lymphocytes, monocytes and granulocytes was investigated by Beckman Coulter EPICS flow cytometer with primary monoclonal Tn-antigen antibodies (Institute of Immunology, Moscow, Russia) and secondary fluorescein isothiocyanate labeled antibodies (Millipore, USA). The number of dead cells was monitored by binding them with propidium iodide. The result was analyzed with FC Express. According to our data, Tn-antigen exposure was not detected on the surface of blood cells (lymphocytes, monocytes and granulocytes) in the control group and in patients with polycythemia vera and subleukemic myelosis. Nevertheless, Tn-antigen was identified on the surface of more than 80% of lymphocytes in chronic lymphocytic leukemia patients. The intensity of this

*ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», вул. Весела, 30, Дніпропетровськ, 49024, Україна
State Institution "Dnipropetrovsk Medical Academy", Veselay str., 30, Dnipropetrovsk, 49024, Ukraine
Tel.: +3-099-903-37-22. E-mail: maslak_anna@mail.ru*

tumor-associated antigen exposure on lymphocytes membrane was 100 times higher compared with that in normal lymphocytes. In chronic lymphocytic leukemia patients after COP-treatment the number of lymphocytes with surface Tn-antigen was equal to $28,1 \pm 0,8\%$, and after FC-treatment it decreased to $9,5 \pm 0,5\%$. Moreover, positive effect of cytotoxic therapy used in treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia on intensity of Tn-antigen exposure on the surface of lymphocytes was shown. FC-therapy (fludarabine, cyclophosphamide) is more effective; compared with the data prior to this treatment it 40 times reduced the relevant index. Therefore, it can be applied in Ukraine for chemotherapeutic treatment schemes effective against Tn-antigen.

Keywords: Tn-antigen; lymphocytes; cytostatic therapy; chronic lymphocytic leukemia

Вступ

Tn-антиген (Thomsen-nouvelle antigen) – пухлино-асоційований вуглеводний антиген, який являє собою тільки один залишок GalNAc, приєднаний α -зв'язком до серину чи треоніну поліпептидної ланки. Він є основою для подальшого формування O-гліканів у нормі, коли внаслідок добудови вуглеводного ланцюга ця послідовність повністю маскується. За умов розвитку пухлин такі процеси значно порушуються або блокуються (Springer, 1984), а Tn-антиген ідентифікований та охарактеризований як один із найспецифічніших пухлино-асоційованих структур на поверхні патологічних клітин у майже 90% видів раку молочної та підшлункової залози, легенів і простати (Freire and Osipaga, 2003). Відносно експресії цього глікотопу під час онкогематологічних процесів літературних даних недостатньо. З одного боку, відомо, що за хронічного лімфолейкозу (ХЛЛ) – онкологічного захворювання лімфатичної тканини, підвищується експресія Tn-антигену на поверхні В-лімфоцитів (Libisch et al., 2014). З іншого – цей пухлино-асоційований вуглеводний антиген гетерогенно експресується тільки на клітинах Рід-Штернберга за лімфоми Ходжкіна, та дуже незначною мірою в разі інших онкогематологічних захворювань, у тому числі на В-хронічний лімфолейкоз (Lawrie et al., 2006). Отже, питання щодо експонування цього глікотопу на лейкоцитах при ХЛЛ залишається нез'ясованим. Слід зазначити, що дослідження лейкозів в основному сконцентровані на виявленні Tn-антигену на поверхні клітин пухлинного клону, не беручи до уваги інші клітинні лінії. Відтак, за літературними даними, при мієлолейкозах вуглеводний та ліпідний обмін лімфоцитів змінюється, знижується їх антиоксидантний захист (Savchenko et al., 2008). Нині зовсім відсутні дослідження саме цих клітин за еритремії (Polycythemia vera) та сублейкемічного мієлозу, які характеризуються надмірним формуванням клітин мієлоїдного ростку (Lakey et al., 2010).

Відомий факт кореляції експонування Tn-антигену на поверхні клітин із прогресуванням росту пухлин, активацією процесів клітинної міграції, інвазії та ухилення її від впливу імунної системи хворої людини. Тому важливим сучасним напрямом досліджень є вивчення впливу протипухлинної терапії на експонування цього вуглеводного антигену (Li et al., 2009). У клінічних лікарнях України застосовується протипухлинна терапія COP (циклофосфамід, вінкристин, преднізолон), яка є однією з найпоширеніших завдяки її ефективності та невеликій вартості, та комбінація флударабіну з циклофосфамідом (FC-терапія) – антиметаболітна терапія на клітини пухлинного клону більш високої дії, ніж COP терапія (Flinn et al., 2007). За попередніми даними, отриманими в нашій лабораторії, комбінована

COP терапія може впливати на експонування альфа-1-кислого глікопротеїну, а саме знижувати його кількість на поверхні лейкоцитів за умов ХЛЛ порівняно з групою гематологічно здорових донорів (Maslak et al., 2014). Враховуючи викладене вище, метою роботи було дослідити вплив COP та FC терапії на експонування Tn-антигену за ХЛЛ, з'ясувати наявність цього глікотопу на поверхні лімфоцитів, моноцитів і гранулоцитів при мієлолейкозі (еритремія та сублейкемічний мієлоз).

Матеріал і методи досліджень

Об'єкт дослідження – клітини крові хворих на хронічний лімфолейкоз ($n = 25$), еритремію ($n = 15$) та сублейкемічний мієлоз ($n = 15$) віком 58–66 років. Контрольну групу становили гематологічно здорові волонтери ($n = 15$) віком 55–65 років. Лімфоцити групи хворих на хронічний лімфолейкоз ($n = 25$) також досліджували після призначення хворим курсу комплексної поліхіміотерапії та поділу їх на дві групи: тих, які приймали ліки за програмою COP ($n = 13$), та тих, які проходили лікування за схемою FC ($n = 12$).

Клінічне обстеження пацієнтів проводили відповідно зі стандартами медичної допомоги в умовах спеціалізованого стаціонару – гематологічного відділення комунального закладу «Міська багатопрофільна клінічна лікарня № 4», м. Дніпропетровськ. Усі обстежені давали згоду (у письмовому вигляді) на участь у дослідженні.

Виділення лімфоцитів із гепаринізованої крові (20–25 ОД гепарину на 1 мл крові) робили за модифікованим методом А. Воуям (1976), заснованим на седиментації клітин у градієнті густини фікол-урографіну ($\rho = 1,077$ г/мл) (Kovalchuk et al., 2010). Для цього у центрифужну пластикову пробірку наливали 2–3 мл градієнта густини, на нього нашаровували 4–6 мл відстояної попередньо розведеної удвічі у фізіологічному розчині плазми та верхній шар еритроцитів. Пробірки центрифугували упродовж 40 хв із прискоренням 200 g за кімнатної температури. Інтерфазне кільце з лімфоцитів відбирали у суху конічну центрифужну пробірку. Отриману суспензію клітин двічі відмивали в забуференому фізіологічному розчині (ЗФР) таким чином: до суспензії лімфоцитів додавали 3–4 мл ЗФР, уміст пробірки ретельно перемішували та центрифугували з прискоренням 200–300 g за кімнатної температури, потім рідину над осадом відбирали. Після відмивання клітини ресуспендували у ЗФР, підраховували їх кількість у камері Горяєва. Життєздатність клітин (понад 90%) визначали за допомогою триптанового синього та готували робочу концентрацію лімфоцитів (300 тис./мл у кожному зразку). Клітини крові для аналізу розподілу фракцій лейкоцитів готували таким чином: проводили лізис еритроцитів за допомогою розчину OptiLyse C (Beckman Coulter, USA), фіксацію клітин 8% параформальдегідом.

Локалізацію Tn-антигену у перелічених фракціях клітин крові визначали методом проточної цитофлуориметрії з використанням моноклональних антитіл до Tn-антигену (Інститут імунології, Москва, Росія) та вторинних антитіл до імуноглобулінів миші, кон'югованих із флуоресцеїн-ізоціанатом – ФІТЦ (Millipore, USA). Кількість мертвих клітин контролювали за їх зв'язуванням із пропідій йодидом. Реєстрацію даних проводили на проточному цитометрі Beckman Coulter EPICS. Обробку результатів робили за допомогою програми FC Express.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою пакета програм Statistica 6.0. Достовірність відмінностей у групах порівняння встановлювали з використанням t-критерію Стюдента.

Результати та їх обговорення

Першим етапом роботи було дослідження перерозподілу лейкоцитів (лімфоцитів, моноцитів, гранулоцитів) за експонуванням на їх поверхні Tn-антигену у гематологічно здорових донорів та в усіх групах хворих з онкопроліферативними порушеннями. Зв'язування з антитілами до цього пухлино-асоційованого вуглеводного антигену було відсутнє на досліджуваних клітинах у групах хворих на еритремію та сублейкемічний мієлоз та в контрольній групі. Tn-антиген виявлено тільки на поверхні мембран лімфоцитів у групі хворих на ХЛЛ, які уперше звернулись до лікарні (табл.).

Таблиця

Кількість лейкоцитів крові з поверхневою локалізацією Tn-антигену у хворих на еритремію, сублейкемічний мієлоз і хронічний лімфолейкоз до та після проходження поліхіміотерапевтичного лікування (додатково показано інтенсивність експонування досліджуваного антигену)

| Група | Моноцити | Гранулоцити | Лімфоцити | |
|---|-------------|-------------|---------------|---|
| Еритремія, n = 15 | не виявлено | не виявлено | не виявлено | не виявлено |
| Сублейкемічний мієлоз, n = 15 | не виявлено | не виявлено | не виявлено | не виявлено |
| Хронічний лімфолейкоз до лікування, n = 15 | не виявлено | не виявлено | 82,09 ± 8,00 | інтенсивність експонування вища у 100 разів ^{°°} |
| Хронічний лімфолейкоз після СОР-лікування, n = 15 | не виявлено | не виявлено | 9,50 ± 0,50** | інтенсивність експонування вища удесятеро [°] |
| Хронічний лімфолейкоз після FC-терапії, n = 15 | не виявлено | не виявлено | 28,07 ± 0,80* | інтенсивність експонування вища удвічі [°] |

Примітки: * – вірогідна різниця порівняно з групою хворих на ХЛЛ до лікування за $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$; ° – вірогідна різниця порівняно з контрольною групою за $P < 0,05$, °° – $P < 0,01$.

Для другого етапу дослідження проведено виділення лімфоцитів тільки у хворих на ХЛЛ до лікування та у групах цих хворих після терапії за схемами СОР та FC. За даними проточної цитофлуориметрії кількість лімфоцитів, яка взаємодіяла з Tn-антигеном у хворих на ХЛЛ до проходження поліхіміотерапевтичного лікування, складала 82,1 ± 8,0%. У групі хворих на ХЛЛ після проведення лікування за схемою СОР кількість лімфоцитів із поверхневим Tn-антигеном складала 28,1 ± 0,8%. Значення цього показника у групі хворих на ХЛЛ, які проходили лікування FC-терапією, було нижчим порівняно з групою хворих після СОР-лікування ($P < 0,05$) – 9,5 ± 0,5%.

Дослідження інтенсивності експонування Tn-антигену на плазматичній мембрані лімфоцитів показали їх значне та достовірне підвищення у 100 разів ($P < 0,01$) при хронічному лімфолейкозі порівняно з контрольною групою (рис. 1). Ефективнішим відносно зниження цього показника було лікування хворих на ХЛЛ комбінацією флударабіну з циклофосфамідом, яке сприяло нормалізації показника, що був вищим за норму лише в 2,5 раза (рис. 2).

У хворих на ХЛЛ після СОР-лікування показник експонування Tn-антигену на плазматичній мембрані лімфоцитів знижувався у 10 разів порівняно з даними цих хворих до лікування, однак залишився вищим за норму у 10 разів. Отже, цей тип лікування не давав значних результатів відносно зниження інтенсивності експонування Tn-антигену на плазматичній мембрані лімфоцитів хворих на ХЛЛ. Таким чином, поліхіміотерапевтичне лікування хворих на ХЛЛ впливає як на кількість лімфоцитів із поверхневим Tn-антигеном, так на інтенсивність його експонування плазматичній мембрані.

Ми не виявили досліджуваного антигену на моноцитах, гранулоцитах і лімфоцитах, які не є онкогенними за еритремією та сублейкемічним мієлозом, що підтверджує дані відносно його наявності тільки на поверхні клітин пухлинного клону (Freire and Osinaga, 2003). Експресія Tn-антигену (або CD175 антигену) присутня на еритробластних клітинах при гострій еритроїдній лейкемії, яка може розвиватися з еритремії (Blum and Angelillo-Scherrer, 2012). Оскільки хворі, яких ми досліджували, перебували на II стадії цього захворювання та не мали клінічних та біохімічних ознак його злоякісної трансформації, можливо, Tn-антиген на поверхні клітин не було виявлено.

За нашими даними, цей пухлино-асоційований вуглеводний антиген ідентифіковано на поверхні лімфоцитів хворих на хронічний лімфолейкоз. Іншими дослідниками методами імунопреципітації, гістології та проточної цитометрії на поверхні лейкоцитарних клітин виявлено такі вуглеводні структури: Tn-антиген, сіаліл-Tn-антиген та TF-антиген, які на думку авторів можуть входити до складу глікофінголіпідів та глікопротеїнів мембран клітин, найбільшим серед яких є сіалофорін – CD43 (Cao et al., 2008). Tn-антиген може бути також вуглеводною часткою CD162 та CD45 та протеогліканів, таких як подібний до муцинів синдекан-3 (Akita et al., 2001; Blixt et al., 2012).

Уведення флударабіну (пуринового аналогу) у В-клітинні лінії MEC2 та Raji блокує експресію CD-антигенів на поверхні досліджуваних клітин (Cassano et al., 2010). Механізм дії флударабіну на лейкоцитарні клітинні лінії досить добре вивчений. Він впливає на синтез ДНК та РНК пухлинних клітин, активує протеїнази,

які, у свою чергу, фосфорилують p53, p63 та p73 – чинники, які сприяють експресії генів апоптозу (Christopher et al., 2014). Цей процес супроводжується порушенням фолдингу та посттрансляційної модифікації білків, у тому числі процесів глікозилювання. А оскільки Tn-антиген є O-глікановою часткою CD-антигенів, експресія яких порушується за дії флударабіну (Cassano et al., 2010),

можна припустити, що саме за таким механізмом цей пуриновий аналог викликає зниження експонування Tn-антигену на поверхні лімфоцитів, яке ми отримали в роботі. Ці дані безумовно потребують додаткового підтвердження після проведення експериментів на лейкомічних клітинних лініях, які в літературних джерелах доки відсутні.

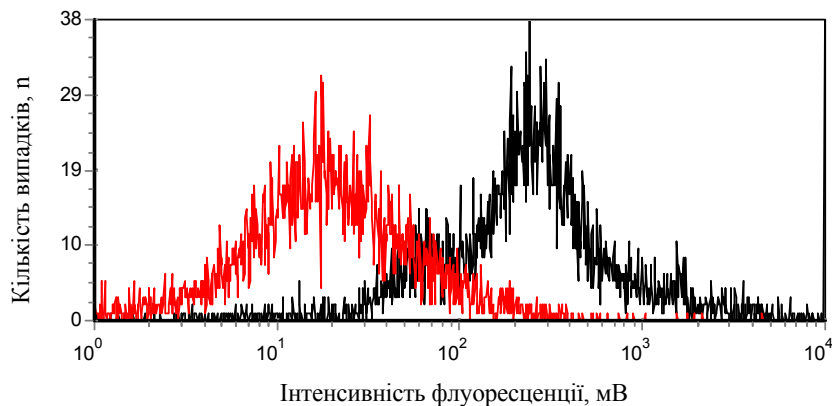


Рис. 1. Інтенсивність флуоресценції антитіл до Tn-антигену на лімфоцитах гематологічно здорового донора (червона лінія) та хворого на хронічний лімфолейкоз до лікування (чорна лінія) за даними проточної цитометрії на Beckman Coulter EPICS

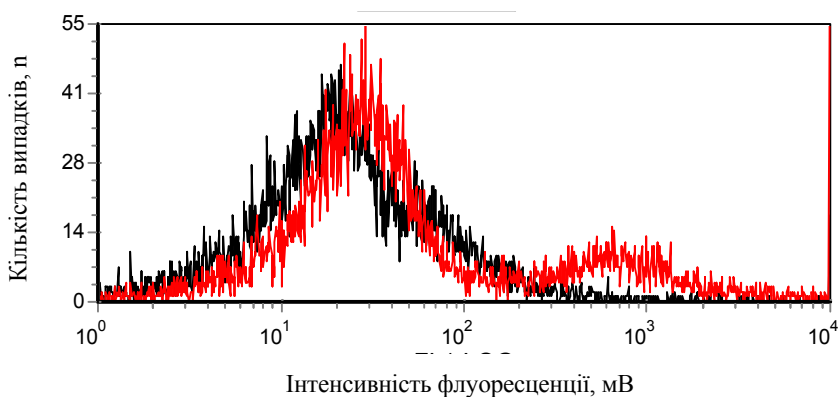


Рис. 2. Інтенсивність флуоресценції антитіл до Tn-антигену на лімфоцитах гематологічно здорового донора (чорна лінія) та хворого на хронічний лімфолейкоз після лікування комбінацією флударабіну із циклофосфамідом – FC-терапією (червона лінія) за даними проточної цитометрії на Beckman Coulter EPICS

Циклофосфамід є алкілувальним препаратом, який чинить цитотоксичну дію та широко застосовується в онкології (Rao et al., 2005). Досліджено вплив циклофосфаміду на пухлинні клітини при різних онкологічних захворюваннях (Kurtenkov et al., 2005). Miles et al. (1996) показано, що попереднє введення циклофосфаміду значно стимулює імунну відповідь та викликає більший ефект специфічних антитіл до Tn- та сіаліл-Tn-антигенів, які потім уводяться хворим на рак молочної залози. А комбінації протипухлинних препаратів за участі циклофосфаміду: ЦМФ (циклофосфамід, метотрексат, фторурацил) та ЦАФ (циклофосфамід, доксорубіцин, фторурацил) стимулюють імунну відповідь на пухлино-асоційовані вуглеводні антигени (TF, Tn та α Gal) у пацієнтів із пухлинами молочної залози. Крім того, перед оперативним лікуванням II–III стадії цієї хвороби внаслідок прийому ад'ювантної терапії за участі циклофосфаміду, високий рівень антитіл до TF-антигену корелює з позитивною динамікою та гарним прогнозом одужання таких хворих. Отже, поліхімотерапевтичні пре-

парати, які містять циклофосфамід, не тільки впливають на експресію Tn-антигену, а і стимулюють імунну відповідь і продукування антитіл до цього O-глікану (Kurtenkov et al., 2005).

У хворих на ХЛЛ під впливом COP- та FC-терапії знижується кількість лімфоцитів, які мають на поверхні Tn-антиген, і значно падає інтенсивність його експонування, що можна пояснити, тим, що до складу обох як основний діючий засіб входить циклофосфамід. А комбінація цього препарату з флударабіном, за нашими даними, має більший ефект у напрямі зниження обох показників.

Tn-антиген бере безпосередню участь у пухлинному процесі, а зниження його експресії на поверхні клітин є одним із завдань сучасної онкології. Нині розроблено нові терапевтичні засоби для лікування ХЛЛ, які поєднують фототерапію та біологічні агенти – комбінація порфірину (TnMPyP) та лектину (Moriga G), які високоафінно зв'язують T- та Tn-антигени на поверхні клітини-носія та призводять до її загибелі (Poignon et al., 2011). Досить дієвими, незважаючи на високу токсичність цикло-

осфаміду, вважаються схеми лікування, основані на комбінації біологічних та цитотоксичних агентів, одним із яких є поєднання циклофосфаміду з антитілами до пухлино-асоційованих вуглеводних антигенів (Pallasch et al., 2014). За нашими даними, поліхіміотерапевтичне лікування за схемами СОР (циклофосфамід, вінкристин, преднізолон) та FC (флударабін, циклофосфамід), яке застосовують для хворих на хронічний лімфолейкоз у клінічних лікарнях України, має позитивний вплив за зниження Tn-антигену на поверхні лімфоцитів.

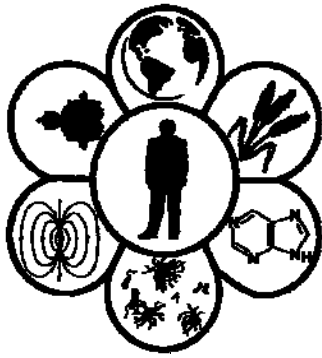
Висновки

Експонування Tn-антигену на поверхні клітин крові (лімфоцитів, моноцитів, гранулоцитів) у контрольній групі та у хворих на еритремію та сублейкемічний мієлоз не виявлено. При хронічному лімфолейкозі Tn-антиген ідентифікований на поверхні понад 80% лімфоцитів. Інтенсивність експонування цього пухлино-асоційованого вуглеводного антигену на лімфоцитах у 100 разів вища за цей показник у нормі. У групі хворих на хронічний лімфолейкоз після проведення лікування за схемою СОР кількість лімфоцитів із поверхневим Tn-антигеном склала $28,1 \pm 0,8\%$, а після лікування FC-терапією знизилась до $9,5 \pm 0,5\%$. Поліхіміотерапевтичне лікування хворих на хронічний лімфолейкоз за схемами СОР та FC зумовило зниження інтенсивності експонування Tn-антигену на поверхні лімфоцитів. Дієвіша FC-терапія, яка, порівняно з даними до лікування, зменшувала цей показник у 40 разів.

Бібліографічні посилання

- Akita, K., Fushiki, S., Fujimoto, T., Munesue, S., Inoue, M., Oguri, K., Okayama, M., Yamashina, I., Nakada, H., 2001. Identification of the core protein carrying the Tn antigen in mouse brain: Specific expression on syndecan-3. *Cell Struct. Funct.* 26(5), 271–278.
- Blixt, O., Lavrova, O.I., Mazurov, D.V., Cló, E., Kracun, S.K., Bovin, N.V., Filatov, A.V., 2012. Analysis of Tn antigenicity with a panel of new IgM and IgG1 monoclonal antibodies raised against leukemic cells. *Glycobiol.* 22(4), 529–542.
- Blum, S., Angelillo-Scherrer, A., 2012. Block of red blood cell maturation in acute erythroid leukemia. *Blood.* 120(10), 1974.
- Cao, Y., Merling, A., Karsten, U., Goletz, S., Punzel, M., Kraft, R., Butschak, G., Schwartz-Albiez, R., 2008. Expression of CD175 (Tn), CD175s (sialosyl-Tn) and CD176 (Thomsen-Friedenreich antigen) on malignant human hematopoietic cells. *Int. J. Cancer.* 123(1), 89–99.
- Cassano, C., Mactier, S., Mulligan, S.P., Belov, L., Huang, P., Christopherson, R.I., 2010. Cladribine and fludarabine nucleoside change the levels of CD antigens on B-lymphoproliferative disorders. *Int. J. Proteomics.* 5, 2010:964251.
- Christopherson, R.I., Mactier, S., Almazi, J.G., Kohnke, P.L., Best, O.G., Mulligan, S.P., 2014. Mechanisms of action of fludarabine nucleoside against human Raji lymphoma cells. *Nucleos. Nucleot. Nucl.* 33, 375–383.
- Flinn, I.W., Neuberger, D.S., Grever, M.R., Dewald, G.W., Bennett, J.M., Paietta, E.M., Hussein, M.A., Appelbaum, F.R., Larson, R.A., Moore, D.F., Tallman, M.S., 2007. Phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide compared with fludarabine for patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia: US intergroup trial E2997. *J. Clin. Oncol.* 25(7), 793–798.
- Freire, T., Osinaga, E., 2003. Immunological and biomedical relevance of Tn antigen. *Immunologia* 22(1), 27–38.
- Kovalchuk, L.V., Ignatieva, G.A., Ganovskaya, L.V., 2010. *Immunologia: Praktikum [Immunology: Workshop]* Geotar-Media, Moscow (in Russian).
- Kurtenkov, O., Klaamas, K., Rittenhouse-Olson, K., Vahter, L., Sergejev, B., Miljukhina, L., Shljapnikova, L., 2005. IgG immune response to tumor-associated carbohydrate antigens (TF, Tn, alphaGal) in patients with breast cancer: Impact of neoadjuvant chemotherapy and relation to the survival. *Exp. Oncol.* 27(2), 136–140.
- Lakey, M.A., Pardanani, A., Hoyer, J.D., Nguyen, P.L., Lasho, T.L., Tefferi, A., Hanson, C.A., 2010. Bone marrow morphologic features in polycythemia vera with JAK2 exon 12 mutations. *Am. J. Clin. Path.* 133, 942–948.
- Lawrie, C.H., Marafioti, T., Hatton, C.S.R., Dirnhofer, S., Roncador, G., Went, P., Tzankov, A., Pileri, S.A., Pulford, K., Banham, A.H., 2006. Cancer-associated carbohydrate identification in Hodgkin's lymphoma by carbohydrate array profiling. *Int. J. Cancer* 118(12), 3161–3166.
- Li, Q., Anver, M.R., Butcher, D.O., Gildersleeve, J.C., 2009. Resolving conflicting data on expression of the Tn antigen and implications for clinical trials with cancer vaccines. *Mol. Cancer. Ther.* 8(4), 971–979.
- Libisch, M.G., Casás, M., Chiribao, M., Moreno, P., Cayota, A., Osinaga, E., Oppezco, P., Robello, C., 2014. GALNT11 as a new molecular marker in chronic lymphocytic leukemia. *Gene* 533(1), 270–279.
- Maslak, G.S., Masheiko, I.V., Pasha, N.S., Kaplan, P.Y., Brazaluk, O.Z., 2014. Dinamika zmin rivnay plazmovogo ta asociovanogo iz poverhneyu klitun krovi gastrofazovogo alfa-1-kislogo glikoproteinu za kombinovanoi himioterapii hronichnogo limfoidnogo leukozu [Dynamics of changes in the plasma and associated with the surface of blood cells acute phase alpha 1-acid glycoprotein by combination chemotherapy of chronic lymphoid leukemia]. *Bull. Probl. Biol. Med.* 3(2), 164–169 (in Ukrainian).
- Miles, D.W., Towilson, K.E., Graham, R., Reddish, M., Longenecker, B.M., Taylor-Papadimitriou, J., Rubens, R.D., 1996. A randomised phase II study of sialyl-Tn and DETOX-B adjuvant with or without cyclophosphamide pretreatment for the active specific immunotherapy of breast cancer. *Br. J. Cancer* 74(8), 1292–1296.
- Pallasch, C.P., Leskov, I., Braun, C.J., Vorholt, D., Drake, A., Soto-Feliciano, Y.M., Bent, E.H., Schwamb, J., Iliopoulou, B., Kutsch, N., van Rooijen, N., Frenzel, L.P., Wendtner, C.M., Heukamp, L., Kreuzer, K.A., Hallek, M., Chen, J., Hemann, M.T., 2014. Sensitizing protective tumor microenvironments to antibody-mediated therapy. *Cell* 156(3), 590–602.
- Poiroux, G., Pitié, M., Cullerrier, R., Lafont, E., Ségui, B., Van Damme, E.J., Peumans, W.J., Bernadou, J., Levade, T., Rougé, P., Barre, A., Benoist, H., 2011. Targeting of T/Tn antigens with a plant lectin to kill human leukemia cells by photochemotherapy. *PLoS One* 6(8), e23315.
- Rao, R., Shammo, J.M., Enschede, S.H., Porter, C., Adler, S.S., Venugopal, P., Gregory, S.A., 2005. The combination of fludarabine, cyclophosphamide, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the treatment of patients with re-plapsed chronic lymphocytic leukemia and low-grade Non-Hodgkin's lymphoma. *Clin. Lymphoma* 6(1), 26–30.
- Savchenko, A.A., Smirnova, O.V., Manchuk, V.T., 2008. Metabolicheskiy status limfocitov krovi pri chronicheskom mieloleukoze i chronicheskom limfoleukoze [Metabolic status of blood lymphocytes in chronic myeloid leukemia and chronic lymphoid leukemia]. *Med. Immun.* 1, 21–26 (in Russian).
- Springer, G.F., 1984. T and Tn, general carcinoma autoantigens. *Science* 224(4654), 1198–1206.

Надійшла до редколегії 31.08.2014



УДК 612.119+616.155.392-036.12+616.15-07

Порівняльна оцінка морфофункціональної активності клітин кісткового мозку пацієнтів при хронічній мієлоїдній лейкемії у разі терапії препаратами групи інгібіторів тирозинкіназ першого та другого покоління

І.О. Жалейко¹, Д.І. Білько¹, І.С. Дягіль², Н.М. Білько¹

¹Центр молекулярних та клітинних досліджень

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

²ДУ «Науковий центр радіаційної медицини НАМН України», Київ, Україна

Показано ефективність застосування культуральних методів дослідження для моніторингу відповіді пацієнтів на терапію інгібіторами тирозинкіназ першого та другого покоління. Функціональна активність клітин кісткового мозку пацієнтів, які мали оптимальну відповідь на терапію інгібіторами тирозинкіназ, була значно меншою порівняно з пацієнтами, які характеризувалися набутою резистентністю до препаратів, та хворими, у яких ХМЛ було діагностовано вперше. У пацієнтів з оптимальною відповіддю на терапію нілотинібом кількість колоній у напіврідкому агарі *in vitro* була меншою порівняно з пацієнтами, які мали оптимальну відповідь на терапію препаратом іматиніб. При набутті клітинами лейкемічного клону пацієнтів резистентності до терапії інгібіторами тирозинкіназ у клітинних агрегатах спостерігалось переважання ранніх клітин гранулоцито-макрофагального ростка кровотворення, що може слугувати важливим і прогностичним фактором для подальшого вибору стратегії лікування.

Ключові слова: хронічна мієлоїдна лейкемія; культура клітин *in vitro*; інгібітори тирозинкіназ

Comparative evaluation of bone marrow cells morpho-functional activity in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors of the first and second generation

I.O. Zhaleyko¹, D.I. Bilko¹, I.S. Dyagil², N.M. Bilko¹

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

²Scientific Centre of the Radiation Medicine NAMS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

The efficiency of using the culture techniques of research for monitoring the patient's response to the treatment by tyrosine kinase inhibitors of the first and second generation is shown. Thus, the functional activity of bone marrow cells in patients having the optimal treatment response to inhibitors of tyrosine kinases was significantly lower compared with patients with the acquired resistance to the drug, and patients who had CML diagnosed for first time. Furthermore, for patients with the optimal response to the nilotinib therapy, numbers of colonies in semi-solid agar *in vitro* was lower, than in patients with the optimal response to imatinib. When the leukaemic cell clone becomes resistant to tyrosine kinase inhibitors, the prevalence of early cells of granulocyte-macrophage hematopoietic stem cells is observed in CFU culture which can be an important prognostic factor for choosing the appropriate treatment strategy.

Keywords: chronic myeloid leukemia; cell culture *in vitro*; tyrosine kinase inhibitors

Центр молекулярних та клітинних досліджень Національного університету «Києво-Могилянська академія», вул. Сковороди, 2, Київ, 04655, Україна.

Centre of Molecular and Cell Research, National University of Kyiv-Mohyla Academy, Skovoroda str., 2, Kyiv, 04655, Ukraine.
Tel.: +38-095-860-10-84. E-mail: nadia.bilko@gmail.com

Вступ

Хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ) – один із найпоширеніших гемобластозів. Захворюваність становить 1 на 100 тис. випадків на рік (Weisberg et al., 2007). Причиною виникнення захворювання є поява реципрокної транслокації $t(9;22)(q34;q11)$ у гемопоетичній стовбуровій клітині. У результаті цього формується дериватна 22-га хромосома з укороченим довгим плечем, яку прийнято називати Філадельфійською (Ph) (Frazer et al., 2007). На ній утворюється онкоген BCR-ABL, котрий кодує онкоблок – BCR-ABL тирозинкіназу, що володіє здатністю до аутофосфорилування, постійно передаючи сигнал на вторинні месенджери сигнальних каскадів, які залучені практично до всіх процесів життєдіяльності клітини (Chen et al., 2010). У хронічній фазі це захворювання зумовлює незалежність лейкемічних клітин від ростових факторів і контактного інгібування, постійну активацію мітогенних сигналів, зниження здатності Ph⁺-клітин до апоптозу (Frazer et al., 2007). У результаті таких перетворень клітини лейкемічного пулу поступово витісняють пул нормальних гемопоетичних клітин пацієнта та, з набуттям додаткових мутацій, зумовлених нестабільністю геному, спричинюють прогресування захворювання до фази акселерації та бластного кризу (Vasco et al., 2000).

Наприкінці 1990-х років доктор Нейман і колеги досліджували специфічні інгібітори тирозинкіназ (ІТК), що і сприяло відкриттю інгібіторів BCR-ABL тирозинкінази (Chen, 2010). На початку 2000-х імаїніб – ІТК першого покоління було введено у клінічну практику як препарат, що вибірково блокує проліферацію клітин лейкемічного клону, викликаючи повну елімінацію Ph⁺-клітин у пунктатах кісткового мозку пацієнтів через рік від початку прийому препарату (повна цитогенетична відповідь) (Mughal et al., 2013). Однак пізніше виявилось, що лише у 70–90% випадків пацієнти досягають повної цитогенетичної відповіді (Mukhopadhyay et al., 2012). У решти хворих до препарату з часом формується резистентність. Найпоширенішою причиною стійкості до імаїнібу є мутації в гені BCR-ABL, причина яких – зміна конформації однойменної тирозинкінази, що перешкоджає зв'язуванню препарату з онкоблком (Michael et al., 2000).

Із метою подолання стійкості до імаїнібу розроблено препарати другого покоління, зокрема нілотиніб, який здатен протидіяти більшості мутацій, що є причиною стійкості до імаїнібу (Mughal et al., 2013). Нілотиніб відрізняється від імаїнібу характером взаємодії з BCR-ABL білком (в основному за рахунок ліпофільних взаємодій з тією поверхнею протеїну, де міститься АТФ-кишень, блокуючи її) і вважається у 20 разів потужнішим проти Ph⁺-клітин, що продемонстровано на клітинних лініях *in vitro* (Belle et al., 2012). Терапія нілотинібом викликає швидше та глибше зниження кількості клітин лейкемічного пулу порівняно з імаїнібом (Lanaerts et al., 2011). Однак до нілотиніб, як і до імаїнібу, із часом може виникати резистентність, механізми формування якої до кінця не з'ясовано.

Мета даного дослідження – оцінити морфофункціональні властивості гемопоетичних клітин пацієнтів із різною відповіддю на терапію препаратами ІТК для вияв-

лення особливостей формування стійкості до терапії на рівні стовбурових клітин та їх найближчих попередників.

Матеріал і методи досліджень

Об'єкт дослідження – пунктати кісткового мозку пацієнтів із ХМЛ, які перебували на амбулаторному лікуванні в ДУ «Національний центр радіаційної медицини» НАМН України. Перед початком дослідження всі хворі давали добровільну інформовану згоду на використання їх матеріалу в експериментах. Залежно від тактики терапії, яку отримували пацієнти, їх поділили на три групи: ті, у яких було вперше діагностовано ХМЛ (n = 5), пацієнти, які як терапію отримували препарат імаїніб (n = 28) та хворі, які як таргетну терапію отримували препарат нілотиніб (n = 19).

Для підтвердження діагнозу та оцінки відповіді на терапію ІТК здійснювали цитогенетичне дослідження клітин кісткового мозку пацієнтів на 12-й місяць від початку терапії, вираховуючи процентний вміст метафаз, що містять Ph-хромосому. Відповідно до показників цитогенетичного дослідження, пацієнти, після 12 місяців прийому ІТК, поділялися на групи: ті, які мали оптимальну відповідь на терапію (у їх кістковому мозку відсутні клітини, що мають Ph-хромосому) та пацієнти, які характеризувалися відсутністю відповіді на лікування (стійкість до препарату; у їхньому кістковому мозку відмічалось 1–100% Ph⁺-клітин).

Мононуклеари кісткового мозку пацієнтів культивували *in vitro* у напіврідкому агарі (0,33% бакто-агару ("Difco", США)), у 24-коміркових планшетах (Nunc, США). Суспензію для культивування готували на основі середовища RPMI-1640 ("Sigma", США) із додаванням 20% фетальної телячої сироватки ("Sigma", США), антибіотиків (50 МО/мл пеніцилін, 50 мг/мл стрептоміцин) та 50 нг/мл гранулоцито-макрофагального ростового фактора ("Sigma", США). Культивування тривало 13 діб за умов абсолютної вологості та 5% CO₂. Після цього визначали функціональну активність клітин кісткового мозку пацієнтів шляхом підрахунку кількості колоній і кластерів у комірках культурального планшета під інвертованим мікроскопом (Nikon, Японія).

Із метою морфологічного дослідження вмісту колоній і кластерів їх вилучали з бактоагару за допомогою мікропіпетки, ресуспендували у 50 мкл середовища RPMI-1640 та виготовляли препарати на цитоцентрифузі (Shandon, Великобританія). Забарвлення цитологічних препаратів здійснювали методом Паппенгейма.

Порівняння вибірок проводили за допомогою непараметричних методів (критерій Манна – Уїтні). Висновок про статистичну значущість відмінності робили при P < 0,05.

Результати та їх обговорення

Кількість клітинних агрегатів у напіврідкому агарі *in vitro* використовується як тест-система для перевірки впливу хіміотерапевтичних препаратів на клітини пухлини. При гемобластозах у багатьох дослідженнях продемонстровано пряму кореляцію між результатами культивування та клінічною картиною пацієнтів (Maayan

et al., 2009). Саме цей феномен наштовхнув нас на думку дослідити особливості функціонування гемопоетичних клітин пацієнтів, які мали різний характер відповіді на терапію ІТК з метою пошуку функціональних і морфологічних особливостей клітин кісткового мозку при ХМЛ, що могли б мати прогностичне значення для оцінки подальшого перебігу хвороби.

На першому етапі досліджень необхідно було встановити оптимальний термін культивування гемопоетичних клітин пацієнтів із ХМЛ, який визначали емпірично. Для цього кожні дві доби підраховували кількість клітинних агрегатів у комірці планшета. Результати дослідження виявили, що при ХМЛ кластери з'являлися на 3-тю добу культивування у великій кількості ($115,5 \pm 1,2$) (рис. 1). До 9-ї доби культивування їх кількість дещо збільшувалася, але недостовірно, і надалі продовжувала стрімко зменшуватися. Крім того, на 3-тю добу культивування також з'являлися невеликого розміру колонії (40–50 клітин). У випадку кластерів кількість колоній

компактного типу до 9-ї доби культивування збільшувалася недостовірно, а з 11-ї по 13-тю добу їх кількість досягла максимуму ($70,7 \pm 12,1$) й у цей період збільшувалася не лише їх кількість, а й розміри. Починаючи з 13-ї доби культивування кількість колоній компактного типу почала поступово зменшуватися. Невеликого розміру колонії дифузного типу при ХМЛ у культурі з'явилися одночасно з іншими клітинними агрегатами, але до 13-ї доби культивування їх кількість не перевищувала 33% загальної кількості клітинних агрегатів у комірці планшета. Однак, надалі (починаючи з 13-ї доби культивування), паралельно зі зменшенням кількості кластерів і колоній компактного типу, число колоній дифузного типу поступово зростало. Ми можемо припустити, що причиною цього було поступове диференціювання клітин до макрофагів, які набували здатності рухатися у напіврідкому агарі. Це сприяло зменшенню кількості колоній компактного типу у комірці планшета (Cheryl, 2012).

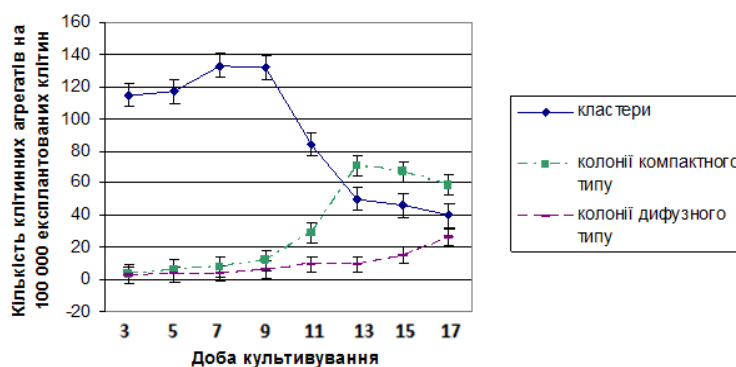


Рис. 1. Залежність кількості колоній, що утворилися в комірці планшета, від доби культивування

Для перевірки нашого припущення відбирали клітинні агрегати, виготовляли препарати на цитоцентрифузі та забарвлювали за Паппенгеймом. Результати морфологічного аналізу внутрішнього складу колоній у напіврідкому агарі *in vitro* свідчили про те, що кількість бластних клітин у культурі була високою до 9-ї доби культивування, коливаючись у межах 16–29% (рис. 2). При цьому їх кількість на 5-ту добу культивування удвічі зменшувалася порівняно з 3-тю ($16 \pm 0,8\%$), але до 9-ї доби все ж продовжувала зростати. Починаючи з 11-ї доби культивування кількість бластних клітин в агрегатах почала поступово зменшуватися, однак на 17-ту добу культивування їх кількість сягала $6 \pm 0,1\%$, що є свідченням високої проліферативної активності клітин лейкемічного клону, незважаючи на тривалий термін культивування. Кількість

промієлоцитів та мієлоцитів у клітинних агрегатах суттєво не відрізнялася протягом усього терміну культивування (14–22% і 18–32%, відповідно). Подібна картина спостерігалася й у випадку метамієлоцитів, але після 13-ї доби культивування їх кількість почала поступово зменшуватися ($321 \pm 1,6\%$ на 13-ту до $14 \pm 0,5\%$ на 17-ту добу культивування). Кількість сегментоядерних гранулоцитів з 3-ї по 11-у добу культивування збільшувалася до $15 \pm 0,7\%$, а починаючи з 13-ї доби поступово зменшувалася (імовірно, за рахунок того, що частина сегментоядерних гранулоцитів диференціювалася на макрофаги, кількість яких починаючи з 13-ї доби культивування стрімко збільшувалася). На 15-ту добу культивування кількість макрофагів зросла утричі ($21 \pm 0,6\%$ загальної кількості клітин), а на 17-ту добу – більше ніж учетверо ($34 \pm 1,3\%$).

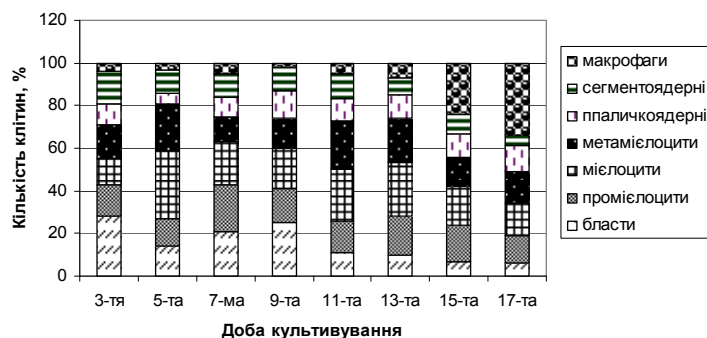


Рис. 2. Залежність внутрішнього складу клітинних агрегатів від доби культивування

Ураховуючи особливості колонієутворення та внутрішній склад клітинних агрегатів у напіврідкому агарі *in vitro*, оптимальним терміном культивування клітин кісткового мозку пацієнтів при ХМЛ є 13 діб, оскільки саме на цю добу спостерігалася максимальна кількість колоній компактного типу та невелика кількість макрофагальних клітин, що сприятиме адекватній оцінці функціональних і морфологічних особливостей гемопоетичних стовбурових клітин та клітин-попередників у культурі *in vitro*.

У результаті аналізу функціональної активності клітин кісткового мозку пацієнтів різних груп виявилось, що у хворих із відсутністю відповіді на терапію нілотинібом та у пацієнтів, у яких уперше діагностовано ХМЛ, статистично достовірної різниці між кількістю колоній у

напіврідкому агарі *in vitro* не було ($147,0 \pm 4,6$ та $148,0 \pm 2,2$ колоній на 1×10^5 експлантованих мієлокаріоцитів, відповідно) (рис. 3). Натомість, у пацієнтів, які характеризувалися відсутністю відповіді на терапію іматинібом, колонієтворна активність була в 1,6 раза меншою ($90,8 \pm 2,8$ на 1×10^5 експлантованих клітин). У випадку пацієнтів з оптимальною відповіддю на ІТК колонієтворна активність була значно нижчою. У культурі клітин кісткового мозку пацієнтів, які мали оптимальну відповідь на терапію іматинібом, кількість колоній становила $48,1 \pm 1,8$ на 1×10^5 експлантованих мієлокаріоцитів, а у пацієнтів з оптимальною відповіддю на нілотинібом кількість колоній у напіврідкому агарі *in vitro* сягала $30,1 \pm 7,6$ на 1×10^5 експлантованих мононуклеарів.

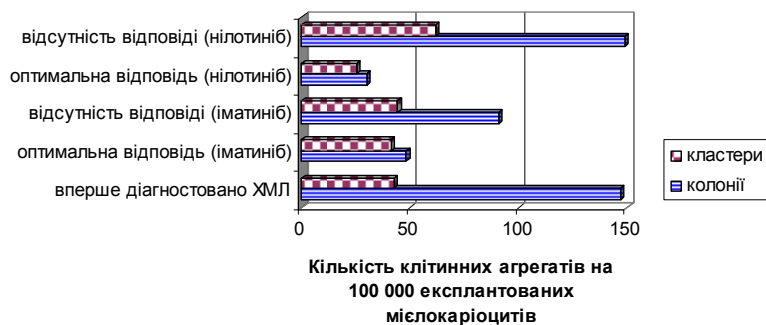


Рис. 3. Результати культивування в напіврідкому агарі *in vitro* кісткового мозку пацієнтів із ХМЛ

Подібні відмінності, але тільки на рівні тенденції, спостерігалися і для середніх значень кластерів. У культурі клітин кісткового мозку пацієнтів, у яких уперше діагностовано ХМЛ, кількість кластерів у культурі клітин *in vitro* становила $42,8 \pm 4,7$ на 1×10^5 експлантованих мієлокаріоцитів. У пацієнтів, які характеризувалися відсутністю відповіді на терапію іматинібом, їх кількість недостовірно збільшилася до $44,3 \pm 1,1$ на 1×10^5 експлантованих клітин, а у пацієнтів із відсутністю відповіді на терапію нілотинібом кількість кластерів була найвищою ($61,3 \pm 4,7$ на 1×10^5 експлантованих мієлокаріоцитів). У культурі клітин кісткового мозку пацієнтів, які через рік після початку терапії характеризувалися оптимальною відповіддю на терапію іматинібом, кількість кластерів становила $41,3 \pm 1,4$ на 1×10^5 експлантованих клітин, а в культурі клітин кісткового мозку пацієнтів, які характеризувалися оптимальною відповіддю на терапію нілотинібом, кількість кластерів була в 1,4 раза вищою ($61,8 \pm 3,7$ на 1×10^5 експлантованих мієлокаріоцитів).

Як відомо з літературних джерел, при ХМЛ у кістковому мозку пацієнтів спостерігається накопичення мієлоцитарних клітин (Corbin et al., 2011). При прогресуванні захворювання до фази акселерації та бластного кризу спостерігається порушення дозрівання клітин мієлоїдного ростка кровотворення та зменшення кількості зрілих форм, тобто паличкоядерних і сегментоядерних гранулоцитів (Grineeva et al., 2009). Однак те, яким чином терапія ІТК впливає на диференціювання клітин кісткового мозку в напіврідкому агарі *in vitro*, досі чітко не з'ясовано. Тому для оцінки особливостей морфологічного складу клітин кісткового мозку пацієнтів із різним характером відповіді на терапію ІТК після культивування *in vitro* колонії та кластери вилуча-

ли з напіврідкого агару, готували препарати на цитоцентрифузі та забарвлювали за Паппенгеймом. У цитологічних препаратах клітинних агрегатів пацієнтів з уперше діагностованою ХМЛ спостерігалася висока чисельність бластних клітин (близько $14 \pm 0,6\%$ загальної кількості, рис. 4). У пацієнтів з оптимальною відповіддю на терапію іматинібом кількість бластних клітин була значно меншою ($7 \pm 0,2\%$), а у пацієнтів з оптимальною відповіддю на нілотинібом кількість бластних клітин була найменшою ($5 \pm 0,1\%$ загальної кількості клітин в агрегаті). У хворих, які характеризувалися відсутністю відповіді на терапію іматинібом, кількість бластних клітин у колоніях і кластерах на 13-ту добу культивування становила $12 \pm 0,4\%$, а у пацієнтів із відсутністю відповіді на терапію нілотинібом кількість бластних клітин була дещо меншою ($8 \pm 0,1\%$). Подібні результати отримано Catriona et al. (2004), які досліджували ранні клітини-попередники кісткового мозку за допомогою методів проточної цитофлуориметрії та виявили, що у пацієнтів з оптимальною відповіддю на іматиніб відбувається значне зниження CD34+Lin-клітин, а кількість мієлоїдних попередників повертається до норми, у той час, як у зразках кісткового мозку пацієнтів зі стійкістю до іматинібу відмічається збільшення кількості ранніх гранулоцито-макрофагальних клітин-попередників.

Разом із цим, у пацієнтів різних груп статистично достовірної різниці у кількості промієлоцитарних та мієлоцитарних клітин не спостерігалось. У хворих із відсутністю відповіді на терапію ІТК та у пацієнтів з уперше діагностованою ХМЛ відзначалося переважання недиференційованих клітин мієлоїдного ростка кровотворення (сумарної кількості бластних, промієлоцитарних, мієлоцитарних і метамієлоцитарних клітин). У хво-

рих із відсутністю відповіді на терапію іматинібом кількість недиференційованих клітин становила $70 \pm 2,9\%$, у пацієнтів із відсутністю відповіді на терапію нілотинібом їх кількість складала $65 \pm 3,1\%$ загальної

кількості клітин в агрегатах. У цитологічних препаратах кісткового мозку пацієнтів з уперше діагностованою ХМЛ кількість недиференційованих клітин у колоніях і кластерах становила $80 \pm 2,7\%$.

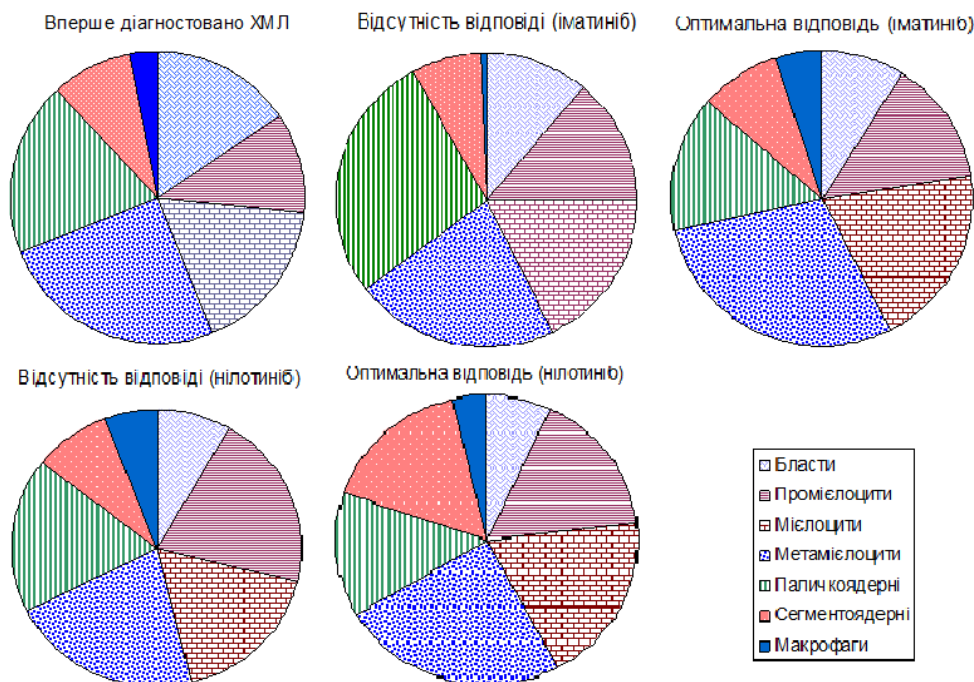


Рис. 4. Внутрішній склад клітинних агрегатів, отриманих у результаті культивування кісткового мозку при ХМЛ у культурі клітин *in vitro*

Кількість паличкоядерних гранулоцитів у пацієнтів з уперше діагностованою ХМЛ становила $22 \pm 1,3\%$, а у пацієнтів з оптимальною відповіддю на іматиніб та нілотиніб їх кількість була значно меншою ($12 \pm 0,2\%$ та $13 \pm 0,4\%$, відповідно). У пацієнтів із відсутністю відповіді на іматиніб кількість паличкоядерних гранулоцитів була найвищою ($30 \pm 2,5\%$ загального числа клітин у колоніях і кластерах). У хворих зі стійкістю до нілотинібу кількість паличкоядерних клітин гранулоцито-макрофагального ряду була значно меншою ($23 \pm 1,7\%$ клітин в агрегаті).

Кількість макрофагів у цитологічних препаратах колоній і кластерів клітин кісткового мозку пацієнтів, які як таргетну терапію отримували препарат нілотиніб, була вищою, ніж у пацієнтів з уперше діагностованою ХМЛ та у хворих, які як протилейкемічну терапію отримували іматиніб. У пацієнтів з уперше діагностованою ХМЛ кількість макрофагів сягала $3,5\%$, у пацієнтів з оптимальною відповіддю на іматиніб – $4 \pm 0,1\%$, нілотиніб – $3,7 \pm 0,1\%$. У хворих із відсутністю відповіді на іматиніб кількість макрофагів становила близько 1% , а у пацієнтів зі стійкістю до терапії нілотинібом кількість макрофагів була значно вищою ($5,6 \pm 0,2\%$ загальної кількості клітин у колоніях та кластерах на 13-ту добу культивування).

Таким чином, у разі формування стійкості до препаратів ІТК відновлювався пул лейкемічних клітин із переважанням ранніх форм клітин мієлоїдного ростка кровотворення, як і в пацієнтів з уперше діагностованою ХМЛ. Крім цього, спостерігалася тенденція, коли за більшої кількості клітин, які мають Ph-хромосому, ви-

значалося більше ранніх форм мієлоїдних клітин у колоніях і кластерах кісткового мозку пацієнтів, що могло свідчити про прогресування захворювання до фази акселерації та бластного кризу (Ruibao, 2005).

Як відомо, при ХМЛ мієлоїдна ланка кровотворення розширюється на всіх стадіях дозрівання. Це відбувається у результаті порушення балансу між самооновленням і диференціюванням, у результаті чого в напіврідкому агарі *in vitro* спостерігається підвищення проліферативного потенціалу клітин кісткового мозку (Faderl et al., 2005). Використання ІТК дозволяє пригнічувати проліферативну перевагу Ph⁺-клітин, сприяючи відновленню нормального гемопоєзу (Zhang et al., 2010). У пацієнтів, які мають оптимальну відповідь на терапію ІТК, тобто у їх кістковому мозку наявно 0% клітин із Ph-хромосомою, спостерігалася значне зниження кількості колоній і кластерів у культурі клітин *in vitro*. У пацієнтів, які характеризувалися резистентністю до терапії ІТК, кількість колоній і кластерів достовірно не відрізнялася від кількості таких у пацієнтів, у яких ХМЛ діагностовано уперше. Це могло бути спричинене тим, що після набуття клітинами резистентності до препарату пул Ph⁺ клітин поступово відновлювався й у клітинах кісткового мозку хворих знову накопичувалися ранні клітини-попередники, що характеризувалися високою проліферативною активністю. Причини резистентності до ІТК могли бути пов'язані з мутаціями у гені BCR-ABL, його ампліфікацією, зменшенням поглинання препарату клітинами лейкемічного клону або підвищенням рівня відтоку ІТК (Zhang et al., 2010).

Також на основі проведених досліджень виявився феномен зменшення кількості колоній у пацієнтів, які мали оптимальну відповідь на нілотиніб, порівняно з пацієнтами, які характеризувалися оптимальною відповіддю на препарат іматиніб. Це могло бути пов'язано з тим, що нілотиніб у 20 разів ефективніший за іматиніб, має здатність впливати на примітивні CD34+ клітини (O'Sullivan et al., 2011). Із даних літератури також відомо, що пацієнти з ХМЛ при лікуванні ІТК, навіть у разі повної цитогенетичної відповіді на терапію, все ж таки залишаються BCR-ABL-позитивними (Rosti et al., 1995). Це свідчить про те, що в їх кістковому мозку залишаються клітини, які підтримують експресію гена BCR-ABL, тобто залишаються клітинами лейкемічного клону. Можливо, нілотиніб елімінує ці клітини, що відбивається у меншій кількості колоній у пацієнтів з оптимальною відповіддю на нілотиніб, порівняно з кількістю таких у пацієнтів з оптимальною відповіддю на іматиніб. Деякі дослідники стверджують, що нілотиніб не специфічний винятково до BCR-ABL тирозинкінази, але він здатен пригнічувати також кіназу c-Abl, що може викликати інгібування формування колоній у культурі *in vitro* (O'Sullivan et al., 2011).

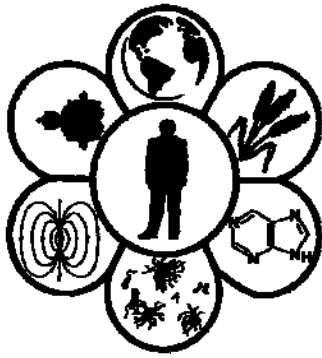
Висновки

ІТК здатні пригнічувати функціональну активність клітин кісткового мозку пацієнтів із ХМЛ. Спостерігалось значне зниження кількості колоній у пацієнтів, які мали оптимальну відповідь на терапію нілотинібом порівняно з пацієнтами, які мали оптимальну відповідь на терапію іматинібом. У разі набуття клітинами лейкемічного клону стійкості до ІТК, рівень функціональної активності гемопоетичних стовбурових клітин та клітин попередників пацієнтів відновлювався до рівня такого у хворих з уперше діагностованою ХМЛ. У пацієнтів із набутою резистентністю до ІТК першого та другого покоління у клітинних агрегатах спостерігалось переважання ранніх форм клітин гранулоцито-макрофагального ростка кровотворення. Отримані дані свідчать про те, що зміни функціональної активності гемопоетичних стовбурових клітин та клітин-попередників відображають рівень лейкемічної трансформації клітин кісткового мозку при ХМЛ і можуть використовуватися як додатковий метод моніторингу відповіді пацієнтів на терапію препаратами ІТК першого та другого покоління.

Бібліографічні посилання

- Bacco Di, A., Keeshan, K., McKenna, S.L., 2000. Molecular abnormalities in chronic myeloid leukemia: Deregulation of cell growth and apoptosis. *Oncologist* 5, 405–415.
- Baran, Y., Saydam, G., 2012. Cumulative clinical experience from a decade of use: Imatinib as first-line treatment of chronic myeloid leukemia. *J. Blood Med.* 3, 139–150.
- Belle, L., Bruck, F., Foguene, J., 2012. Imatinib and nilotinib inhibit hematopoietic progenitor cell growth, but do not prevent adhesion, migration and engraftment of human cord blood CD34+ cells. *PLoS One* 7(12), e52564.
- Chen, Y., Peng, C., Sullivan, C., 2010. Critical molecular pathways in cancer stem cells of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 24(9), 1545–1554.
- Helgason, C.D., Helgason, C.L.M., 2012. Basic cell culture protocols. 3rd ed. Vol. 290. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Corbin, A.S., Agarwal, A., Loriaux, M., 2011. Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity. *J. Clin. Invest.* 121, 396–409.
- Falder, S., Talpaz, M., Estrov, Z., 1999. The biology of chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 15, 164–172.
- Frazer, R., Irvine, A., McMullin, M.F., 2007. Chronic myeloid leukaemia in the 21st century. *Ulster Med. J.* 76(1), 8–17.
- Grineva, N.I., Ahlynina, T.V., Gerasimova, L.P., 2009. Razlichija v proliferacii i differencirovke Ph+ kletok ot individual'nyh bol'nyh HML v suspenzionnoj kul'ture. Ph+ kletki s vysokoj skorost'ju proliferacii [Differences in proliferation and differentiation of Ph+ cells from CML patients in individual suspension culture. Ph+ cells with high proliferation rates]. *Jeksperimental'naja Onkologija* 8, 53–68 (in Russian).
- Jamieson, C.H.M., Ailles, L.E., Dylla, S.J., Muijtjens, M., Jones, C., Zehnder, J.L., Gotlib, J., Li, K., Manz, M.G., Keating, A., Sawyers, C.L., Weissman, I.L., 2004. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N. Engl. J. Med.* 351(7), 657–667.
- Jorgensen, H.G., Allan, E.K., Jordanides, N.E., 2007. Nilotinib exerts equipotent antiproliferative effects to imatinib and does not induce apoptosis in CD34+ CML cells. *Blood* 109, 4016–4019.
- Lenaerts, T., Castagnetti, F., Traulsen, A., 2011. Explaining the *in vitro* and *in vivo* differences in leukemia therapy. *Cell Cycle* 15, 1540–1544.
- Mayani, H., Flores-Figueroa, E., Chavez-Gonzalez, A., 2009. *In vitro* biology of human myeloid leukemia. *Leukemia Res.* 33, 634–637.
- Deininger, M.W.N., Goldman, J.M., Melo, J.V., 2000. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 96(10), 3343–3355.
- Mughal, A., Aslam, M., Khan, A.M.H., Saleem, S., Umar, R., Saleem, M., 2013. Bcr-Abl tyrosine kinase inhibitors – current status. *Infect. Agents Cancer* 8(1), 23.
- Mukhopadhyay, A., Dasgupta, S., Mukhopadhyay, S., 2012. Imatinib mesylate therapy in patients of chronic myeloid leukemia with philadelphia chromosome positive: An experience from Eastern India. *Indian J. Hematol. Blood Transfus.* 28(2), 82–88.
- O'Sullivan, S., Lin, J.M., Watson, M., 2011. The skeletal effects of the tyrosine kinase inhibitor nilotinib. *Bone* 49, 281–289.
- Rosti, V., Bergamaschi, G., Lucotti, C., 1995. Oligodeoxynucleotides antisense to c-abl specifically inhibit entry into S-phase of CD34+ hematopoietic cells and their differentiation to granulocyte-macrophage progenitors. *Blood* 86, 3387–3393.
- Ruibao, R., 2005. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukemia. *Nat. Rev. Cancer* 5, 172–183.
- Weisberg, E., Catley, L., Renee, D., 2007. Beneficial effects of combining nilotinib and imatinib in preclinical models of BCR-ABL leukemias. *Blood* 109, 2112–2120.
- Zhang, B., Strauss, A.C., Chu, S., 2010. Effective targeting of quiescent chronic myelogenous leukemia stem cells by histone deacetylase inhibitors in combination with imatinib mesylate. *Cancer Cell* 17(5), 427–442.

Надійшла до редколегії 12.07.2014



УДК 579.61:616-078

Співвідношення аеробної та анаеробної мікрофлори урогенітального тракту при дисбактеріозі у жінок м. Дніпропетровськ

А.Г. Ядерна¹, Л.П. Голодок², А.І. Вінніков²

¹Діагностичний центр Дніпропетровської медичної академії, Дніпропетровськ, Україна

²Дніпропетровський національний університет імені Олеса Гончара, Дніпропетровськ, Україна

Методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у режимі реального часу досліджено кількісні характеристики нормальної та умовно-патогенної аеробної / факультативно-анаеробної, анаеробної біоти в уретрі, цервікальному каналі та піхві здорових дівчат і жінок віком 10–40 років. У всіх жінок до 40 років і частини жінок віком понад 40 років біота представлена переважно лактобацилами. У частини жінок після 40 років мікробний склад біоценозу характеризується зниженням кількості лактобацил і заміщенням їх анаеробними мікроорганізмами, головним чином *Atopobium vaginae* (16%), *Gardnerella vaginalis* (12%), *Megasphaera spp.* (8%), *Dialister spp.* (8%), *Eubacterium spp.* (8%) і *Porphyromonas spp.* (4%). У рідкісних випадках має значення також і великий спектр інших збудників, у тому числі патогенних: *Trichomonas vaginalis* (8%), *Mycoplasma genitalium* (4%), *Neisseria gonorrhoeae* (2%) і *Chlamydia trachomatis* (1%). Найчастіше зустрічалися асоціації штамів: *A. vaginae* та *G. vaginalis*, *Eubacterium spp.* та *Porphyromonas spp.*, *U. (urealyticum + parvum)* та *M. genitalium*, *N. gonorrhoeae* та *Ch. trachomatis*, *U. (urealyticum + parvum)* та *Candida spp.* Це пов'язано з анатомо-фізіологічними особливостями статевих органів, гормональним фоном і дією імунної системи. Кількісне дослідження біоти уrogenітального тракту жінок м. Дніпропетровськ за допомогою ПЛР у реальному часі – адекватний метод діагностики фізіологічних і патологічних змін, що дозволяє діагностувати дисбіотичні порушення на ранніх етапах і запобігти їх подальшому розвитку у складніші форми.

Ключові слова: ПЛР у режимі реального часу; уrogenітальний тракт; репродуктивний вік

Correlation between aerobic and anaerobic microflora of the urogenital tract at dysbiosis in women of Dnipropetrovsk city

A.H. Yaderna¹, L.P. Golodok², A.I. Vinnikov²

¹Diagnostic Center of Dnipropetrovsk Medical Academy, Dnipropetrovsk, Ukraine

²Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Dnipropetrovsk, Ukraine

The method of polymerase chain reaction (PCR) in real-time was used to analyze the quantitative characteristics of normal and potentially pathogenic aerobic/facultative-anaerobic and anaerobic biota in the urethra, cervical channel and vagina in healthy women aged 10–40. The biota of all the women under 40 years and some of women older than 40 was mostly represented by lactobacilli. Microbial composition of the biocenosis in some women older than 40 is characterized by reduction in quantity of lactobacilli and their replacement by anaerobic microorganisms, mainly, such as *Atopobium vaginae* (16%), *Gardnerella vaginalis* (12%), *Megasphaera spp.* (8%), *Dialister spp.* (8%), *Eubacterium spp.* (8%) and *Porphyromonas spp.* (4%). Rarely, a wide range of other pathogens plays its role, including inter alia: *Trichomonas vaginalis* (8%), *Mycoplasma genitalium* (4%), *Neisseria gonorrhoeae* (2%) and *Chlamydia trachomatis* (1%). The most frequent are the following strain associations: *A. vaginae* and *G. vaginalis*, *Eubacterium spp.* and *Porphyromonas spp.*, *U. (urealyticum + parvum)* and *M. genitalium*, *N. gonorrhoeae* and *Ch. trachomatis*, *U. (urealyticum + parvum)* and *Candida spp.* This is connected with anatomical and physiological characteristics of genitals, hormonal and immune system action. Quantitative study of the biota of urogenital tract in Dnipropetrovsk women with the use of real-time PCR is the sensitive method for diagnosing both physiological and pathological changes, and dysbiotic disorders at early stages and preventing their further development into more serious forms.

Keywords: PCR in real time; urogenital tract; child-bearing potential

Вступ

Одна з найважливіших медико-соціальних проблем – інфекційна патологія репродуктивної системи жінки. Провідне місце у структурі даної патології посідають запальні процеси, викликані умовно-патогенними мікроорганізмами. За даними різних авторів (Larsen et al., 2001; Reid et al., 2003; Klebanoff et al., 2004), частота бактеріальних інфекцій уrogenітального тракту сягає 80% серед патологічних станів жіночої статеві сфери. На фоні урбанізації людського суспільства та наростання екологічних проблем, в «еру антибіотиків» та в умовах дії інших факторів, що впливають на імунний статус макроорганізму, відбуваються значні зміни у складних біоценозах організму.

За даними численних досліджень (Reid et al., 2003; David et al., 2005; Kaites et al., 2005; Fredricks et al., 2007), мікрофлора уrogenітального тракту представлена в основному мікробіотою (бактеріальні мікроорганізми), мікобіотою (гриби), а також вірусами та найпростішими, сукупність яких забезпечує колонізаційну резистентність. Дисбаланс біоти уrogenітального тракту жінок являє собою порушення кількісних і якісних взаємин резидентних мікроорганізмів (сапрофітних і умовно-патогенних), які населяють сечостатеву систему в нормі. Розвиток дисбалансу біоти уrogenітального тракту може супроводжуватися метаболічними та імунними порушеннями, та в ряді випадків клінічними проявами, ступінь вираженості яких варіює від безсимптомного носійства до виражених клінічних проявів (Ferris et al., 2004).

Численні дослідження низки авторів (Larsen et al., 2001; Witkin et al., 2007) довели, що етіологічна структура уrogenітальних інфекцій представлена асоціацією декількох мікроорганізмів. Клінічна картина, у свою чергу, характеризується стертим, малосимптомним перебігом, відсутністю специфічних клінічних симптомів, схильністю до хронізації та багатовогнищевим інфікуванням, що неминуче спричинює пізню діагностику, нерідко вже на стадії розвитку ускладнень із боку репродуктивної системи. Результати досліджень американських учених (Newton, 2001; Gupta et al., 2004; Aila et al., 2010) показали, що майже у 50% випадків на первинному прийомі діагностується ускладнений перебіг уrogenітальних інфекцій у жінок. Все вказане дозволяє розглядати проблему уrogenітального дисбактеріозу, асоційовану з умовно-патогенною біотою, як актуальну, важливу в медико-соціальному відношенні для м. Дніпропетровськ, яке посідає одне з провідних місць щодо розповсюдження інфекцій сечостатевої системи.

Мета даного дослідження – встановити частоту виділення умовно-патогенних мікроорганізмів з уrogenітального тракту жінок різних вікових груп у м. Дніпропетровськ, дослідити співвідношення аеробної та анаеробної мікрофлори уrogenітального тракту при дисбактеріозі.

Матеріал і методи досліджень

На першому етапі дослідження обстежено 100 жінок віком 15–45 років. Для аналізу динаміки змін мікробного пейзажу сечостатевої системи пацієнток поділили на три

вікові групи: I група – підлітки 10–15 років (13 дівчат), II – 49 жінок віком 16–30 років, III група – 38 жінок віком 31–45 років. Усім досліджуваним проведено комплексне обстеження, яке передбачало оцінку їх клінічного стану, збирання анамнезу, скарг, зовнішнього огляду; бактеріоскопічного дослідження виділень і бактеріологічного дослідження. Для бактеріоскопічного та бактеріологічного дослідження за загальноприйнятою методикою проводився забір виділень із поверхні шийки матки, цервікального каналу та піхви. Основним живильним середовищем для висіву біологічного матеріалу був 5% кров'яний агар. Додатково використані селективні живильні середовища: середовище Плоскірева, середовище Ендо, середовище Сабуро та жовтково-сольовий агар.

Наступний етап досліджень – аналіз співвідношення аеробної та анаеробної мікрофлори 125 жінок віком 18–45 років при дисбіотичних порушеннях за допомогою ПЛР у реальному часі. Залежно від наявності та ступеня вираженості клінічних проявів пацієнток розділили на дві групи: I група – «норма» (75 пацієнток, які не мали суб'єктивної та об'єктивної клінічної симптоматики), II група – «скарги» (50 пацієнток, які пред'являли скарги за відсутності об'єктивної клінічної та наявності суб'єктивної симптоматики). У частини здорових фертильних жінок понад 40 років відбувається зниження колонізації уrogenітального тракту лактобацилами порівняно з молодшими фертильними жінками. У зв'язку з цим жінок із групи «норма» залежно від віку поділили на дві підгрупи: Ia – молодші 40 років і Ib – понад 40 років. Жінок групи «скарги» поділили на дві групи: Па – молодші 40 та Пб – понад 40 років. Матеріалом для дослідження методом ПЛР у реальному часі служив зскрібок епітеліальних клітин (задньобочковий звід піхви). Клінічний матеріал отримують одноразовим стерильним інструментом типу «Cytobrush». Отриманий клінічний зразок поміщають у пробірку типу «Еппендорф», що містить транспортне середовище.

Результати та їх обговорення

На першому етапі досліджень вивчено мікробний пейзаж уrogenітального тракту жінок різних вікових груп. Під час обстеження усіх пацієнток виділено 83 штами умовно-патогенних мікроорганізмів. Після ідентифікації за фізіологічними та біохімічними ознаками виділені культури віднесено до таких видів: 51 штама *Escherichia coli*, 17 штамів *Staphylococcus aureus*, 6 штамів *Candida albicans*, 5 штамів *Proteus vulgaris*, 2 штами *Streptococcus faecalis* та 2 штами *Klebsiella pneumoniae*.

Аналіз частоти виділення умовно-патогенних мікроорганізмів при дисбіозах показав, що найчастіше збудниками захворювання виявлялись уropатогенні штами: 61,4% виділених культур належали до *E. coli*, 20,5% – до *S. aureus*, 7,2% – до *C. albicans*. Із меншою частотою траплялися *Proteus vulgaris* – 6,0%, *Streptococcus faecalis* – 2,4%, *K. pneumoniae* – 2,4%. У дівчат віком 10–15 років найчастіше виявлялись *E. coli* (62,5%) та *S. aureus* (25,0%), і лише 6,3% культур належали до *C. albicans* і *P. vulgaris*. Така картина зумовлена анатомо-фізіологічними особливостями статевих органів, періодом гормонального спокою та відсутністю лакто-

бацил. Від пацієнток віком 16–30 років виділили клінічні штами, які ідентифікували як *E. coli* (54,2%), *S. aureus* (20,8%) і *C. albicans* (10,4%). Також виявлено *P. vulgaris* – 6,2%, *S. faecalis* та *K. pneumoniae* – 4,2%. У жінок репродуктивного віку зростає рівень естрогену, накопичується велика кількість глікогену, що стимулює розмноження лактобацил, які, у свою чергу, продукують велику кількість молочної кислоти, підкислюючи середовище піхви. Такі умови стають сприятливими для розмноження дріжджових грибів *C. albicans* (10,4%). Але з віком рівень естрогену та кількість лактобацил знижуються, що зумовлює поступове зрушення *pH* до нейтрального, зменшення кількості дріжджів і контамінації мікроорганізмами кишкової групи. Внаслідок цього у віковій групі 31–45 років порівняно з попередньою збільшується частота виділення клінічних ізолятів *E. coli* (78,9%) та *S. aureus* (15,8%). У невеликій кількості трапляються культури *P. vulgaris* (5,3%).

Таким чином, колонізація мікроорганізмами біотопу піхви в досліджуваних групах істотно відрізнялася у жінок різного віку: гриби роду *Candida* в найбільшій кількості виділені у жінок віком 16–30 років (10,4%), лише 6,3% складала у підлітків і взагалі не виявлені у жінок віком 31–45 років.

На наступному етапі досліджень провели детальніший аналіз складу мікрофлори 125 жінок репродуктивного віку за допомогою ПЛР у реальному часі, що дозволяє отримувати як якісну, так і кількісну оцінку вагінального мікробіоценозу та проводити адекватну етіотропну терапію дисбіозів. Методом ПЛР у реальному часі дослідили співвідношення аеробних і анаеробних мікроорганізмів у жінок, які не мали суб'єктивної та об'єктивної клінічної симптоматики (табл.).

Таблиця

Частота виділення аеробних і анаеробних бактерій з урогенітального тракту жінок, які не мали суб'єктивної та об'єктивної клінічної симптоматики протягом червня – липня 2013 року

| Вид мікроорганізму | | Частота виділення клінічних штампів мікроорганізмів, % | |
|----------------------|------------------------------|--|---------------------|
| | | Ia підгрупа, n = 50 | Iб підгрупа, n = 25 |
| Аеробна мікрофлора | <i>Lactobacillus spp.</i> | 92 | 40 |
| | <i>Escherichia coli</i> | 8 | 8 |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> | 4 | 4 |
| | <i>Candida albicans</i> | 2 | 4 |
| Анаеробна мікрофлора | <i>Atopobium vaginae</i> | – | 16 |
| | <i>Megasphaera spp.</i> | – | 8 |
| | <i>Dialister spp.</i> | – | 8 |
| | <i>Gardnerella vaginalis</i> | 2 | 12 |
| | <i>Porphyromonas spp.</i> | – | 4 |
| | <i>Eubacterium spp.</i> | – | 8 |

У жінок віком до 40 років кількість умовно-патогенних мікроорганізмів відповідала нормоценозу, а у пацієнток віком понад 40 років зі зниженою кількістю лактобацил виявлено збільшення кількості анаеробних умовно-патогенних мікроорганізмів. Таким чином, у жінок після 40 років за відсутності атрофічних змін в урогенітальному тракті відбувається заміщення лактобацил на широкий спектр анаеробних бактерій. На рисунку 1 наведено співвідношення аеробних і анаеробних

мікроорганізмів у жінок, які не мали суб'єктивної та об'єктивної клінічної симптоматики.

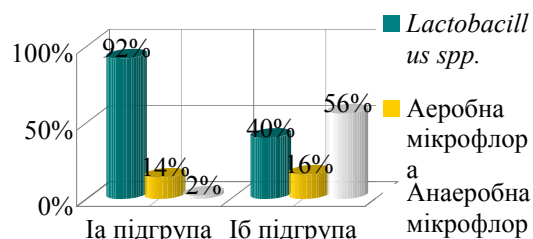


Рис. 1. Співвідношення аеробної та анаеробної мікрофлори урогенітального тракту жінок без суб'єктивної та об'єктивної симптоматики:

Ia підгрупа – жінки до 40 років із переважно лактобацилярною біотою, Iб підгрупа – жінки віком понад 40 років зі зниженим рівнем лактобацил

У жінок молодше 40 років частота виявлення лактобацил становить 92%, співвідношення аеробів і анаеробів відповідало нормоценозу. Частота виділення анаеробних бактерій у всіх обстежених жінок віком понад 40 років, на відміну від аеробних (факультативно-анаеробних), перевищувала рівень лактобацил (40%).

Вивчення частотного розподілу мікроорганізмів показало, що у більшості жінок без суб'єктивної та об'єктивної клінічної симптоматики збудники не виявлені, у 24% виявлені у вигляді бактеріальної моноінфекції, головним чином *Dialister spp.*, *Megasphaera spp.* і лише у 8% жінок спостерігали асоціації мікроорганізмів *A. vaginae* та *G. vaginalis*, *Eubacterium spp.* та *Porphyromonas spp.*

Проводячи детальний аналіз умовно-патогенної та патогенної мікрофлори жінок, що пред'являли скарги за відсутності об'єктивної та наявності суб'єктивної клінічної симптоматики (група «скарги»), виділили патогенні штами мікроорганізмів, які віднесли до *Ureaplasma urealyticum + parvum*, *Candida sp.*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma genitalium*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*. У 32% жінок зі «скаргами» жоден із досліджених мікроорганізмів виявлений не був, визначався нормальний рівень лактобацил (відносний показник коливався від 0,3 до 0 або 70–100%). В обох підгрупах жінок, які пред'являли скарги за наявності суб'єктивної клінічної симптоматики, виділені мікроорганізми містилися майже в однаковому відсотковому співвідношенні. У високих титрах виявлено *Ureaplasma (urealyticum + parvum)* (> 10⁴, 31%) та *Candida spp.* (21%). У 8% жінок виявлено *Trichomonas vaginalis*, у 4% – *Mycoplasma genitalium*, у 1% – *Chlamydia trachomatis* та у 2% – *Neisseria gonorrhoeae*. Таким чином, найвірогіднішою причиною появи різноманітних скарг за відсутності об'єктивних клінічних ознак запалення в урогенітальному тракті є, за нашими спостереженнями, *Ureaplasma (urealyticum + parvum)* і гриби роду *Candida*. У рідкісних випадках має значення також і великий спектр інших збудників, у тому числі патогенних.

Інфікування одним збудником у групі «скарги» (рис. 2) складало лише 16%. У цій групі також помічено тенденцію до збільшення асоціацій мікроорганізмів відносно моноінфекцій.

Моноінфекції викликані, головним чином *Ureaplasma spp.*, *T. vaginalis*. Спостерігали асоціації мікроорганізмів: *Ureaplasma (urealyticum + parvum)* та *Mycoplasma genitalium*, *Neisseria gonorrhoeae* та *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma (urealyticum + parvum)* та *Candida spp.*

ПЛР у реальному часі, проведене в групі жінок із наявністю суб'єктивних симптомів, показало, що за відсутності об'єктивних клінічних симптомів запалення наявне як у жінок до 40 років, так і у жінок віком понад 40 років та виявляється частіше, ніж у пацієнок, які не мають суб'єктивної та об'єктивної клінічної симптоматики.

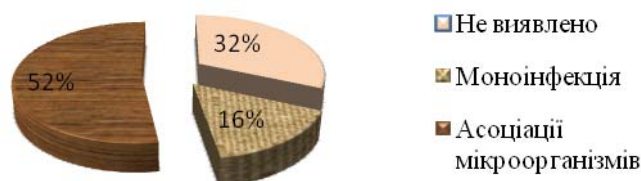


Рис. 2. Розподіл типу інфікування у фертильних жінок 18–45 років, які пред'являють скарги за відсутності об'єктивної та наявності суб'єктивної симптоматики

Отримані дані узгоджуються з дослідженнями інших авторів. За даними Boldyrev et al. (2010), у жінок віком до 40 років кількість лактобацил складала 69%, у жінок вікової групи 40–50 років відмічене зниження кількості лактобацил до 39%. У жінок цієї вікової групи спостерігалось перевищення кількості анаеробних бактерій відносно лактобацил у 10 разів. Таким чином, кількісне дослідження біоти урогенітального тракту методом ПЛР у реальному часі – чутливий метод діагностики фізіологічних і патологічних змін, який дозволяє діагностувати дисбіотичні порушення на ранніх етапах і запобігти їх подальшому розвитку у складніші форми.

Порушенню стану урогенітальної мікрофлори можуть сприяти багато факторів, які умовно можна поділити на ендогенні та екзогенні. До ендогенних факторів відносять захворювання яєчників, щитовидної залози, захворювання шийки матки, перенесені раніше або супутні запальні захворювання сечостатевої системи, зниження імунологічної реакції організму. Екзогенними факторами є екологічні, санітарно-гігієнічні, клімато-географічні. Патологічні порушення складу урогенітального мікробіоценозу відбуваються також за таких стресових впливів на макроорганізм, як тривале застосування антибактеріальних препаратів, лікування гормонами, цитостатиками, променева терапія, використання внутрішньоматкових і оральних контрацептивів.

Висновки

З урогенітального тракту жінок, що звернулися до Діагностичного центру медичної академії м. Дніпропетровськ із червня по липень 2013 року, бактеріологічним і бактеріоскопічним методами виділено 83 штами мікроорганізмів, які належать до родів *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, дріжджеподібні гриби роду *Candida*. Серед них 51 штама *E. coli* (61,4%), 17 штамів *S. aureus* (20,5%), 6 штамів *C. albicans* (7,2%), 5 штамів *P. vulgaris* (6,0%), по 2 штами *S. faecalis* та *K. pneumoniae* (2,4%).

Аналіз частоти виділення умовно-патогенних мікроорганізмів у жінок різних вікових груп показав, що найбільшу кількість клінічних штамів виділяли у жінок віком 16–30 років: 54,2% *E. coli*, 20,8% *S. aureus*, 10,4% *C. albicans*, 6,2% *P. vulgaris*, 4,2% *S. faecalis*, 4,2% *K. pneumoniae*, середню кількість клінічних штамів виділяли у жінок віком 31–45 років: 78,9% *E. coli*, 15,8% *S. aureus*, 5,3% *S. faecalis*. Найменшу кількість клінічних штамів виділяли у дівчат віком 10–15 років – 62,5% *E. coli*, 25,0% *S. aureus*, 6,3% *C. albicans* та *P. vulgaris*.

Аналіз співвідношення аеробної та анаеробної мікрофлори урогенітального тракту жінок методом ПЛР у реальному часі показав, що у жінок віком понад 40 років відбувається зменшення кількості лактобацил і заміщення їх анаеробними мікроорганізмами *A. vaginae* (16%), *G. vaginalis* (12%), *Megasphaera spp.* (8%), *Dialister spp.* (8%), *Eubacterium spp.* (8%) і *Porphyromonas spp.* (4%). У рідкісних випадках має значення також великий спектр інших збудників: *T. vaginalis* (8%), *M. genitalium* (4%), *N. gonorrhoeae* (2%) і *Ch. trachomatis* (1%).

Бібліографічні посилання

- Aila, N.A., Tency, L., Claeys, G., Verstraelen, H., Saerens, B., 2010. Comparison of different sampling techniques and of different culture methods for detection of group B *Streptococcus* carriage in pregnant women. BMC Infect. Dis. 10, 167–285.
- Baiulescu, M., Hannon, P.R., Marciniak, J.F., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., 2002. Chronic vulvovaginitis caused by antibiotic-resistant *Shigella flexneri* in a prepubertal child. Pediatr. Infect. Dis. 21(2), 170–172.
- Boldyrev, M.N., Lypova, E.V., Trofimov, D.Y., Vitvitskaya, Y.G., Gus'kova, I.A., 2010. Osobennosti bioty urogenital'nogo trakta zdorovykh zhenshhin reproduktivnogo vozrasta v issledovanii metodom PCR v rezhime real'nogo vremeni [Features of biota of the urogenital tract of healthy women of reproductive age in the study by PCR real time]. J. Dermatol. Venereol. 1, 80–84 (in Russian).
- Cauci, S., Guashino, S., De Aloysio, D., Driussi, S., De Santo, D., 2002. Prevalence of bacterial vaginosis and vaginal flora changes in peri- and postmenopausal women. Clin. Microbiol. 40(6), 2147–2152.
- Cox, R.A., Slack, M.P., 2002. Clinical and microbiological features of *Haemophilus influenzae* vulvovaginitis in young girls. J. Clin. Pathol. 55, 961–964.
- David, N., Fredricks, M.D., Tina, L., Fiedler, B.S., Jeanne, M., Marrazzo, M.D., 2005. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. N. Engl. J. Med. 353(18), 1899–1911.
- Donder, G.G., Vereecken, A., Bosmans, E., Dekeersmaecker, A., Salembier, G., Spitz, B., 2002. Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: Aerobic vaginitis. BJOG 109(1), 34–43.

- Falagas, M.E., Betsi, G.I., Athanasiou, S., 2007. Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis. *Clin. Microbiol. Infect.* 13(7), 657–664.
- Ferris, M.J., Masztal, A., Aldridge, K.E., Fortenberry, J.D., Fidel, P.L., Jr, Martin, D.H., 2004. Association of *Atopobium vaginae*, a recently described metronidazole resistant anaerobe, with bacterial vaginosis. *BMC Infect. Dis.* 4(5), 65–70.
- Fischer, G.O., 2001. Vulval disease in pre-pubertal girls. *J. Dermatol.* 42(4), 225–234.
- Fredricks, D.N., Fiedler, T.L., Thomas, K.K., Oakley, B.B., Marrazzo, J.M., 2007. Targeted PCR for detection of vaginal bacteria associated with bacterial vaginosis. *J. Clin. Microbiol.* 45(10), 3270–3276.
- Gupta, C., Briski, J., 2004. Comparison of two culture media and three sampling techniques for sensitive and rapid screening of vaginal colonization by group B *Streptococcus* in pregnant women. *J. Clin. Microbiol.* 42(9), 3975–3977.
- Kaites, K.B., Katz, B., Schelonka, R.L., 2005. Mycoplasmas and Ureaplasmas as neonatal pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* 18(4), 757–789.
- Klebanoff, M.A., Schwebke, J.R., Zhang, J., Nansel, T.R., Yu, K.F., Andrews, W.W., 2004. Vulvovaginal symptoms in women with bacterial vaginosis. *Obstet. Gynecol.* 104(2), 267–272.
- Koumfns, E.H., Markowitz, L.E., Hogan, V., 2002. Bacterial vaginosis. *Hogan. Clin. Infect. Dis.* 15(2), 152–172.
- Larsen, B., Monif, G.R., 2001. Understanding the bacterial flora of the female genital tract. *Clin. Infect. Dis.* 32, 69–77.
- Melis, G.B., Ibba, M.T., Steri, B., 2000. Role of pH as a regulator of vaginal physiological environment. *Minerva. Ginecol.* 52(4), 111–121.
- Newton, E.R., Piper, J.M., Shain, R.N., Perdue, S.T., Peairs, W., 2001. Predictors of the vaginal microflora. *J. Obstet. Gynecol.* 184(5), 845–853.
- Reid, G., Bocking, A., 2003. The potential for probiotics to prevent bacterial vaginosis and preterm labor. *J. Obstet. Gynecol.* 189, 1202–1208.
- Reid, G., Dols, J., Miller, W., 2009. Targeting the vaginal microbiota with probiotics as a means to counteract infections. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Met. Care* 12, 583–587.
- St John, E., Mares, D.A., Spear, G.T., 2007. Bacterial vaginosis and host immunity. *Curr. HIV/AIDS Rep.* 4 (1), 22–28.
- Witkin, S.S., Linhares, I.M., Giraldo, P., Ledger, W.J., 2007. An altered immunity hypothesis for the development of symptomatic bacterial vaginosis. *Clin. Infect. Dis.* 44(4), 554–557.

Надійшла до редколегії 12.07.2014



УДК 576.851.252

Характеристика стафілококів та їх роль у патології дітей

М.А. Гарифуліна, О.С. Воронкова, Т.М. Шевченко, А.І. Вінніков

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпропетровськ, Україна

Стафілококи – одні з найпоширеніших збудників уражень людини, у тому числі її верхніх дихальних шляхів. Проведено ідентифікацію 65 штамів бактерій, виділених від осіб із подібними ураженнями. У 58,5% випадків мала місце наявність стафілококів. Під час ідентифікації до виду 86,8% із них визначені як *Staphylococcus aureus* і 13,2% – як *S. saprophyticus*. Дослідження прояву факторів патогенності дозволило встановити, що позитивними у тесті на наявність плазмодокоагулази виявилися всі штами, ідентифіковані як *S. aureus*; ліпазу та лецитиназу виявляли у 78,3% із них одночасно, серед штамів *S. saprophyticus* у 20,0% одночасно. Гемоліз визначали для 82,1% штамів стафілококів. Здатність до утворення біоплівки виявлено у 21 (63,6%) штамів *S. aureus* і 2 (40%) штамів *S. saprophyticus*. Висока частота виявлення стафілококів і значний рівень прояву виділеними ізолятами факторів патогенності свідчать про необхідність розробки профілактичних заходів та моніторингу поширення цих бактерій.

Ключові слова: носійство стафілокока; штами золотистого стафілокока; інфекція; біоплівка

Characterization of staphylococci and their role in pathology of children

M.A. Haryfulina, O.S. Voronkova, T.M. Shevchenko, A.I. Vinnikov

Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Dnipropetrovsk, Ukraine

The problem of human staphylococcal infection in the world has been considered. It is known that there are 27 species of staphylococci, 14 of them colonize the skin and mucous membranes of humans, and 3 of them may cause diseases. They are *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* and *S. saprophyticus*. Staphylococci are causative agents of the large part of community-acquired and nosocomial bacteremia, pneumonia, infections of skin and soft tissues, bones and joints. Of all cases of nosocomial infections, *S. aureus* accounts for 31%. During the identification of 65 strains of bacteria isolated from people with respiratory tract lesions, it was found that 58.5% of cases were connected with presence of staphylococci. 86.8% of isolates identified belong to species *S. aureus* and 13.2% to *S. saprophyticus*. Study of pathogenicity factors manifestation revealed that all strains identified as *S. aureus* had plasmocoagulase; lipase and lecithinase were simultaneously detected in 78.3% of them, among *S. saprophyticus* strains in 20%. Presence of haemolysins was determined for 82.1% of strains of staphylococci. Ability to film formation was detected in 21 (63.6%) strains of *S. aureus* and 2 (40%) of *S. saprophyticus* strains. Given high frequency of carriers of staphylococci among healthy individuals, they should be considered as potentially pathogenic microorganisms and opportunistic pathogens. Due to their pathogenicity factors (adhesins, capsule, cell wall components, enzymes and toxins), staphylococci may cause diseases such as sepsis, meningitis, peritonitis, endocarditis, pneumonia, tonsillitis, and in young children they may result in serious Ritter illness (“babies scalded syndrome”), foodstuff infection and staphylococcal enterocolitis, in lactating women – mastitis, toxic shock syndrome. To solve the problem of staphylococcal infection prevention, it is necessary to use the following prophylaxis methods: to avoid decrease in immunity, to observe the rules of hygiene, sterility, disposability, disinfection, strict control of sanitary and epidemiological profile of healthcare institutions, to ensure monitoring of pregnant women, infants and early diagnostics and treatment of the inflammatory diseases at their initial stages. Furthermore, there is a need in monitoring of these bacteria spreading.

Keywords: carriage of staphylococci; *Staphylococcus aureus* strains; infection; biofilm

Вступ

Проблеми інфекцій, викликаних грампозитивними мікроорганізмами, в усьому світі неухильно загострюються. Стафілококи – збудники значної частини позаликарняних і нозокоміальних бактеріємій, пневмоній, інфекцій шкіри та м'яких тканин, кісток і суглобів. Вони живуть на шкірі та слизових оболонках кожної людини. Крім того, стафілококи є в навколишньому середовищі: у повітрі, на поверхні ґрунту, у воді. Близько 20% населення – постійні носії золотистого стафілокока, при цьому бактерія не викликає в них ніяких симптомів. Здорове носійство золотистого стафілокока в нижніх носових ходах спостерігається у 70–90% обстежених, у деяких із них (20%) носійство може тривати довгий час. Золотистий стафілокок може виділятися зі шкірних покривів і з піхви (у 10% менструюючих жінок). Сапрофітний стафілокок можна виявити у уретрі (5% обстежених) (Savchuk, 2003).

Для здорової людини стафілококи, які належать до мікрофлори її організму, не становлять небезпеки. Але в разі зниження реактивності імунної системи стафілококи стають збудниками різних захворювань. До того ж, існує досить велика кількість різних видів стафілококів, відповідно і вплив їх на організм відрізняється. Одні вважаються нормальними представниками мікрофлори людини, інші можуть бути небезпечними для здоров'я або навіть смертельно небезпечними (Deryabin, 2000; Borisov, 2002).

Ураховуючи той факт, що імунна система дітей ще не досконала і тільки формується у перші роки життя, корисно знати про потенційну небезпеку стафілококових інфекцій для дітей і способи зараження ними. У деяких випадках стафілококова інфекція може вражати внутрішні органи, викликаючи такі захворювання як сепсис, менінгіт, перитоніт, ендокардит, пневмонія, ангіна та інші. У маленьких дітей золотистий стафілокок може викликати важку хворобу Ріттера, яку називають «синдромом опшарених немовлят», коли шкіра дитини вкривається пухирями, як після термічного опіку. Стафілокок також стає причиною маститів у жінок, які годують. Крім того, ця бактерія викликає синдром токсичного шоку, який іноді виникає у разі використання тампонів під час менструації. Останніми роками відмічається постійне зростання питомої ваги стафілококів у виникненні гнійничкових захворювань шкіри, терапія яких становить певні труднощі у зв'язку з високою резистентністю патологічного процесу та частими рецидивами.

За даними ВООЗ, стафілокок очолює список бактерій, якими найчастіше заражаються в медичних установах розвинених країн. У лікарнях країни кращого у світі медичного обслуговування (США) реєструється понад 100 тисяч випадків інфікування стафілококом на рік, багато які зі смертельним результатом. У медичних установах Франції не вдається контролювати поширення інфекцій, викликаних стійкими до антибіотиків штамми, більшість із яких – штами золотистого стафілокока. Особливо часто стафілокок уражає пацієнтів, які мають ослаблений імунітет (наприклад, хворих на СНІД), а також тих, у кого імунітет штучно пригнічений для виконання трансплантацій або для встановлення імплантів (саме такі люди часто і перебувають у лікарнях).

Усього на стафілокок припадає 31% усіх випадків інфекцій, отриманих у госпіталах. Високий ризик інфікування стафілококом під час використання внутрішньовенних катетерів, внутрішньовенного годування недоношених дітей або при гемодіалізі. Фактором ризику також є штучна вентиляція легенів. Інфікування стафілококом у лікарнях може також відбуватися у випадку порушення звичайних правил гігієни (Byeloborodov and Mitrokhin, 2003). Але якщо випадки інфікування в лікарнях хоча б реєструються, то залишається тільки гадати, скільки людей заражаються під час хірургічних маніпуляцій у немедичних закладах, наприклад, нанесення татувань, проколювання вух або пірсингу. Ін'єкційні наркомани, природно, теж належать до групи ризику щодо інфікування стафілококом.

Нерідко стафілококи, які належать до умовно патогенних мікроорганізмів, стають причиною різноманітних форм гнійно-септичних захворювань. Зазвичай шкірні захворювання виникають у результаті порушення цілісності шкіри: у місцях порізів, потертостей та інших пошкоджень. Тому велику увагу потрібно приділяти дітям, а особливо новонародженим малюкам, у яких шкірні покриви та слизові оболонки дуже ніжні та вразливі (Labinskaia and Volina, 2008).

Стафілокок у новонароджених, на жаль, буває вкрай часто. Є дані, що до п'ятого дня перебування у пологовому будинку мами та дитини 99% немовлят мають цей мікроб на шкірі та слизових оболонках. Такі відомості лякають матерів і виникає думка про народження дітей вдома. Але ж висівання стафілокока зовсім не означає моментальне захворювання, а говорить про те, що все життя він живе разом із нами.

Стафілокок у дітей часто не є причиною захворювання. Наприклад, у новонародженого сильний, тривалий пронос, із фекалій висівається стафілокок, причина ж проносу – лактазна недостатність. Або виникає харчове отруєння, роблять змиви їжі, в них знаходять стафілококів, але причина зараження – кишкова інфекція у кухаря. Стафілокок не завжди небезпечний, але частота зараження ним велика. Збудник передається контактно-побутовим, повітряно-краплинним і харчовим шляхом (Savchuk, 2003).

Часто у пологових будинках новонароджені немовлята заражаються через грудне молоко або питво для догодовування. Так само інфекція легко може проникнути через дихальні шляхи, різні пошкодження шкіри, слизові оболонки шлунково-кишкового, респіраторного та уrogenітального тракту. На місці впровадження бактерій утворюються гнійно-запальні елементи. Кров розносить токсини по органах, викликаючи розлади серцево-судинної та нервової систем, органів дихання.

Клінічний перебіг стафілококової інфекції характеризується по-різному: від важких форм до легких. Це може бути пневмонія, сепсис, абцеси, менінгіт, ендокардит, ентероколіт, гінекологічні захворювання, гнійно-запальні захворювання шкіри та слизових оболонок (Byeloborodov and Mitrokhin, 2003).

Інкубаційний період стафілококової інфекції триває від 2 до 5 днів (крім гастроентероколітів). Найчастіший і перший прояв – ураження шкіри, які проявляються у вигляді гнійничкових висипань. Гнійничковий висип може з'являтися в різних місцях.

Сепсис – найсуворіший прояв стафілококової інфекції у новонароджених (особливо – у недоношених) дітей – має деякі особливості. У таких дітей може не бути бурхливого початку з високою температурою. Захворювання може проявлятися лише загальною млявістю, блідістю, поганою прибавкою маси тіла та зниженням апетиту, частими зригуваннями та періодичною блювотою.

Харчова стафілококова інфекція швидко розвивається після короткої інкубації. Починається з безперервної блювоти, високої температури, слабкості та блідості, прискороного пульсу. У першу добу з'являється діарея. Інтоксикація здатна досягти крайнього ступеня тяжкості аж до судом і втрати свідомості, якій можуть передувати шлунково-кишкові розлади, тим самим ускладнюючи діагностику. Можливий також розвиток інфекційно-токсичного шоку, за якого наростає синюшність шкіри та слизових оболонок, починається тахікардія, падає артеріальний тиск і температура тіла.

Стафілококовий ентероколіт – найважче захворювання серед кишкових інфекцій. Летальність – 13%. Переважно хворіють діти першого півріччя життя за несприятливих факторів: недоношеність, гіпотрофія, штучне вигодовування, перенесені респіраторні захворювання, повторне призначення антибіотиків, наявність маститу у матері.

Щоб захистити себе та свою дитину від стафілококів, потрібно дотримуватись гігієни, не допускати зниження імунітету дитини. Імунітет знижує будь-яка патологія вагітності та пологів, тривалий безводний період, гіпотрофія, недоношеність, гестози. Боротьба з усіма цими неприємностями (з кожною по-своєму) і буде профілактикою стафілококового зараження. Стафілокок у дітей і новонароджених успішніше та швидше лікується завдяки якійсній гігієні за умови утримання дитини в лікарні та багато в чому залежить від персоналу. Важливий строгий контроль санітарно-епідемічного режиму лікувально-профілактичних установ, контроль вагітних, новонароджених і своєчасне виявлення та лікування в них початкових стадій гнійно-запальних захворювань. Стерильність, одноразовість, дезинфекція – важливо дотримуватись всіх правил, інструкцій і регламентувальних документів, які сьогодні існують. Потрібно пам'ятати, що стафілокок у дітей може спричинювати небезпечні ускладнення (Ronald, 1995; Smirnova et al., 1997; Sidorenko and Yakovlev, 2000).

Фактори патогенності *S. aureus* – адгезини, капсула, компоненти клітинної стінки, ферменти та токсини. Враховуючи високу частоту носійства збудника серед практично здорових осіб, його слід вважати не патогенним, а скоріше умовно-патогенним мікроорганізмом. Іншими словами, стафілококові інфекції мають, як правило, вторинний характер і перебігають у вигляді гнійно-запальних пошкоджень.

Розмноженню мікроорганізмів у первинному вогнищі інфікування передують адгезія (лат. *adhaesio* – прикріплюватися до будь-чого), тобто закріплення бактерій на поверхні клітин, що, власне, і є початком інфекційного процесу (Labinskaia and Volina, 2008; Mehndiratta et al., 2010). Прикріплення до поверхні клітин (наприклад, до епітелію слизових оболонок) забезпечують адгезини (фактори колонізації) – різні мікробні продукти (білки, ЛПС, ліпотьохоеві кислоти). Адгезини – поверхневі біл-

ки, які взаємодіють із різними речовинами: муцином слизових оболонок, протеогліканами сполучної тканини, білками позаклітинного матриксу тощо. Капсула захищає бактерії від комплемент-опосередкованого поглинання поліморфноядерними фагоцитами, сприяє адгезії мікроорганізмів і їх поширенню по тканинах. В умовах вирощування *in vitro* капсула зазвичай не утворюється. Компоненти клітинної стінки стимулюють розвиток запальних реакцій, посилюють синтез ІЛ-1 макрофагами, активують систему комплементу та служать потужними хемоатрактантами для нейтрофілів. Тейхоеві кислоти активують систему комплементу альтернативним шляхом, згортальну та калікреїн-кінінову системи, а також полегшують адгезію бактерій до епітеліальних поверхонь. Тейхоеві кислоти здатні пригнічувати поглинальну активність фагоцитів (Borisov, 2002).

Білок А (аглотиноген А) неспецифічно пов'язує Fc-фрагменти молекул IgG (що активує систему комплементу класичним і альтернативним шляхами) та посилює активність природних кілерів. Білок А проявляє властивості суперантигену, що спільно з активацією комплементу спричинює прояв різних місцевих і системних реакцій (наприклад, анафілаксії, феномену Артюса, пригнічення активності фагоцитів тощо). Ферменти проявляють різноспрямовану дію, часто не пов'язану безпосередньо з патогенним ефектом.

Каталаза руйнує H_2O_2 , захищаючи бактерії від дії токсичних кисневих радикалів. β -Лактамази руйнують молекули β -лактамних антибіотиків; синтез ферментів кодують плазмідні гени. Оскільки гени резистентності часто входять до складу транспозонів, вони швидко поширюються у популяції. Особливе значення мають метицилін-резистентні штами, що містять додатковий ген, який кодує синтез пептидогліканової транспептидази, що забезпечує підвищену стійкість до β -лактамних антибіотиків.

Ліпази полегшують адгезію та проникнення у тканини. Зокрема, ферменти здатні руйнувати сальні «пробки», полегшуючи проникнення стафілококів у волоссяні фолікули.

Коагулаза викликає згортання плазми крові. Сам фермент не взаємодіє з фібриногеном, а утворює тромбіноподібну речовину, що імовірно взаємодіє з протромбіном. Утворена фібринова плівка грає роль своєрідної додаткової капсули, що захищає бактерію (Labinskaia and Volina, 2008; Deryabin, 2000; Bukharin et al., 2002). Серед інших ферментів у патогенезі стафілококових інфекцій беруть участь гіалуронідаза, дезоксирибонуклеаза, фібринолізин, стафілокіназа, лецитиназа та інші.

Токсини – важливі фактори патогенності, що виробляються мікроорганізмами та реалізують основні механізми інфекційного процесу. Виділяють такі токсини.

Мембранотоксини (стафілолізини, або гемолізини). Виділяють токсини чотирьох антигенних типів; бактерії здатні одночасно синтезувати декілька подібних продуктів. Стафілолізини зумовлюють гемолітичну активність стафілококів на середовищах із кров'ю.

α -Токсин має найбільше значення, його часто виявляють у бактерій, виділених із клінічних зразків. Він взаємодіє з клітинною мембраною та викликає локальний протеоліз. До його дії чутливі ендотеліоцити, поліморфноядерні лейкоцити, фібробласти, гепатоцити,

тромбоцити та інші. Під час уведення лабораторним тваринам α -токсин викликає шкірні некротичні реакції, після внутрішньовенного уведення – загибель тварин.

β -Токсин (сфінгомелінази) виявляють у 20% ізолятів. Він проявляє виражені властивості холодового гемолізу, тобто його активність максимальна за низької температури.

γ -Токсин – двокомпонентний гемолизин із помірною активністю щодо еритроцитів людини. Гемолітичну активність на кров'яних середовищах він зазвичай не проявляє, оскільки сірковмісні полімери, присутні в агарі, інактивують один із його компонентів.

δ -Токсин – агрегат низькомолекулярних сполук, що виявляють детергентні властивості; останні зумовлюють цитотоксичність широкого спектра.

Ексфолятини А та В виділяють у 3–5% клінічних ізолятів (зазвичай II фагогрупи). Ексфолятини викликають руйнування десмосом зернистого шару епідермісу та відшарування рогового шару. Синтез токсину А (термостабільного) контролюють хромосомні, а токсину В (термолабільного) – плазмідні гени. Ці токсини діють як місцево, так і системно, зумовлюючи в останньому випадку розвиток синдрому «ошпареної шкіри». Ексфолятини виявляють властивості суперантигену (Smirnova, 1997; Vyeloborodov and Mitrokhin, 2003).

Токсин синдрому токсичного шоку (TSST-1 [від англ. Toxic Shock Syndrome Toxin], раніше – ентеротоксин F) – екзотоксин, що зумовлює розвиток специфічного симптомокомплексу (імовірно за рахунок стимулювання виділення ФНП). Синтез TSST-1 кодують гени помірних фагів; основні продуценти – стафілококи I фагогрупи, проте здатністю до його утворення володіє незначна кількість штамів.

Лейкоцидин (токсин Пантона – Валентайна). Мішені дії TSST-1 – нейтрофіли та макрофаги. Він порушує водно-електролітний баланс у клітині, підвищує внутрішньоклітинний вміст циклічного АМФ (одна з ланок патогенезу стафілококових діарей).

Ентеротоксини А, В, С₁₋₂, DE – термостабільні низькомолекулярні білки. Основні продуценти – бактерії III фагогрупи. Саме ці токсини відповідальні за розвиток харчових отруєнь. Найчастіше реєструють інтоксикації, викликані ентеротоксинами А і D. Ентеротоксини В і С здатні також викликати розвиток синдрому токсичного шоку у випадках, не пов'язаних із менструаціями. Виявляють властивості суперантигену.

Багато компонентів бактеріальних клітин та їх метаболіти виявляють сенсibiliзуючу дію, що виражається в реакціях негайного та уповільненого типів. Клінічно сенсibiliзація бактеріальними алергенами характеризується дерматитами, бронхоспастичним синдромом тощо (Borisov, 2002).

Розвиток біоплівки являє собою двоступінчастий процес за участю початкових клітин і наступної фази дозрівання, які фізіологічно відрізняються одна від одної та вимагають поетапного впливу специфічних факторів. Остаточне групування бактерій у біоплівку включає формування їх у клітинні кластери з вивільненням поодиноких клітин. Уся система при цьому регулюється за участі різних механізмів і, як вважають, вирішальне значення для поширення бактерій, у разі патогенів на новому місці інфекції в організмі людини, віддається саме

комунікативним факторам, виділюваним бактеріями (Costerton and Stewart, 1999; Deryabin, 2000).

Біоплівки здатні утворюватись на будь-якій поверхні на межі з рідинною фазою. Це може статися у тому числі і на тканинах живого організму у разі пригнічення механізмів неспецифічного імунітету або на абіотичній поверхні (наприклад, корозійні біоплівки). Згодом біоплівка розвивається та зміцнюється. Молекули, які пов'язують клітини стафілокока в біоплівку, це переважно екзополісахарид PIA, тейхоєві кислоти та деякі білки. Потім клітинні кластери від'єднуються. Факторами комунікації всередині плівки у стафілококів зазвичай виступають PSM-пептиди, які також важливі у формуванні тривимірної структури біоплівки. Під час інфекції здатність до утворення біоплівки стає важливою частиною колонізації на тканини господаря або на поверхню медичних засобів (особливо катетерів і штучних клапанів серця), у той час як окремі клітини у структурі матриксу плівки є необхідною умовою для поширення інфекції (Donlan and Costerton, 2002; Pyina et al., 2004).

Мета роботи – розглянути загальні відомості про стафілококи та їх роль у патології дітей, ідентифікувати виділені при ураженнях верхніх дихальних шляхів штами та дослідити прояв біологічних властивостей стафілококів.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження виконували на базі Дніпропетровської обласної дитячої клінічної лікарні. Із 65 зразків матеріалу з верхніх дихальних шляхів виділили 65 штамів, що підлягали ідентифікації. Для досліджень відбирали всі зразки, що містили грампозитивні коки (Labinskaia and Volina, 2008). За умов виявлення останніх під час мікроскопії висівали матеріал штрихом на живильні середовища: сольовий агар, 5% кров'яний агар, цукровий бульйон і середовище для контролю стерильності. Інкубували при +37 °С протягом 18–24 годин. У разі виявлення росту проводили відсівання окремих колоній на жовтково-сольовий агар (Об'unifikacii ..., 1985; Holt et al., 1994). Із колоній відбирали матеріал для подальшої ідентифікації. Належними до роду *Staphylococcus* вважали бактерії, що давали ріст на середовищі Чистовича, ферментували глюкозу в анаеробних умовах з утворенням кислоти. Для встановлення належності до *S. aureus* проводили тест на виявлення плазмокоагулази та ферментацію маніту в анаеробних умовах з утворенням кислоти. За наявності плазмокоагулази та утворення кислоти з маніту в умовах анаеробіозу штам вважали належним до вказаного виду.

Для визначення здатності до формування біоплівки чисту культуру виділеного штаму висівали у лунки імунологічного планшета у кількості не менше 10^5 КУО/мл. Планшет інкубували при +37 °С протягом 3 діб. Якщо у цей період формувалася біоплівка (поверхневий чи придонний ріст у лунці, що давав плівку, яка при видаленні середовища осідала на стінках) штам вважали плівкотвірним. На один 96-лунковий імунологічний планшет засівали по 3 комірці для кожного штаму. Відповідь про здатність до плівкоутворення вважали позитивною, якщо принаймні в одній лунці з трьох формувалася плівка протягом 72 годин.

Результати та їх обговорення

У результаті проведення первинних ідентифікаційних тестів показано, що до роду *Staphylococcus* належали 38 штамів (58,5%). Серед інших збудників також зі значною частотою виявляли бактерії роду *Streptococcus* (36,3%), а в одиничних випадках ураження були зумовлені бактеріями родів *Pseudomonas* та *Proteus* (по 2,6% випадків). Дослідження видової приналежності штамів, ідентифікованих як стафілококи, показало, що з 38 штамів до *S. aureus* належали 33 (86,8%), до *S. saprophyticus* – 5 (13,2%). Представників *S. epidermidis* не виявлено.

Звичайно, ураження верхніх дихальних шляхів зумовлюються наявністю золотистого стафілокока, а сапрофітний стафілокок асоціюється з ураженням поверхонь медичного обладнання типа катетерів. Однак у ряді випадків, особливо при набутті факторів патогенності (наприклад, гемолізинів) останній може зумовлювати патологічні процеси в інших системах органів (Pozdeev, 2001).

Позитивними у тесті на наявність плазмокоагулази виявилися всі штами, ідентифіковані як *S. aureus*, і жодний зі штамів, ідентифікованих як *S. saprophyticus*, не давав позитивної відповіді у цьому тесті. Ліпазу та лецитиназу виявлено як серед штамів золотистих, так і серед штамів сапрофітних стафілококів. Серед штамів *S. aureus* 78,3% проявляли обидва типи активності одночасно, а решта (21,7%) не проявляли жодної з двох. Серед штамів *S. saprophyticus* один (20,0%) проявляв обидва типи активності, і ще один – тільки ліпазу (20,0%). Гемолітичними ознаками різною мірою володіли 82,1% ідентифікованих як стафілококи штамів. Серед золотистих стафілококів повний гемоліз давали 91,3% штамів із зоною просвітлення середовища від 2 до 12 мм, неповний гемоліз – 4,3% штамів із зоною 3 мм, і взагалі не був здатним до гемолізу 1 штаму (4,3%).

Серед сапрофітних стафілококів гемолізини мав лише один штаму (20,0%), у якого також визначена ліпазна та лецитиназна активності. Решта 80,0% були негемолітичними.

Стафілококи – умовно-патогенні мікроорганізми, які викликають захворювання в осіб зі зниженим рівнем функціонування імунної системи. Прояв факторів патогенності підвищує ризик виникнення уражень, зумовлених ними, тому у разі виявлення штамів з активним проявом факторів патогенності треба лікуватися (Savchuk, 2003; Voichenko, 2010).

Крім прояву факторів патогенності посилювати патогенетичні властивості може здатність до біоплівкоутворення, що, зокрема, посилює колонізаційний потенціал мікроорганізму стосовно слизових оболонок організму людини та підвищує рівень стійкості до антибіотиків (Olson et al., 2002). Дослідження частоти виявлення здатності до плівкоутворення виділених штамів стафілококів показало, що серед ізолятів *S. aureus* здатними до утворення біоплівки були 21 (63,6%), а серед *S. saprophyticus* – 2 (40%).

Стафілококи викликають різноманітні ураження в людей. Вони є збудниками значної частини позаликарняних і нозокоміальних бактеріємії, пневмоній, інфекцій шкіри та м'яких тканин, кісток і суглобів, внутрішніх органів (Byeloborodov and Mitrokhin, 2003). Вони здатні викликати такі захворювання як сепсис, менінгіт, пери-

тоніт, ендокардит, пневмонія, ангіна, у маленьких дітей – важку хворобу Ріттера («синдромом ошпарених немовлят»), у жінок, які годують – мастити, синдром токсичного шоку.

Стафілококи можуть передаватися контактно-побутовим, повітряно-краплинним і харчовим шляхом. А новонароджені немовлята у пологових будинках заражаються через грудне молоко або питво для догодовування. Також інфекція легко проникає через дихальні шляхи, різні пошкодження шкіри, слизові оболонки шлунково-кишкового, респіраторного та урогенітального тракту.

Значну роль у патології людини стафілококи відіграють у зв'язку з наявністю у них великої кількості факторів патогенності. Ці фактори, особливо у *S. aureus*, пов'язані з їх адгезією на рецепторах чутливих клітин, колонізацією та агресивними властивостями, які виявляються у пригніченні фагоцитозу (Labinskaia and Volina, 2008; Mehndiratta et al., 2010). Капсульні полісахариди пригнічують активність фагоцитуючих клітин. Білок А володіє антифагоцитарними властивостями. З екзоферментів, продукованих головним чином *S. aureus*, істотною роль у патогенезі захворювань відіграють плазмокоагулаза, гіалуронідаза, лецитиназа, фібринолізин, ДНКаза. Патогенетичні властивості інших ферментів стафілококів (нуклеази, ліпази, протеїнази, фосфатази), які часто супроводжуються коагулазною активністю, чітко не визначені (Deryabin, 2000; Bukharin et al., 2002). Здатні до утворення біоплівки стафілококи особливо небезпечні через посилення стійкості до факторів довкілля, у тому числі до антибіотиків. Стафілококи секретують ряд токсинів, що відрізняються один від одного механізмом дії (Smirnova, 1997; Byeloborodov and Mitrokhin, 2003).

Проблема стафілококових інфекцій у сучасному світі стоїть дуже гостро, перш за все через значне зростання резистентності до метициліну, в тому числі у позаликарняних умовах. Стафілококи нерідко виступають причиною гострих і хронічних інфекцій сечостатевої системи. Найчастіше вони викликають цистити, пієлонефрити, ендокардити, пієліти, уретрити, мастити, ендометрити, орхіт, а також ураження шкіри (Hiramatsu and Hanaki, 1997; Srinivasan and Dick, 2002; Pillai and Wennersten, 2009).

До методів профілактики стафілококових інфекцій відносять недопущення зниження імунітету дитини, дотримання правил гігієни, стерильності, одноразовості, дезінфекції, строгий контроль санітарно-епідемічного режиму лікувально-профілактичних установ, контроль вагітних, новонароджених і своєчасне виявлення та лікування у них початкових стадій гнійно-запальних захворювань (Ronald, 1995; Smirnova et al., 1997; Sidorenko and Yakovlev, 2000).

Висновки

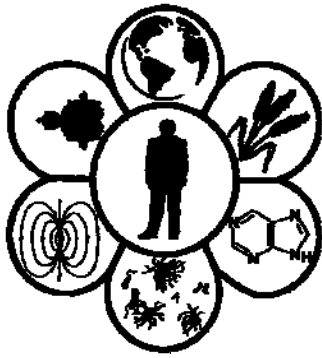
Із матеріалу від осіб з ураженнями верхніх дихальних шляхів у 58,5% випадків виділяли стафілококи. Із них 86,8% належали до *S. aureus* і 13,2% – до *S. saprophyticus*. Позитивними у тесті на наявність плазмокоагулази виявилися всі штами, ідентифіковані як *S. aureus*;

ліпазу та лецитиназу виявляли у 78,3% штамів *S. aureus* одночасно, серед штамів *S. saprophyticus* у 20% одночасно. Гемоліз визначали для 82,1% штамів стафілококів. Здатність до біоплівкоутворення виявлено у 21 (63,6%) штамів *S. aureus* і 2 (40,0%) штамів *S. saprophyticus*.

Бібліографічні посилання

- Beloborodov, V.B., Mitrokhin, S.D., 2003. Stafilokokkovie infektsii [Staphylococcal infections]. *Infections and Antimicrobial Chemotherapy* 5(1), 12–18 (in Russian).
- Boichenko, O., 2010. Immunitet [Immunity]. *Kraina* 22, 7–9.
- Borisov, L.B., 2005. Meditsinskaia mikrobiolohiia, virusolohiia, immunolohiia [Medical microbiology, virology, immunology]. MIA, Moscow (in Russian).
- Bukharin, O.V., Usviatsev, B.Y., Kartashova, O.L., 2002. Biolohiia patohennikh kokkov [Biology of pathogenous cocci]. *Medicine, Ekaterinburg* (in Russian).
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., 1999. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Greenberg Science* 284, 1318–1322.
- Deriabin, D.H., 2000. Stafilokokki: Ekolohiia i patohennost [Staphylococci: Ecology and pathogenicity]. UrO RAN, Ekaterinburg (in Russian).
- Donlan, R.M., Costerton, J.W., 2002. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15(2), 167–193.
- Hiramatsu, K., Hanaki, T., 1997. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *Antimicrob. Chemother.* 40, 135–136.
- 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 sushestvovaniia bakterii v okruzhaiushei srede i orhanisme hoziaina: Fenomen, heticheskii kontrol 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]. *Genetic.* 40, 1–12 (in Russian).
- Labinskaia, A.S., Volina, Y.H. (Eds.), 2008. *Rukovodstvo po medicinskoj mikrobiolohii. Obshaia i sanitarnaia mikrobiolohiia* [Manual of medical microbiology. General and sanitary microbiology]. Binom, Moscow (in Russian).
- Mehndiratta, P.L., Gur, R., Saini, S., Bhalla, P., 2010. *Staphylococcus aureus* phage types and their correlation to antibiotic resistance. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 53(4), 738–741.
- Ob unifikacii mikrobiolohicheskikh (bakteriolohicheskikh) metodov issledovaniia, primeniaemih v kliniko-diahnosticheskikh laboratoriiah lechebno-profilacticheskikh ucherezhdenii, 1985 [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).
- Olson, M.E., Ceri, H., Morck, D.W., Buret, A.G., Read, R.R., 2002. Biofilm bacteria: Formation and comparative susceptibility of antibiotics. *Can. J. Vet. Res.* 66(2), 86–92.
- Pillai, S.K., Wennersten, C.L., 2009. Development of reduced vancomycin susceptibility in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis.* 49, 1169–1174.
- Pozdeev, O.K. (Eds.), 2001. *Meditsinskaiia mikrobiolohiia* [Medical microbiology]. Geotar-Med, Moscow (in Russian).
- Ronald, M.A., 1995. *Microorganisms in our World*. Mosby-Year Book Inc, St. Louis, Missouri.
- Savchuk, T.D., 2003. Stafilokokkovaia infekciia [Staphylococcal infections]. *Medicine, Moscow* (in Russian).
- Sidorenko, S.V., Yakovlev, S.V., 2003. *Infektsii v intensivnoi terapii* [Infection in intensive care]. Bionika, Moscow (in Russian).
- Smirnova, A.M., Troyashkin, A.A., Paderina, E.M., 1997. *Mikrobiolohiia i profilaktika stafilokokkovikh infektsii* [Microbiology and prevention of staphylococcal infections]. *Medicina, Moscow* (in Russian).
- Srinivasan, A.T., Dick, J.D., 2002. Vancomycin resistance in staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 430–438.

Надійшла до редколегії 29.03.2014



УДК 504.054:633.1

Вплив солі марганцю на рослини *Triticum aestivum*

О.П. Ткач, М.М. Вакерич, В.І. Ніколайчук

Ужгородський національний університет, Ужгород, Україна

Залежно від концентрації важкі метали не тільки токсичні, а навпаки, можуть бути необхідними елементами для нормального росту та розвитку рослин. Одним із таких металів, який одночасно виступає як мікроелемент, є манган (марганець). Специфічна потреба у марганці властива для всіх рослин. Доведено участь даного елемента у перебігу низки фізіолого-біохімічних процесів у рослинному організмі. Манган у рослині відіграє важливу роль в окислювально-відновних реакціях, виступає як сильний окисник, як кофактор, є необхідною складовою багатьох ферментів тощо. Нами досліджено вплив передпосівної обробки водним розчином сульфату марганцю різних концентрацій на розвиток насіння озимої пшениці сорту Артеміда. У ході роботи спостерігали як інгібувальну, так і стимулювальну дію сірчаноокислого мангану на ріст і розвиток культури, залежно від концентрації. Вивчали такі ростові процеси: схожість насіння, висота проростка, вага рослин та їх кореневих систем. Оптимальна концентрація сульфату марганцю для передпосівної обробки насіння – 0,001–0,01%. Критичною, за якої спостерігається фітотоксична дія (пригнічення росту, зменшення біомаси проростка), є концентрація 0,5–1,0% розчину сульфату марганцю для передпосівної обробки насіння.

Ключові слова: аутокологія; озима пшениця; важкі метали; фітотоксичність

Action of manganese salt on *Triticum aestivum*

E. Tkach, M. Vakerich, V. Nikolaychuk

Uzhgorod National University, Uzhgorod, Ukraine

Specific need in manganese is a characteristic feature of all plants. At present time, participation of this element in functioning in a number of processes and structures in the plant organism is proved. Indispensability of manganese as a component of plant metabolism is evidenced by death of plants aged 2–4 weeks at absolute exclusion of manganese nutrient medium, and symptoms of disorders at all levels of metabolism due to lack of this element. As opposed to symptoms of deficiency which are specific for every element, the signs of excess are more or less the same. In conditions of gradual increase of the concentration of ions as factors of influence, gradual manifestation of plant organism depression is observed: growth inhibition, root dying and leaf chlorosis, etc. Foliar feeding of grain crops including winter wheat with manganese is very important because they have a great need for such elements as manganese and copper. Efficiency of the types of foliar feeding is connected with the mechanisms of penetration of manganese into the plant cells. Unlike other metals, manganese can be mobilized by sprouts from seed integument: metal absorption from wheat seeds lasts till the seventh day. That's why, the aim of our work was to investigate the influence of pre-sowing processing of winter wheat seeds with solutions of different concentrations of manganese sulfate for detection of the optimal concentration and studying of phytotoxic influence of the excess manganese action. Vegetation tests were carried out in the laboratory conditions for performing the studies. Winter wheat seeds were steeped into solutions of manganese sulfate in such concentrations as 0.001%, 0.01%, 0.1%, 0.5% and 1%. After that they were couched in multi-component environment (sod-podzol soil). As a control variant, an experiment without treatment was used. The influence of different concentrations on the growth processes such as seed germination, length of the sprout, weight of the plants and their root system was estimated. It was determined that the optimal concentration of manganese sulfate for the pre-sowing processing was equal to 0.001–0.01%. The critical one, at which the phytotoxic action is manifested in growth depression and decrease of sprout biomass, is the use of 0.5–1.0% solution of manganese sulfate for the pre-sowing seed treatment.

Keywords: autecology; winter wheat; heavy metals; Mn; phytotoxicity

Вступ

Важкі метали (ВМ) – протоплазматичні токсиканти, отруйність яких зростає в міру збільшення атомної маси елемента. Починаючи з певної концентрації, вони гальмують процес фотосинтезу та зменшують інтенсивність транспірації рослин. Результатом пригнічення токсикантами фізіолого-біохімічних процесів є загальне послаблення опору рослин до захворювань і шкідників. Токсичний вплив металів на рослини можна прослідкувати за їх ростовими показниками. На відміну від симптомів нестачі, які для кожного елемента специфічні, ознаки надлишку більш-менш однакові. В умовах поступового зростання концентрації іонів у середовищі спостерігається поява ознак пригнічення рослинного організму, що проявляється у гальмуванні росту, хлорозі листків, некрозах верхівок і країв листків, відмиранні коренів (Foy et al., 1978; Kabata-Pendias and Pendias, 2001; Hall and Williams, 2003; Mel'nychuk et al., 2004; Colangelo, 2006; Hural'chuk, 2006; Vakerych and Nikolaychuk, 2009; Millaleo et al., 2010; Vakerych, 2010; Pinho and Ladeiro, 2012). В умовах Закарпаття проблема вивчення токсичної дії та виведення важких металів актуальна у зв'язку з тим, що для регіону характерна досить інтенсивна сільськогосподарська діяльність, пов'язана з використанням великої кількості мінеральних і органічних добрив, пестицидів тощо, а також зі специфікою ґрунтів Карпатського регіону, де екологічною проблемою залишається їх висока кислотність, зумовлена відсутністю карбонатних сполук, високим вмістом іонів водню, алюмінію, марганцю та заліза (Fandalyuk et al., 2004; Matiyeha et al., 2010).

Тому мета нашого дослідження – виявлення впливу марганцю на ростові процеси озимої пшениці (схожість насіння, лінійний ріст, розвиток кореневої системи та накопичення біомаси у фазі кущіння) за збільшення концентрації марганцю шляхом передпосівної обробки насіння сірчаноокислим марганцем ($MnSO_4 \cdot 5H_2O$). Нині марганцевмісні мікродобрива мають широке застосування. Із солей марганцю часто застосовується водорозчинний сульфат марганцю, який містить 22,8% марганцю (Morgun et al., 2014).

Важливо виявити діапазон оптимальної концентрації марганцю при марганцевому підживленні, оскільки залежно від концентрації важкі метали та їх сполуки не тільки токсичні, а і, навпаки, необхідні елементи для нормального росту та розвитку рослин. Великої кількості марганцю для нормального розвитку потребують злакові, зокрема, озима пшениця, чим і пояснюється вибір об'єкта дослідження (Vlasyuk, 1948; Morgun et al., 2010; Shpaar, 2012; Morhun and Tkachuk, 2001; Nakala et al., 2006; Shenker et al., 2004).

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проводили в лабораторних умовах. Використовували насіння озимої пшениці сорту Артеміда, районованого на Закарпатті, площі посівів якого найбільші в регіоні. Передпосівну обробку з використанням водних розчинів $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ проводили в та-

ких відсоткових концентраціях: 0,001, 0,01, 0,1, 0,5, 1,0%. Обробка насіння тривала протягом 24 годин. Пророщували у багатокомпонентному середовищі (ґрунт дерново-підзолистий). У лабораторії підтримували постійну температуру +18...+20 °С. Освітлення – денне. Поливали дистильованою водою рівною мірою для кожного варіанта досліду. Схожість насіння визначали на 7-му добу. На 12-ту добу проростання у фазі кущіння проводили вимірювання лінійного росту (висоти рослин), визначали масу рослин і кореневої системи, для цього відбирали 20 проростків із кожного варіанта досліду. Як контроль для порівняння впливу різної концентрації сірчаноокислого марганцю брали рослини у варіанті досліду без обробки. Повторюваність виконання всіх досліджень – триразова.

Результати досліджень оброблені за допомогою методів варіаційної статистики. Критерії показників розраховані за допомогою сервісних функцій статистичного пакета електронних програм MS Excel. Відмінність між вибірками вважали достовірною при $P < 0,05$, оцінювали їх за допомогою ANOVA.

Результати та їх обговорення

Результати вивчення схожості насіння озимої пшениці сорту Артеміда показали (рис. 1), що стимулювальними виявились діючі концентрації сірчаноокислого марганцю в межах 0,001–0,01%, у разі обробки насіння якими схожість перевищувала контрольний варіант (96,5%). Причиною високої схожості може бути активування біохімічних процесів у проростаючому насінні, яке може мати місце на думку деяких авторів (Vizig and Klimovickaja, 1964; Vlasyuk and Klimovickaja, 1968; Obrueva, 2003). На погляд інших авторів (Huang et al., 1993, 1994; Graham et al., 1999; Graham et al., 2003), підвищення схожості у варіанті з марганцем спричинене наявністю додаткового джерела мікроелемента. У ході використання вищих діючих концентрацій (0,1–1,0%) передпосівна обробка $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ мала протилежний (інгібувальний) ефект: схожість була нижчою за контрольний варіант. Із підвищенням концентрації солей затримується бубнявіння насіння, спостерігається втрата схожості при проникненні іонів солей у насіння. Таким чином, дія сірчаноокислого марганцю на процес проростання насіння пшениці залежить від використаної для передпосівної обробки насіння діючої концентрації.

Визначення довжини надземної частини 12-добових проростків показало, що вона, як і схожість, залежить від концентрації сірчаноокислого марганцю (рис. 2). Стимулювальним вплив виявився у випадку передпосівної обробки насіння в розчинах із діапазоном концентрацій від 0,001% до 0,5% сірчаноокислого марганцю. Застосування вищої концентрації мало протилежний (пригнічувальний) ефект, оскільки довжина пагона була меншою за контрольний варіант. Отже, лінійний ріст проростків озимої пшениці залежить від діючої концентрації сірчаноокислого марганцю.

Маса органа чи рослини – показник, що характеризує ростові процеси як відповідь на вплив різних умов середовища в їх сукупному впливі. Виходячи з цього, ми визначили масу 12-денних проростків, вирощених за

умови передпосівної обробки насіння сірчанокислим манганом (рис. 3). З отриманих результатів видно, що маса варіювала залежно від діючих концентрацій. Стимулювальний вплив виявили передпосівні обробки насіння 0,001 та 0,01% $MnSO_4$, в яких маса рослин була вищою за контрольний варіант. Із підвищенням діючих концентрацій (0,1–1,0% $MnSO_4$) ефект був протилежним: загальна маса проростків була нижчою за контрольний варіант. Отримані дані стали свідченням того, що підвищення діючої концентрації сульфату мангану спричиняє гальмування не тільки лінійного росту, а і ростових процесів у цілому.

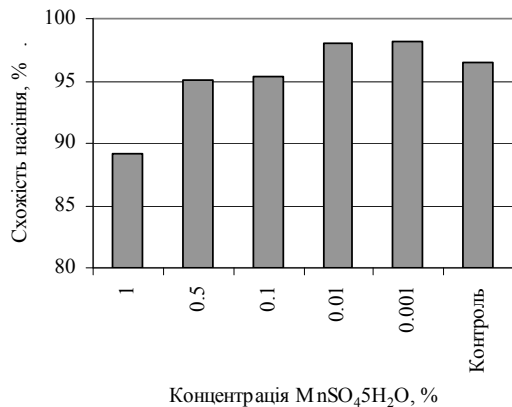


Рис. 1. Схожість насіння озимої пшениці у разі передпосівної обробки сірчанокислим марганцем ($n = 3$)

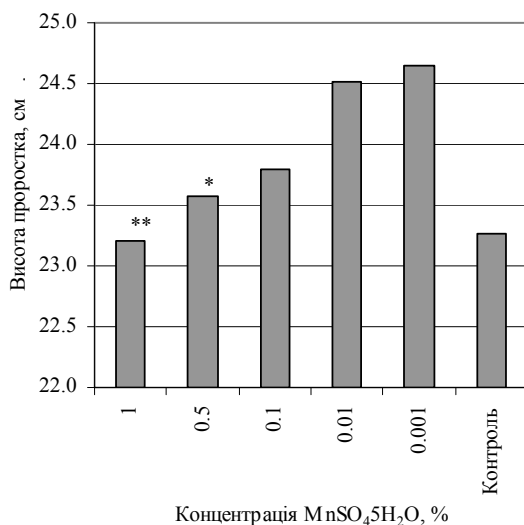


Рис. 2. Висота рослин озимої пшениці у фазі кушіння за умови передпосівної обробки насіння сірчанокислим марганцем ($n = 3$): * – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$

У ході дослідження впливу передпосівної обробки насіння сірчанокислим манганом на масу кореневої системи 12-добових проростків озимої пшениці Артеміда позитивний вплив спостерігався у варіанті з 0,001% $MnSO_4$, маса кореневих систем яких перевищувала відповідний показник у контрольному дослідженні. З підвищенням діючих концентрацій (0,01–1,0%) спостерігався пригнічувальний вплив на коренеутворення, що проявлялося у вигляді зниження маси кореневих систем (рис. 4).

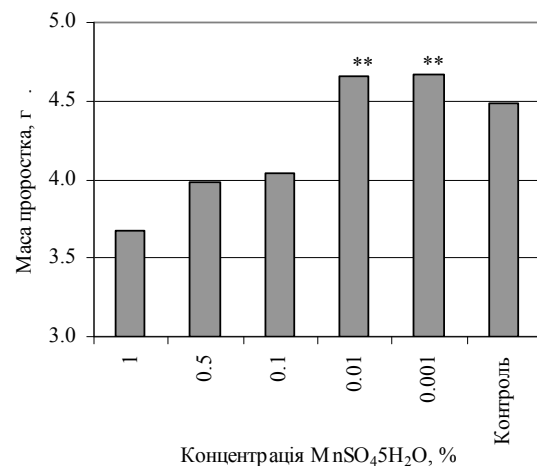


Рис. 3. Маса рослин озимої пшениці у фазі кушіння за умови передпосівної обробки насіння сірчанокислим манганом ($n = 3$): ** – $P < 0,01$

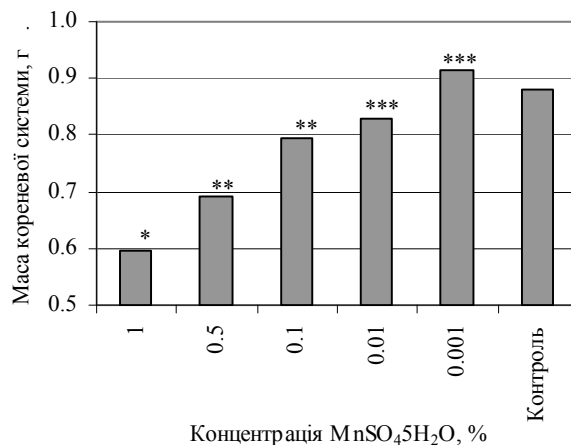


Рис. 4. Маса кореневої системи рослин озимої пшениці у фазі кушіння за умови передпосівної обробки насіння сірчанокислим манганом ($n = 3$): * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$

Коренева система – найчутливіший орган рослинного організму до дії ксенобіотиків різного походження (у тому числі сполук важких металів), оскільки, першочергово, є одним з органів акумуляції важких металів. Маса кореневої системи рослин – один із показників, який відображає загальну картину позитивного чи негативного ефекту фактора впливу (Hural'chuk, 2006).

Висновки

Узагальнюючи отримані результати дослідження впливу передпосівної обробки насіння сульфатом мангану на динаміку ростових показників озимої пшениці Артеміда в умовах культивування у багатоконцентному середовищі (грунт дерново-підзолистий), констатуємо: манган відіграє важливу роль у регуляції фізіолого-біохімічних процесів у рослині. До певного критичного значення концентрації, залежно від досліджуваного ростового показника, сірчанокислий манган має стимулювальний вплив, а у випадку перевищення «граничного» значення проявляється пригнічення ростових процесів.

Бібліографічні посилання

- Colangelo, E.P., 2006. Put the metal to the petal: Metal uptake and transport throughout plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 322–330.
- Fandalyuk, A.V., Sotmari, M.P., 2004. Optymizatsiya vykorystannya ta okhorony rodyuchosti hruntiv Zakarpattya [Optimization the use and protection of soil fertility Transcarpathia]. *Okhorona Rodyuchosti Gruntiv [Protection of Soil Fertility]*. 1, 80–87 (in Ukrainian).
- Foy, C.D., Chaney, R.L., White, M.C., 1978. The physiology of metal toxicity in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 29, 511–566.
- Graham, R., Senadhire, D., Beebe, S., Iglesias, C., Monasterio, I., 1999. Breeding for micronutrient density in edible portion of staple food crops: Conventional approaches. *Filed Crop. Res.* 60, (1-2), 57-80.
- Graham, R.D., Stangoulis, C.R., 2003. Trace element uptake and distribution in plants. *Am. Soc. Nutr. Sci.* 133(5), 1502–1505.
- Hakala, M., Rantamaki, S., Puputti, E.M., Tyystjarvi, T., Tyystjarvi, E., 2006. Photoinhibition of manganese enzymes: Insights into the mechanism of photosystem II photoinhibition. *J. Exp. Bot.* 57(8), 1809–1816.
- Hall, J.L., Williams, L.E., 2003. Transition metal transporters in plants. *J. Exp. Botany* 54(393), 2601–2613.
- Huang, C., Webb, M.J., Graham, R.D., 1993. Effects of pH on manganese absorption by barley genotypes in chelate-buffered nutrient solution. *Plant nutrition – from genetic engineering to field practice.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 653–656.
- Huang, C., Webb, M.J., Graham, R.D., 1994. Manganese efficiency is expressed in barley growing in soil system but not in solution culture. *J. Plant Nutr.* 17(1), 83–95.
- Hural'chuk, Z.Z., 2006. Fitotoksichnist' vazhkykh metaliv ta stiykist' roslyn do yikh diyi [Phytotoxicity of heavy metals and plant resistance to their action]. Logos, Kyiv (in Ukrainian).
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H., 2001. Trace elements in soils and plants. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Matiyeha, V.Y., Pasichnyk, O.R., Pokhyl, V.V., Polychko, V.S., 2010. Ekoloho-toksykologichnyy stan gruntiv na terytoriyi Tyachiv's'koho ta Rakhiv's'koho rayoniv Zakarpats'koyi oblasti [Ecological and toxicological status of soils in the Tiachiv and Rakhivsky district, Transcarpathian region]. *Problemy Ahropromyslovoho Kompleksu Karpat [The Problems of Agroindustrial Complex in Carpathians]* 19, 94–102 (in Ukrainian).
- Mel'nychuk, D., Hofman, D., Horodn'oho, M., 2004. Yakist' gruntu ta suchasni stratehiyi udobrennya [Soil quality and modern strategies of fertilization]. Aristey, Kiev (in Ukrainian).
- Millaleo, R., Reyes-Diaz, M., Ivanov, A.G., Mora, M.L., Alberdi, M., 2010. Manganese as essential and toxic element for plants: transport, accumulation and resistance mechanisms. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 10(4), 470–481.
- Morhun, V.V., Tkachuk, K.S., 2001. Problemy, stan ta perspektyvy rozvytku doslidzhen' z fiziolhiyi zhyvlennya roslyn [Problems status and prospects of research on the physiology of nutrition of plants]. *Fiziolohiya roslyn v Ukrayini na mezhi tysyacholit' [Physiology of plants in Ukraine at the turn of the millennium]* 1, 140–151 (in Ukrainian).
- Morgun, V.V., Shvartau, V.V., Kirizij, D.A., 2010. Fiziologicheskie osnovy formirovaniya vysokoy produktivnosti zernovyh zlakov [Physiological basis of the formation of the high productivity of cereals]. *Fiziologija i Biohimija Kul'turnyh Rastenij [Physiology and Biochemistry of Cultivated Plants]* 42(5), 371–392 (in Russian).
- Morhun, V.V., Sanyn, E.V., Shvartau, V.V., 2014. Klub 100 tsentneriv. Suchasni sorty ta systemy zhyvlennya i zakhystu ozymoyi pshenytsi [Modern varieties and feed systems and protection of winter wheat]. Logos, Kyiv (in Ukrainian).
- Obryeva, N.V., 2003. Fiziologija prorastaniya semjan [Physiology of seed germination]. *Reguljacija rosta, razvitija i produktivnosti rastenij [Regulation of growth, development and productivity of plants]*. Pravo i jekonomika, Minsk. pp. 93–94 (in Russian).
- Pinho, S., Ladeiro, B., 2012. Phytotoxicity by lead as heavy metal focus on oxidative stress. *Journal of Botany.* Article ID 369572.
- Shenker, M., Plessner, O.E., Tel-Or, E., 2004. Manganese nutrition effects on tomato growth, chlorophyll concentration and superoxide dismutase activity. *J. Plant Physiol.* 161(2), 197–202.
- Shpaar, D., 2012. Zernovye kul'tury: vyrashhivanie, uborka, hranenie i ispol'zovanie [Cereals: Growing, harvesting, storage and use] Zerno, Kyiv (in Russian).
- Vakerych, M.M., 2010. Autoekologichni doslidzhennya reaktsiyi *Avena sativa* L. za diyi spoluk kuprumu [Autoecological study of *Avena sativa* L. reaction on copper compounds]. Abstract of dissertation (in Ukrainian).
- Vakerych, M.M., Nikolaychuk, V.I., 2009. Do vyvchennya vplyvu fitoaktyvnosti midi ta inshykh metaliv na ontogenetichnyy rozvytok roslyn [To study the effect of phytoactivity of copper and other metals to ontogenetic development of plants]. *Fiziolohiya Roslyn: Problemy ta Perspektyvy Rozvytku [Physiology of Plants: Problems and Evolution Prospect]*. Logos, Kyiv 1, 287–305 (in Ukrainian).
- Vizir, K.L., Klimovickaja, T.M., 1964. Dejstvie marganca na rost i razvitie rastenij na razlichnyh jetapah ontogeneza [The action of manganese on the growth and development of plants at different stages of ontogenesis]. *Naukova Dumka, Kyiv.* pp. 29–44 (in Russian).
- Vlasyuk, P.A., 1948. Marhanets' u systemi zhyvlennya roslyn [Manganese in the system of power plant] *Academy Sciences of the USSR, Kyiv* (in Ukrainian).
- Vlasyuk, P.A., Klimovickaja, T.M., 1968. Fiziologicheskoe znachenie marganca dlja rosta i razvitija rastenij [The physiological significance of manganese to the growth and development of plants]. *Kolos, Moscow* (in Russian).

Надійшла до редколегії 12.07.2014



УДК 599.32+615.9

Ефективність застосування ентросгелю в умовах одночасного ураження щурів карбофосом і тетрахлорметаном

Л.А. Бойко, Л.С. Фіра, П.Г. Лихацький

ДВНЗ "Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України", Тернопіль, Україна

Одночасне ураження щурів карбофосом і тетрахлорметаном викликає активацію процесів ліпопероксидації, поглиблення ендогенної інтоксикації, на що вказує підвищений вміст молекул середньої маси у сироватці крові та печінці щурів, а також зумовлює розвиток деструктивних процесів у печінці, свідченням чому є висока активність трансміназ у сироватці крові. Відмічене зниження активності ацетилхолінестерази у крові, що свідчить про токсичний вплив карбофосу на гідроліз ацетилхоліну та підвищення збудливості нервової системи. Застосування ентросгелю проявило позитивний вплив на виявлені порушення в ураженому організмі.

Ключові слова: молекули середньої маси; амінотрансфераза; лужна фосфатаза; ацетилхолінестераза

Effectiveness of enterosgel usage in the conditions of simultaneous destruction of rats by karbofos and carbon tetrachloride

L.A. Boyko, L.S. Fira, P.G. Lychatskiy

SHEI "I.Y. Horbachevsky Ternopil State Medical University of the Ministry of Public Health of Ukraine", Ternopil, Ukraine

The aim of our study was to examine the effectiveness of the enterosgel sorbent in the terms of simultaneous destruction of rats by karbofos and carbon tetrachloride. Experiments were carried out on white rats weighing 175–200 g, which were kept on a standard diet. Karbofos was administered intragastrically on daily basis in the aqueous solution at the rate of 20 mg/kg of the body weight, which is 1/10 of the LD₅₀. Carbon tetrachloride was administered intraperitoneally, twice a day in the form of a 50% oil solution at a dose of 1.0 ml/kg of animal. Animals received enterosgel daily by intragastric way at the rate of 120 mg/kg of body weight. The activity of free radical processes in rats was assessed by thiobarbituric acid content – active products (TBA-AP) in serum, liver and heart homogenates. Level of endogenous intoxication was determined by the content of average weight molecules (AWM) in serum and liver homogenate. The degree of cytolysis of hepatocytes was assessed by the activity of alanine and aspartate aminotransferase (AlAT, AsAT), alkaline phosphatase (ALP) in serum, liver and heart homogenates. The degree of damage of the nervous system was studied by the activity of acetylcholinesterase (AChE) in serum and liver homogenate. Content of TBA-AP in serum, liver and myocardium increased throughout the period of study. Reduction of TBA-AP was observed in studied tissues after applying of enterosgel sorbent in the affected body. After the defeat by toxicants we showed significant increase of fraction of AM₁ (chain aminoacids dominate) and AM₂ (aromatic aminoacids dominate) in serum and liver of experimental rats throughout the experiment. Enterosgel showed a positive effect on this index, reducing the content of MSM molecules. Due to toxic effects of endogenous and exogenous toxins in cells degradation and changing the permeability of plasma membranes of hepatocytes was observed as evidenced by the increased activity of both AlAT and AsAT in serum and decreased in liver and myocardium. Throughout the experiment a positive effect of enterosgel on these indices was observed, which activity decreased in serum and increased in liver and myocardium. Another marker of hepatic cytolysis is alkaline phosphatase, which activity increase in serum shows the development of inflammation in the liver. It is noted that after enterosgel introduction into the body affected by xenobiotics ALP activity decreases. The main pathogenetic mechanism of karbofos action is based on the inhibition of AChE – an enzyme that catalyzes the hydrolysis of acetylcholine and plays an important role in synaptic transmission of nerve impulses. Throughout the experiment, under the action of toxicants, decreasing of the AChE

ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України», вул. Майдан Волі, 1, Тернопіль, 46001, Україна.

*HSEI "Ternopil State Medical University by I.Y. Horbachevsky of MPH of Ukraine", Freedom Square str., 1, 46001, Ternopil, Ukraine.
Tel.: +38-096-377-63-90. E-mail: ludafira@mail.ru*

activity took place, and when injecting into the affected body enterosgel we observed increased activity of the enzyme. Thus, the usage of enterosgel resulted in the depressing process of free radical oxidation, reduction of endogenous intoxication and decrease in the inflammation in the rats affected by xenobiotics, allowing to carry out subsequent studies of the efficiency of this sorbent under conditions of chemical poisoning.

Keywords: average weight molecules; aminotransferases; alkaline phosphatase; acetylcholinesterase

Вступ

Хімізація промисловості та сільського господарства спричинила зростання впливу хімічних токсинів на організм людини та тварин. Це зумовлено значним забрудненням навколишнього середовища різними пестицидами. Серед них одними із найтоксичніших сполук є карбофос і тетрахлорметан (Walewsky et al., 2003; Vongko, 2004). Дані ксенобіотики, залежно від умов, можуть порушувати рівновагу між окиснювальними процесами та захисними системами в організмі. Утворені при цьому токсини поглиблюють ендогенну інтоксикацію та можуть викликати токсичне ураження печінки – органа, який відіграє головну роль у регуляції обміну речовин цілісного організму. Для усунення проявів ендогенної інтоксикації застосовують сорбенти. Сорбенти видаляють токсини із просвіту кишечника, очищують травні соки шлунково-кишкового тракту, здійснюють зворотний пасаж токсинів і метаболітів із крові, модифікують ліпідний та амінокислотний спектри вмісту кишечника (Zhminko et al., 2003, Bondarev et al., 2008).

Метою нашого дослідження було вивчити ефективність застосування сорбенту ентросгелю в умовах одночасного ураження щурів карбофосом та тетрахлорметаном.

Матеріал і методи досліджень

Досліди проведені на білих щурах масою тіла 175–200 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського». Виконували їх згідно із Загальними принципами експериментів на тваринах, схваленими на Національному конгресі з біоетики (Київ, 2001). Утримання тварин і маніпуляції з ними проводили згідно з положеннями статті 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21.02.2006 р. № 3447-IV, «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей», «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», затверджених 20.09.2001 р. І Українським національним конгресом із біоетики та з урахуванням положень, викладених у NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Guide, 2011).

Тварин поділили на дев'ять груп:

- 1 – інтактний контроль,
- 2 – тварини, уражені карбофосом протягом 10 діб та 4-та доба ураження тетрахлорметаном,
- 3 – ураження, як у 2-ї групи та після застосування ентросгелю,
- 4 – 10 діб ураження карбофосом та 7-ма доба отруєння CCI_4 ,
- 5 – щури, уражені карбофосом протягом 10 діб та 7-ма доба розвитку токсичного гепатиту (тварини цієї групи отримували ентросгель протягом 10 діб),

6 – щури, уражені карбофосом протягом 30 діб та 4-та доба розвитку тетрахлорметанового гепатиту,

7 – щури, які після ураження токсикантами, як у попередній групі, та після отримування ентросгелю протягом усього експерименту,

8 – 30 діб уведення карбофосу та 7-ма доба ураження CCI_4 ,

9 – уражені щури, як у 8-й групі, та після 30-добового уведення ентросгелю.

Карбофос вводили щоденно внутрішньошлунково у вигляді водного розчину з розрахунку 20 мг/кг маси тіла тварини, що становить 1/10 від LD_{50} . Тетрахлорметан вводили внутрішньочеревино, дворазово – через добу у вигляді 50% олійного розчину у дозі 1,0 мл/кг маси тварини (Gubskiy et al., 2005). Ентросгель тварини отримували щоденно інтрагастрально з розрахунку 120 мг/кг маси тіла. Дозу підбирали емпірично, виходячи із середньотерапевтичної дози для людей і перерахунку її на тварин (Rybolovlev, 1979).

Щурів піддавали евтаназії з використанням тіопенталу натрію. Для досліджень обрали сироватку крові, міокард і печінку тварин. Кров забирали із серця тварин, яку центрифугували зі швидкістю 3 000 об./хв протягом 30 хвилин. Отриману сироватку крові (надосадову рідину) використовували для проведення досліджень. Відібрану печінку та серце (250 мг) використовували для отримання гомогенату методом диференційного гомогенізування, яке проводили після попередньої перфузії з 2,5 мл фізіологічного розчину.

Активність вільнорадикальних процесів в організмі щурів оцінювали за вмістом кислотних тіобарбітур-активних продуктів (ТБК-АП) у сироватці крові, гомогенатах печінки та серця. У ліпідних системах унаслідок процесів перекисного окиснення ліпідів утворюється малоновий діальдегід (МДА), взаємодія якого із 2-тіобарбітуровою кислотою викликає утворення хромогену з максимумом поглинання у червоній області видимого спектра при довжині хвилі 535 нм. Вміст МДА визначали з урахуванням коефіцієнта молярної екстинкції утвореного хромогену і виражали у мкмоль/л для крові та в мкмоль/кг для тканинних гомогенатів (Kolb et al., 1982; Lushchak et al., 2004).

Ступінь ендогенної інтоксикації визначали за вмістом молекул середньої маси (МСМ) у сироватці крові та гомогенаті печінки. Метод полягає у виділенні кислоторозчинної фракції молекул середньої маси з наступною детекцією десятикратно розведеної надосадової рідини при довжинах хвиль 254 та 280 нм проти дистильованої води на СФ-46. Результати виражали в одиницях, чисельно рівних показникам екстинкції (Nikolaichik et al., 1989).

Ступінь цитолізу гепатоцитів оцінювали за активностями аланін- та аспартатамінотрансфераз (АлАТ, АсАТ) і лужної фосфатази (ЛФ) у сироватці крові, гомогенатах печінки та серця. Визначення АлАТ проводили шляхом амінування 2-оксоглутарової кислоти L-аланіном, яке відбувається під дією аланінамінотрансферази, утворю-

ються L-глутамінова та піровиноградна кислоти. За взаємодії ПВК із 2,4-динітрофенілгідразиним у лужному середовищі утворюються 2,4-динітрофенілгідрозони, що мають високий коефіцієнт молярної екстинції, тому оптична щільність їх, яка реєструється на ФЕКУ, прямо пропорційна активності ферменту. Розрахунок активності ферменту проводили за калібрувальним графіком, побудованим за вмістом ПВК, і виражали в мкмоль/(л·год) (Reitman, 1957). Визначення АсАТ базувалося на вимірюванні оптичної густини 2,4-нітрофенілгідрозонів 2-оксоглютарової та піровиноградної кислот у лужному середовищі. Оскільки гідрозон піровиноградної кислоти має вищий коефіцієнт молярної екстинції, спостерігається пряма залежність оптичної густини реакційного розчину від активності ферменту. Розрахунок активності ферменту проводили за калібрувальним графіком, побудованим за вмістом ПВК, і виражали в мкмоль/(л·год) (Reitman, 1957). Визначення активності лужної фосфатази ґрунтувалося на властивості ферменту гідролізувати ефірний зв'язок у β-гліцерофосфаті з відщепленням фосфатної кислоти. Фосфор визначали колориметричним методом за реакцією з молібденовим реактивом за присутності відновника ейконогену або аскорбінової кислоти. Продукт реакції – молібденовий синій, інтенсивність забарвлення якого пропорційна кількості фосфору у пробі та характеризує активність ферменту (Kind, 1954).

Ступінь ураження нервової системи вивчали за активністю ацетилхолінестерази (АХЕ) у сироватці крові та

гомогенаті печінки, яку виражали в мікрограмах ацетилхоліну, що гідролізувався, на 1 мл сироватки крові або гомогенату печінки за 1 хвилину. Під час реакції ацетилхоліну з лужним розчином гідроксиламінхлориду утворюється гідроксомова кислота, яка в кислому середовищі з хлорним залізом дає кольорову реакцію, що залежить від концентрації ацетилхоліну. Вимірювали оптичну густину дослідної проби на ФЕКУ за довжини хвилі 540 нм (Yermolayeva et al., 2008).

Статистичну обробку отриманих даних проводили стандартними методами варіаційної статистики, розраховувати середні величини, їх похибки, достовірність відмінності обчислювали із застосуванням t-критерію Стьюдента (Larach et al., 2000), зміни вважали достовірними при $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення

У тварин, уражених ксенобіотиками, вміст ТБК-АП у сироватці крові зростав протягом усього терміну дослідження (табл. 1). На 10-ту добу ураження карбофосом та 4-ту добу отруєння тетрахлорметаном вміст ТБК-АП зріс на 42%, у випадку десятиденної інтоксикації карбофосом і на 7-му добу уведення тетрахлорметану даний показник збільшився на 85%. Після 30-денного уведення карбофосу та на 4-ту добу отруєння CCl_4 вміст ТБК-АП зріс у сироватці крові на 185%.

Таблиця 1

Динаміка біохімічних показників у сироватці крові щурів, одночасно уражених карбофосом і тетрахлорметаном, після корекції ентеросгелем ($M \pm m$)

| Показник | Інтактний конт роль, n = 6 | Термін дослідження, доба | | | | | | | |
|---------------------------|----------------------------|--------------------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|
| | | 10 + 4 CCl_4 | | 10 + 7 CCl_4 | | 30 + 4 CCl_4 | | 30 + 7 CCl_4 | |
| | | уражені, n = 6 | корекція, n = 6 | уражені, n = 6 | корекція, n = 6 | уражені, n = 6 | корекція, n = 6 | уражені, n = 6 | корекція, n = 6 |
| ТБК-АП, мкмоль/л | 0,92 ± 0,03 | 1,31 ± 0,02* | 1,14 ± 0,01** | 1,70 ± 0,01* | 1,45 ± 0,01** | 2,62 ± 0,02* | 2,36 ± 0,01** | 3,07 ± 0,01* | 2,79 ± 0,01** |
| СМ ₁ , у. о./л | 0,99 ± 0,10 | 1,62 ± 0,02* | 0,96 ± 0,01** | 1,79 ± 0,03* | 1,17 ± 0,01** | 2,20 ± 0,02* | 1,33 ± 0,01** | 2,30 ± 0,02* | 1,52 ± 0,01** |
| СМ ₂ , у. о./л | 1,11 ± 0,16 | 1,68 ± 0,01* | 1,18 ± 0,01** | 1,90 ± 0,03* | 1,24 ± 0,01** | 2,13 ± 0,01* | 1,54 ± 0,01** | 2,18 ± 0,02* | 1,75 ± 0,01** |
| АлАТ, мкмоль / (л год.) | 1,17 ± 0,01 | 1,62 ± 0,02* | 1,42 ± 0,01** | 1,98 ± 0,02* | 1,55 ± 0,01** | 2,07 ± 0,01* | 1,57 ± 0,01** | 2,12 ± 0,01* | 2,81 ± 0,01** |
| АсАТ, мкмоль / (л год.) | 0,78 ± 0,03 | 1,25 ± 0,05* | 0,96 ± 0,01** | 1,71 ± 0,03* | 1,51 ± 0,01** | 1,75 ± 0,03* | 1,52 ± 0,01** | 1,80 ± 0,03* | 1,57 ± 0,01** |
| ЛФ, ммоль/л | 14,20 ± 0,80 | 15,67 ± 0,30 | 14,25 ± 0,01** | 17,10 ± 0,24* | 15,70 ± 0,01** | 19,70 ± 0,27* | 17,26 ± 0,01** | 21,88 ± 0,16* | 19,72 ± 0,02** |
| АХЕ, мкг/хв | 230,00 ± 1,12 | 185,60 ± 0,96* | 223,60 ± 0,84** | 165,80 ± 0,90* | 191,60 ± 0,95** | 156,70 ± 0,51* | 173,60 ± 1,12* | 151,50 ± 0,93* | 167,60 ± 0,58** |

Примітки: тут і в наступних таблицях 10 та 30 ФОС – ураження карбофосом протягом 10 та 30 діб, 4 та 7 CCl_4 – ураження тетрахлорметаном на 4- та 7-му добу, * – вірогідні ($P < 0,05$) зміни між тваринами інтактного контролю та ураженими, ** – вірогідні ($P < 0,05$) зміни між ураженими тваринами та тваринами, які отримували ентеросгель.

На 30- та 7-му добу еведення токсинів вміст ТБК-АП зростав ще більше і виявився на рівні 234%. Таке підвищення вмісту даної сполуки у сироватці крові свідчить про активацію вільнорадикальних процесів в організмі уражених щурів під впливом використаних токсикантів. При застосуванні сорбенту ентеросгелю в ураженому організмі спостерігається зменшення вмісту ТБК-АП у сироватці крові: при 10-добовому уведенні

карбофосу та на 4-ту добу ураження CCl_4 після застосування сорбенту вміст ТБК-АП знизився на 18%.

При 10-добовій інтоксикації карбофосом та на 7-му добу уведення тетрахлорметану під впливом ентеросгелю досліджуваній показник зменшився на 27%. Після 30-добового уведення карбофосу та на 4-ту добу отруєння CCl_4 ентеросгель знизив вміст ТБК-АП на 29%, відповідно на 30-ту та 7-му добу уведення токсинів

під впливом коригуючого чинника показник зменшився на 31% відносно уражених тварин.

При одночасній дії на організм щурів карбофосу та тетрахлорметану активуються процеси вільнорадикального окиснення, а токсичні продукти, які при цьому утворюються, спричиняють деструктивний вплив на макромолекули, чим поглиблюють ендogenous інтоксикацію організму, про ступінь якої судять за вмістом у сироватці крові МСМ. Після ураження токсикантами ми відмітили достовірне підвищення фракцій $СМ_1$ (переважають ланцюгові амінокислоти) та $СМ_2$ (переважають ароматичні амінокислоти) у сироватці крові дослідних щурів протягом усього експерименту (табл. 1). При 10-добовому отруєнні карбофосом і на 4-ту добу ураження $ССІ_4$ після введення ентеросгелю вміст $СМ_1$ у сироватці крові знизився в 1,7 раза, $СМ_2$ – в 1,4 раза. У наступний термін дослідження (10 днів ураження карбофосом і 7 днів отруєння тетрахлорметаном) вміст фракцій $СМ_1$ і $СМ_2$ знизився в 1,5 раза. Після 30-добового введення карбофосу та на 4-ту добу отруєння $ССІ_4$ вміст $СМ_1$ знизився в 1,6 раза, $СМ_2$ – в 1,4 раза. У щурів, які отримували ентеросгель, порівняно з ураженими щурами, на 30- та 7-му добу введення токсикантів – $СМ_1$ знизився в 1,5 раза, $СМ_2$ – в 1,2 раза. Таким чином, в уражених тварин після введення сорбенту знижувався вміст МСМ у сироватці крові протягом усього експерименту.

Одночасно досліджували коригувальний вплив ентеросгелю на стан плазматичних мембран гепатоцитів. Для цього визначали активність АлАТ, АсАТ у сироватці крові. Внаслідок деструкції та зміни проникності плазматичних мембран клітин печінки після ураження токсикантами підвищувалась активність як АлАТ, так і АсАТ у сироватці крові. Це свідчить, що під впливом карбофосу та тетрахлорметану відбувається цитоліз гепатоцитів і переміщення ферментів у кров.

Дані щодо активності амінотрансфераз наведено в таблиці 1. Введення в уражений організм ентеросгелю викликає зниження даних показників протягом усього терміну дослідження. При 10-добовому введенні карбофосу та на 4-ту добу після ураження $ССІ_4$ активність АлАТ у сироватці крові знизилася на 17%, АсАТ – на 37%. При 10-добовій інтоксикації карбофосом і на 7-му добу введення тетрахлорметану показники знизились таким чином: АлАТ – на 37%, АсАТ – на 26%. Після 30-добового введення карбофосу та на 4-ту добу отруєння $ССІ_4$ активність АлАТ знизилася на 43%, АсАТ – на 29%. На 30- та 7-му добу введення токсинів спостерігали зниження активності амінотрансфераз: АлАТ – на 59%, АсАТ – на 30% відносно рівня уражених тварин. Таким чином, протягом усього експерименту спостерігали зниження активності амінотрансфераз у сироватці крові після введення в уражений токсикантами організм ентеросгелю. Зміни були вірогідними у всі терміни дослідження.

Ще одним маркером цитолізу гепатоцитів є ЛФ, підвищення активності якої у сироватці крові свідчить про розвиток запального процесу у печінці (табл. 1). Введення в уражений ксенобіотиками організм ентеросгелю знижує активність ЛФ. При 10-добовому введенні карбофосу та на 4- і 7-му добу ураження $ССІ_4$ після застосування ентеросгелю активність ЛФ знизилася на

10%. Після 30-добового введення карбофосу та на 4-ту добу отруєння $ССІ_4$ ентеросгель знизив активність ЛФ на 17%, відповідно на 30- та 7-му добу введення токсинів показник знизився на 15% відносно уражених тварин.

Основний патогенетичний механізм дії карбофосу ґрунтується на пригніченні активності АХЕ – ферменту, що каталізує гідроліз ацетилхоліну та відіграє важливу роль у процесі синаптичної передачі нервового імпульсу. Із даних таблиці 1 видно, що протягом усього експерименту за дії токсикантів відбувалося зниження активності АХЕ, при введенні в уражений організм ентеросгелю спостерігали підвищення активності даного ферменту. При 10-добовому введенні карбофосу та на 4-ту добу ураження $ССІ_4$ при введенні коригувального чинника активність АХЕ підвищилася на 16,6%. При 10-добовій інтоксикації карбофосом і на 7-му добу введення тетрахлорметану показник зріс на 11,0%. Після 30-добового введення карбофосу та на 4- та 7-му добу отруєння $ССІ_4$ при введенні ентеросгелю активність даного ферменту підвищилася на 7,0% відносно рівня уражених тварин, що підтверджує коригувальні властивості застосованого нами сорбенту.

У ході експерименту досліджували печінку тварин, уражених вищевказаними ксенобіотиками. У піддослідних щурів спостерігали підвищення вмісту проміжних продуктів вільнорадикального окиснення (табл. 2). Введення в уражений організм ентеросгелю викликало зниження вмісту ТБК-АП. При 10-добовому введенні карбофосу та на 4-ту добу ураження $ССІ_4$ вміст ТБК-АП знизився на 16,0% після застосування ентеросгелю. При 10-добовій інтоксикації карбофосом і на 7-му добу введення тетрахлорметану показник зменшився на 9,0%. Після 30-добового введення карбофосу та на 4-ту добу отруєння $ССІ_4$ за введення ентеросгелю вміст ТБК-АП знизився на 16,0%, відповідно на 30- та 7-му добу введення токсинів показник зменшився на 14,0% відносно уражених тварин.

При ураженні тварин токсикантами відмічене достовірне підвищення вмісту фракцій $СМ_1$ та $СМ_2$ у печінці піддослідних щурів. У печінці уражених тварин введення коригувального чинника знижувало вміст МСМ протягом усього експерименту. При 10-добовому отруєнні карбофосом і на 4- та 7-му добу ураження $ССІ_4$ після введення ентеросгелю активність $СМ_1$ та $СМ_2$ у печінці знизилася в 1,8 раза. У наступний термін дослідження (10 днів ураження карбофосом і 7 днів отруєння тетрахлорметаном) активність фракцій $СМ_1$ знизилась удвічі, $СМ_2$ – в 1,7 раза. Після 30-добового введення карбофосу та на 4-ту добу отруєння $ССІ_4$ показник $СМ_1$ знизився в 2,6 раза, $СМ_2$ – в 1,6 раза у щурів, які отримували ентеросгель порівняно з ураженими щурами; на 30- та 7-му добу введення токсикантів $СМ_1$ знизився в 2,6 раза, $СМ_2$ – в 1,2 раза.

Активність амінотрансфераз у печінці знизилася, що свідчить про порушення процесів переамінування та вказує на цитоліз гепатоцитів в ураженому організмі за дії токсикантів. Введення сорбенту ентеросгелю не викликало вірогідного підвищення активності АлАТ і АсАТ (табл. 2). На кінець експерименту активність даних ензимів зросла на 6% відносно рівня уражених щурів.

**Динаміка біохімічних показників у печінці щурів,
одночасно уражених карбофосом і тетрахлорметаном після корекції ентеросгелем (M ± m)**

| Показник | Інтактний контроль, n = 6 | Термін дослідження, доба | | | | | | | |
|----------------------------|---------------------------|--------------------------|-----------------|-------------------------|-----------------|-------------------------|-----------------|-------------------------|-----------------|
| | | 10 + 4 CCl ₄ | | 10 + 7 CCl ₄ | | 30 + 4 CCl ₄ | | 30 + 7 CCl ₄ | |
| | | уражені, n = 6 | корекція, n = 6 | уражені, n = 6 | корекція, n = 6 | уражені, n = 6 | корекція, n = 6 | уражені, n = 6 | корекція, n = 6 |
| ТБК-АП, мкмоль/кг | 8,65 ± 0,27 | 11,66 ± 0,03* | 10,32 ± 0,02** | 12,21 ± 0,04* | 11,50 ± 0,02** | 13,82 ± 0,03* | 12,46 ± 0,01** | 15,92 ± 0,04* | 14,75 ± 0,02** |
| СМ ₁ , у. о./кг | 0,46 ± 0,17 | 0,90 ± 0,01* | 0,51 ± 0,01** | 1,25 ± 0,01* | 0,63 ± 0,01** | 1,92 ± 0,02* | 0,74 ± 0,01** | 2,41 ± 0,02* | 0,92 ± 0,02** |
| СМ ₂ , у. о./кг | 0,48 ± 0,03 | 0,94 ± 0,01* | 0,52 ± 0,01** | 1,31 ± 0,02* | 0,77 ± 0,01** | 1,89 ± 0,02* | 1,18 ± 0,01** | 2,35 ± 0,02* | 1,94 ± 0,01** |
| АлАТ, мкмоль / (кг·год.) | 2,17 ± 0,01 | 2,11 ± 0,01* | 2,13 ± 0,01 | 2,01 ± 0,01* | 2,07 ± 0,01** | 1,99 ± 0,02* | 2,06 ± 0,01** | 1,88 ± 0,02* | 2,02 ± 0,01** |
| АсАТ, мкмоль / кг год.) | 3,68 ± 0,25 | 3,34 ± 0,21 | 3,52 ± 0,01 | 2,78 ± 0,15* | 3,05 ± 0,01 | 2,72 ± 0,14* | 2,94 ± 0,01 | 2,52 ± 0,14* | 2,74 ± 0,01 |
| ЛФ, ммоль/л | 12,61 ± 0,37 | 10,72 ± 0,30* | 12,16 ± 0,01** | 7,83 ± 0,35* | 9,22 ± 0,01** | 7,32 ± 0,24* | 10,12 ± 0,01** | 5,76 ± 0,24* | 8,17 ± 0,01** |
| АХЕ, мкг/хв | 177,1 ± 0,32 | 153,0 ± 0,53* | 171,3 ± 0,30** | 130,7 ± 0,64* | 167,3 ± 0,67** | 125,2 ± 0,66* | 167,6 ± 0,61** | 121,5 ± 0,35* | 159,3 ± 0,49** |

За дії токсикантів на організм тварин спостерігали підвищення активності лужної фосфатази у сироватці крові та зниження її активності у печінці дослідних щурів (табл. 2). При уведенні в уражений організм ентеросгелю відмічено підвищення активності даного ферменту у печінці. При 10-добовому уведенні карбофосу та на 4- та 7-му добу ураження CCl₄ активність ЛФ зросла на 11,0%. Після 30-добового уведення карбофосу та на 4-ту добу отруєння CCl₄ при введенні ентеросгелю активність ЛФ збільшилася на 22,0%, відповідно на 30- та 7-му добу введення токсинів показник зріс на 19,0% відносно уражених тварин. Таким чином, застосування ентеросгелю зумовило нормалізацію даного показника у печінці уражених тварин, що свідчить про зменшення запального процесу в даному органі.

Ураження щурів ксенобіотиками викликає пригнічення активності АХЕ у печінці, що може слугу-

вати індикатором для визначення ступеня ураження організму фосфоорганічними сполуками. Застосовуючи сорбент, ми спостерігали підвищення активності даного ферменту. При 10-добовому введенні карбофосу та на 4-ту добу ураження CCl₄ активність АХЕ підвищилась на 11,0%. При 10-добовій інтоксикації карбофосом і на 7-му добу введення тетрахлорметану показник зріс на 20,0% при застосуванні сорбенту. Після 30-добового уведення карбофосу та на 4-ту добу отруєння CCl₄ при введенні ентеросгелю активність даного ферменту підвищилась на 24,0%, відповідно на 30- та 7-му добу уведення токсинів на 21,0% порівняно з ураженими тваринами, що підтверджує коригувальні властивості ентеросгелю.

У ході експерименту виявлено патологічні зміни в міокарді уражених тварин: збільшення вмісту ТБК-АП та пригнічення активностей АлАТ і АсАТ (табл. 3).

Таблиця 3

**Динаміка біохімічних показників у міокарді щурів,
одночасно уражених карбофосом і тетрахлорметаном після корекції ентеросгелем (M ± m)**

| Показник | Інтактний контроль, n = 6 | Термін дослідження, доба | | | | | | | |
|------------------------|---------------------------|--------------------------|-----------------|-------------------------|-----------------|-------------------------|-----------------|-------------------------|-----------------|
| | | 10 + 4 CCl ₄ | | 10 + 7 CCl ₄ | | 30 + 4 CCl ₄ | | 30 + 7 CCl ₄ | |
| | | уражені, n = 6 | корекція, n = 6 | уражені, n = 6 | корекція, n = 6 | уражені, n = 6 | корекція, n = 6 | уражені, n = 6 | корекція, n = 6 |
| ТБК-АП, мкмоль/кг | 11,25 ± 0,09 | 12,85 ± 0,02* | 11,92 ± 0,02** | 13,63 ± 0,11* | 12,71 ± 0,02** | 15,64 ± 0,05* | 14,94 ± 0,01** | 16,67 ± 0,06* | 16,07 ± 0,02** |
| АлАТ, мкмоль/(кг год.) | 2,11 ± 0,01 | 2,02 ± 0,01* | 2,05 ± 0,01** | 1,95 ± 0,01* | 2,01 ± 0,01** | 1,92 ± 0,01* | 1,95 ± 0,01** | 1,84 ± 0,01* | 1,89 ± 0,01** |
| АсАТ, мкмоль/(кг год.) | 3,53 ± 0,01 | 3,46 ± 0,01* | 3,47 ± 0,01 | 3,39 ± 0,01* | 3,41 ± 0,01** | 3,26 ± 0,01* | 3,30 ± 0,01** | 3,18 ± 0,01* | 3,22 ± 0,01** |

При використанні ентеросгелю спостерігається зменшення вмісту ТБК-АП у міокарді уражених тварин. При 10-добовому введенні карбофосу та на 4- і 7-му добу ураження CCl₄ вміст ТБК-АП знизився на 9,0%.

При 30-добовій інтоксикації карбофосом та на 4-ту добу після ураження тетрахлорметаном даний показник знизився на 6,0%, у наступний термін дослідження та після введення ентеросгелю вміст ТБК-АП знизився на 5,0%. Із даних, наведених у таблиці 3, видно, що засто-

сування сорбенту не викликало суттєвого зростання активності амінотрансфераз у міокарді уражених щурів. На кінець експерименту активність АлАТ зросла на 2,5%, активність АсАТ зазнала незначних змін.

Висновки

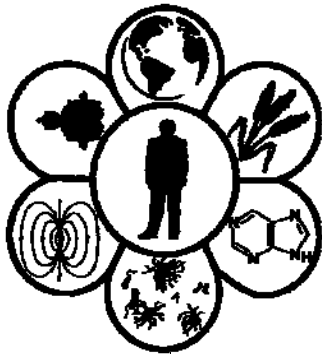
Розвиток токсичного гепатиту, викликаного уведенням в організм тетрахлорметану, на тлі 30-добового ура-

ження шурів карбофосом спричинює глибокі метаболічні порушення. На це вказують зміни вмісту ТБК-АП, молекул середньої маси, активностей амінотрансфераз, лужної фосфатази та ацетилхолінестерази. Застосування ентеросгелю зумовило пригнічення процесів вільнорадикального окиснення, зниження ступеня ендогенної інтоксикації організму та зменшення запальних процесів в уражених ксенобіотиками шурів, що дозволяє провести наступні дослідження з вивчення ефективності застосування даного сорбенту за умов хімічного отруєння.

Бібліографічні посилання

- Bondarev, E.V., Shtrygol, S.Y., Dyryavyu, S.B., 2008. Prime-nenie enterosorbentov v meditsinskoj praktike [Use of enterosorbents in medical practice]. *Provizor [Pharmacist]* 13–14, 39–43 (in Russian).
- Gubskiy, Y.I., Levitsky, Y.L., Zadorin, O.V., Yanitska, L.V., Afanasenko, O.V., 2005. Biochemical and molecular mechanisms of chemical cell death by destruction highly toxic xenobiotics. *Bukov. Med. Herald.* 9(2), 76–77.
- Guide for the care and use of laboratory animals: Eighth edition, 2011. The National Academies Press, Washington, DC.
- Kind, J., 1954. Determination of the activity of alkaline phosphatase. *J. Clin. Path.* 7(4), 322–326.
- Kolb, V.G., Kamyshnikov, V.S., 1982. *Spravochnik po klinicheskoy himii [Handbook of clinical chemistry]*. Belarus, Minsk (in Russian).
- Lapach, S.N., Chubenko, A.V., Babich, P.N., 2000. Statisticheskie metody v medikobiologicheskikh issledovaniyah s ispolzovaniem Excel [Statistical methods in medical-biological researches with using of Excel]. Morion, Kiev (in Russian).
- Lushchak, V.I., Bahnyukova, T.V., Lushchak, A.V., 2004. Indicators of oxidative stress. Thiobarbituric products and protein carbonyl groups. *Ukr. Biochem. J.* 26, 136–141 (in Ukrainian).
- Nikolaichik, V.V., Kirkovski, V.V., Main, V.M., 1989. "Middle molecules" – education and methods of the determination. *Lab. Delo* 8, 31–33.
- Reitman, S., Frankel, S., 1957. Definition of biochemical indicators of the toxicity of liver. *Amer. J. Clin. Path.* 28(1), 56–60.
- Rybolovlev, Y.R., 1979. Dosing agents for mammalian by the constants of biological activity. *Reports of AN USSR* 247(6), 1513–1516.
- Voronko, E.A., 2004. Acute poisoning with organophosphorous compounds. *Medicine* 4, 26–29.
- Walewsky, S.F., Shinkarenko, N.D., Dubovsky, N.G., Borisov, I.S., 2003. To diagnose of neuropathies caused by the toxic exposure to organophosphorus compounds having a remote neurotoxicity. *Modern Problems of Toxicology* 2, 77–79.
- Yermolayeva, E.E., Goncharov, N.V., Radilov, A.S., 2008. Esterase activity, platelet hemostasis, neuromuscular conduction and morphological changes in the modeling of chronic oral toxicity substance type Vx. *Toxicol. News* 3, 2–8.
- Zhminko, P.G., Loboda, Y.I., 2003. Toxicity and anticholinergic effect of some organophosphorus pesticides according to their sorption on serum proteins. *Modern Problems of Toxicology* 1, 18–21.

Надійшла до редколегії 28.10.2014



УДК 616.361–002.1

Патогенетические аспекты острого холангита

В.Б. Борисенко¹, С.Г. Белов¹, И.В. Сорокина², Н.И. Горголь²

¹Харьковская медицинская академия последипломного образования, Харьков, Украина

²Харьковский национальный медицинский университет, Харьков, Украина

Проведено экспериментальное исследование на 36 половозрелых крысах линии Вистар, направленное на изучение особенностей патогенеза острого холангита. По результатам комплексного динамического патоморфологического исследования холедоха с использованием стандартных морфологических, морфометрических, а также иммуногистохимических методик впервые установлено, что помимо действия двух известных факторов патогенеза острого холангита в виде холестаза и инфекции для его возникновения необходимо наличие третьего фактора в виде повреждения слизистой оболочки желчных протоков. Выраженность морфологических изменений общего желчного протока у животных с моделью острого холангита зависит от состояния эпителия его слизистой оболочки. В наблюдениях, где сохранялась целостность эпителиального покрова его слизистой оболочки, воспалительные изменения в холедохе носили слабо выраженный или умеренный характер, что подтверждает факт достаточной устойчивости эпителия желчных путей к инфекции даже при наличии холестаза и бактериохолии. В случаях, где происходила дезэпителизация слизистой оболочки холедоха вследствие расширения очаговых зон его некрозов, отмечалось развитие тяжелого гнойно-деструктивного холангита и перихолангита. В морфогенезе повреждения эпителиальной выстилки холедоха установлена существенная роль снижения адгезивных свойств эпителиоцитов, а также дефицита коллагена IV типа в составе эпителиальных базальных мембран.

Ключевые слова: острый холангит; холедох; патоморфологические изменения; патогенез

Pathogenic aspects of acute cholangitis

V. Borisenko¹, S. Belov¹, I. Sorokina², N. Gorgol²

¹Kharkov Medical Academy of Post-Graduate Education, Kharkov, Ukraine

²Kharkov National Medical University, Kharkov, Ukraine

The research is aimed at the study of dynamic pathomorphological changes of choledoch and acute cholangitis development factors determined during the experiment. 36 rats of Wistar line were under trial. The main group consisted of 30 animals undergoing the open laparotomy, choledoch ligation and puncture modeling of acute cholangitis by *E. coli* culture in 1×10^8 CFU/ml concentration under general anesthesia. 6 healthy rats were included in the control group. Samples of general biliary duct under autopsy for pathomorphological study were taken on the 3rd, 7th, 14th, 21st and 30th day. In panoramic samples colored by hematoxylin and eosin the degree of dystrophic, necrobiotic, hemodynamic, inflammatory and atrophic manifestations² changes were studied. Average depth of choledoch wall and height of its epithelial lining were morphometrically estimated. Collagen of the IV type as well as expressing receptors to CD34 were defined with the help of monoclonal antibodies in choledoch epithelial cells of basal membranes and choledoch vessels endotheliocytes. In choledoch, enhancement of edema and inflammatory infiltration by lymphoplasmocytic elements with the admixture of neutrofiles with granulation tissue was detected from the 3rd up to the 30th day of the experiment. From the 14th day formation of bile clots of blood was detected in choledoch clearance, part of which was locked to its de-epitheliolized internal surface. According to morphometrical study data, choledoch wall depth increased from $261.1 \pm 3.13 \mu\text{m}$ on the 3rd day to $572.5 \pm 3.42 \mu\text{m}$ on the 30th day of the experiment. Mucosa membrane has lost its folding on the 14th day, epitheliocytes flattening was replaced by their destruction with fragments rejection into the duct lumen by the 30th day of the experiment. The epithelium height index decreased from $14.8 \pm 0.09 \mu\text{m}$ on the 3rd day to $11.7 \pm 0.15 \mu\text{m}$ on the 30 day of the experiment. Collagen of the IV type fluorescence intensity of vessel basal membranes from the 3rd day closely matched the control, its enhancement was detected by the 30th day. Choledoch epitheliocytes fluorescence, expressing the receptors to CD34 reliably decreased by the 30th day of the

¹Харьковская медицинская академия последипломного образования, ул. Корчагинцев, 58, Харьков, 61176, Украина

Kharkov Medical Academy of Post-Graduate Education, Korchagintsev Str. 58, Kharkov, 61176, Ukraine

Tel.: +38-097-486-59-35. E-mail: vabodoc@ukr.net

²Харьковский национальный медицинский университет, пр. Ленина, 4, Харьков, 61022, Украина

Kharkov National Medical University, Lenin Ave., 4, Kharkov, 61022, Ukraine

study. In its turn, content of collagen of the IV type, as well as vessels endothelium expression in preparations treated by PQA to CD34 reliably increased by the 30th day of the experiment. Thus, in pathogenesis of acute cholangitis apart from well-known factors such as cholestasis and infection the third factor was detected, in the way of biliary ducts mucosa membrane lesion. In morphogenesis of choledoch mucosa membrane lesion the decrease in role of epitheliocytes adhesive properties was stated as well as deficit of collagen of the IV type in the structure of epithelial basal membranes. During observations where epithelial covering consistency was preserved, inflammatory changes in choledoch were insignificant, which is proved by sufficient resistance of biliary ducts epithelium to infection in the presence of cholestasis and bacteriocolia, but in cases when mucosa membrane de-epitheliolization took place the development of severe purulent-destructive cholangitis and pericholangitis was detected.

Keywords: acute cholangitis; choledoch; pathomorphological changes; pathogenesis

Введение

Согласно современным представлениям острый холангит (ОХ) – это патологический процесс, который характеризуется воспалением желчных протоков и развивается на фоне предшествующих холестаза и бактериохолии (Gal'perin, 2009; Dascenko, 2010; Wang et al., 2012; Ahaladze, 2013). При определенных условиях течение механической желтухи (МЖ) может осложниться развитием ОХ, который в ряде случаев может трансформироваться в билиарный сепсис (БС) (Korol'kov, 2009; Stolin et al., 2009; Mosler, 2011). Согласно наиболее распространенной точке зрения ОХ является локализованным патологическим процессом желчных протоков, а БС представляет собой системную воспалительную реакцию организма на расположенный в желчных протоках гнойный очаг (Ahaladze, 2009; Chacko, 2013).

Актуальность проблемы «механическая желтуха – острый холангит» определяется ростом числа заболеваний органов гепатопанкреатодуоденальной зоны, которые сопровождаются МЖ, стабильно высоким процентом послеоперационных осложнений (24–54%), а также высокой летальностью, достигающей 60%, а в случаях развития билиарного септического шока – 100% (Suda et al., 2009; Eliseev et al., 2010; Xu et al., 2012; Chacko, 2013).

Накопленный к настоящему времени определенный опыт экспериментальных и клинических исследований выделяет ряд основных факторов в развитии ОХ, однако ряд вопросов, касающихся особенностей развития этого осложнения МЖ, остаются неясными и требуют своего решения (Khan et al., 2010; Datsenko and Borisenko, 2013). Малоизученными остаются механизмы, определяющие сроки развития и степень выраженности ОХ у пациентов с МЖ различного генеза (Norwood et al., 2010; Kloek et al., 2010; Kucukav et al., 2010). Недостаточно изучены и трактуются противоречиво пути развития как портальной, так и системной бактериемии и эндотоксемии при нарастающем ОХ (Gal'perin et al., 2009; Fialkina et al., 2012). Спорным остается вопрос о роли энтерогенной бактериальной транслокации в развитии бактериохолии. Полностью отсутствуют материалы комплексного изучения стадийности патоморфологических изменений желчных протоков, печени и других внутренних органов при прогрессирующем ОХ. Цель данного исследования – установить патоморфологические факторы развития острого холангита в эксперименте.

Материал и методы исследований

Исследование проведено на 36 крысах линии Вистар, массой 160–220 г в условиях вивария Харьковской ме-

дицинской академии последиplomного образования. Животные с соблюдением полового признака были распределены на две группы: основную – 30 животных и контрольную – 6 крыс. Животным основной группы в условиях общей анестезии (кетамин, 50 мг/кг) произведено моделирование ОХ путем перевязки холедоха и инфицирования его желчи суточной культурой *E. coli* (ГСК 240533) в концентрации 1×10^8 КОЕ/мл физиологического раствора. Из эксперимента крысы выводились на 3, 7, 14, 21, 30-е сутки путем введения летальной дозы анестетика (кетамин, 100 мг/кг). На аутопсии производили забор общего желчного протока для его патоморфологического исследования.

Манипуляции на животных проводили в соответствии с научно-практическими рекомендациями по содержанию лабораторных животных и работы с ними (Kozhemyakin et al., 2002), а также согласно «Европейской конвенции по защите позвоночных, используемых для экспериментальных и иных научных целей» (Страсбург, 1986).

Изучение микропрепаратов и их микрофотографирование проводили на микроскопе Olympus BX-41. В обзорных препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, изучали степень выраженности дистрофических, некробиотических, гемодинамических, воспалительных и атрофических изменений. Морфометрически оценивали среднюю толщину стенки холедоха и высоту его эпителиальной выстилки.

Иммуногистохимические исследования проводили прямым методом Кунса по методике Brosman (1979). С помощью моноклональных антител (МКА) в эпителиоцитах базальных мембран холедоха и эндотелиоцитах сосудов холедоха определяли коллаген IV типа, а также клетки, экспрессирующие рецепторы к CD34 (Novocastra Laboratories Ltd.). Оптическую плотность иммунофлуоресценции (ОПИ) определяли по методу Г.И. Губиной-Вакулик и соавторов (Gubina-Vakulyk et al., 2009) с помощью микроскопа Axioskor 40 и программного обеспечения Biostat (McGraw Hill, Version 5.7.4.0, 2009).

Для статистической обработки результатов использованы методы вариационной статистики (для расчета выборочных средних \bar{x} и среднеквадратического отклонения SD), параметрический критерий Стьюдента, методы анализа альтернативных признаков (для оценки достоверности различий в частоте встречаемости признаков). Материал в таблицах и тексте указан в виде $\bar{x} \pm SD$.

Результаты и их обсуждение

При патоморфологическом исследовании на 3-и сутки эксперимента в просвете холедоха определяется гнойный экссудат, его стенка умеренно утолщена за счет отека и воспалительной инфильтрации лимфоплазмодитарными

элементами с примесью нейтрофилов. По данным морфометрического исследования, толщина стенки холедоха составляет $261,1 \pm 7,7$ мкм (табл. 1). Слизистая оболочка (СО) утолщена, сохраняет складчатость, эпителий с признаками дистрофии и очагами десквамации с наложениями в участках десквамации нитей фибрина и нейтрофильных гранулоцитов. Субэпителиальные базальные мембраны (БМ) содержат коллаген IV типа, при этом интенсивность его свечения существенно не отличается от контроля, равно как и интенсивность свечения эпителиоци-

тов, экспрессирующих рецепторы к CD34 (табл. 2). Высота эпителия составляет $14,8 \pm 0,2$ мкм, что достоверно меньше ($P < 0,001$) показателя группы сравнения (табл. 1). В микрососудах холедоха наблюдаются явления стаза и сладжа. В составе сосудистых БМ выявляется более слабое по сравнению с контролем свечение коллагена IV типа, что проявляется достоверным снижением показателя ОПИ. ОПИ эндотелиальной выстилки сосудов в препаратах, обработанных МКА к CD34, по сравнению с контролем выявляет тенденцию к уменьшению (табл. 2).

Таблица 1

Морфометрические показатели некоторых структурных элементов холедоха

| Показатель | Контрольная группа, n = 6 | Основная группа | | | | |
|-----------------------------------|---------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | 3-и сутки, n = 6 | 7-е сутки, n = 6 | 14-е сутки, n = 6 | 21-е сутки, n = 6 | 30-е сутки, n = 6 |
| Толщина стенки холедоха, мкм | $255,5 \pm 3,5$ | $261,1 \pm 7,7^1$ | $357,1 \pm 5,8^1$ | $368,8 \pm 6,1^1$ | $380,0 \pm 6,4^1$ | $572,5 \pm 8,4^1$ |
| Толщина эпителия СО холедоха, мкм | $15,5 \pm 0,3$ | $14,8 \pm 0,2^2$ | $13,0 \pm 0,5^2$ | $13,3 \pm 0,5^2$ | $16,7 \pm 0,4^2$ | $11,7 \pm 0,4^2$ |

Примечание: ^{1, 2} – различия с контролем достоверны, $P < 0,001$.

Таблица 2

Показатели оптической плотности иммунофлуоресценции некоторых структурных элементов холедоха

| Группа | Контрольная группа, n = 6 | Основная группа | | | | |
|---|---------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | | 3-и сутки, n = 6 | 7-е сутки, n = 6 | 14-е сутки, n = 6 | 21-е сутки, n = 6 | 30-е сутки, n = 6 |
| ОПИ коллагена IV типа в составе эпителиальных БМ холедоха | $0,654 \pm 0,003$ | $0,652 \pm 0,020$ | $0,648 \pm 0,003^1$ | $0,632 \pm 0,010^1$ | $0,521 \pm 0,005^1$ | $0,504 \pm 0,010^1$ |
| ОПИ коллагена IV типа в составе сосудистых БМ холедоха | $0,489 \pm 0,005$ | $0,474 \pm 0,005^2$ | $0,482 \pm 0,007^2$ | $0,491 \pm 0,003$ | $0,532 \pm 0,010^2$ | $0,564 \pm 0,005^2$ |
| ОПИ эпителиоцитов холедоха, экспрессирующих рецепторы к CD34 | $0,374 \pm 0,007$ | $0,375 \pm 0,005$ | $0,362 \pm 0,007^3$ | $0,348 \pm 0,003^3$ | $0,356 \pm 0,020^3$ | $0,368 \pm 0,005^3$ |
| ОПИ эндотелиоцитов сосудов холедоха, экспрессирующих рецепторы к CD34 | $0,531 \pm 0,020$ | $0,528 \pm 0,010$ | $0,532 \pm 0,010$ | $0,538 \pm 0,020$ | $0,546 \pm 0,020^4$ | $0,548 \pm 0,020^4$ |

Примечание: ^{1, 2, 3, 4} – различия с контролем достоверны, $P < 0,001$.

На 7-е сутки эксперимента стенка холедоха резко утолщена за счет выраженного отека и инфильтрации нейтрофилами (рис. 1). По данным морфометрического исследования ее толщина составляет $357,1 \pm 5,8$ мкм, что значительно ($P < 0,001$) превышает показатели группы сравнения и предыдущего срока эксперимента (табл. 1). СО утолщена, сохраняется складчатость, эпителиальная выстилка уплощена с очагами десквамации, наложениями на них нитей фибрина и нейтрофильных гранулоцитов. По данным морфометрического исследования, высота эпителия составляет $13,0 \pm 0,47$ мкм (табл. 1). Выпадение фибрина – показатель высокой проницаемости или даже наличия микроперфораций в БМ сосудистых стенок при воспалении, что делает возможным выход в экссудат фибриногена.

В субэпителиальных БМ снижается содержание коллагена IV типа, о чем свидетельствует достоверное уменьшение показателя интенсивности свечения этого коллагена по сравнению с контролем, при этом достоверно снижается и интенсивность свечения эпителиоцитов, экспрессирующих рецепторы к CD34, вследствие чего показатель ОПИ достоверно ниже контрольного (табл. 2). В сосудистых БМ содержание коллагена IV типа достоверно ниже контрольного, тогда как ОПИ эндотелия сосудов в препаратах, обработанных МКА к CD34, практически соответствует контролю (табл. 2).

На 14-е сутки эксперимента в утолщенной стенке холедоха определяются отек и нейтрофильная инфильтрация, а в просвете – формирование желчных тромбов. Часть из этих тромбов расположены свободно в просвете протока, другие фиксированы к его внутренней поверхности. В зонах фиксации желчных тромбов эпителиальный покров и СО протока в целом разрушены. По нашему мнению, выпадение фибрина на поверхности СО формирует своеобразную «матрицу», на которой возможно образование желчных тромбов. На всем остальном протяжении отмечается сглаженность складчатости СО и уплощение эпителиоцитов. По данным морфометрического исследования, толщина стенки холедоха составляет $368,8 \pm 6,1$ мкм, что достоверно ($P < 0,001$) превышает показатель группы сравнения (табл. 1). Высота эпителия, по данным морфометрического исследования, составляет $13,3 \pm 0,45$ мкм, что достоверно ($P < 0,001$) меньше показателя группы сравнения (табл. 1). БМ эпителия выявляют слабое неравномерное свечение в препаратах, обработанных МКА к коллагену IV типа. Вследствие вышеуказанного ОПИ этого коллагена по сравнению с контролем достоверно снижена (табл. 2), равно как и ОПИ эпителиоцитов, экспрессирующих рецепторы к CD34 (рис. 2, табл. 2).

В микрососудах стенки холедоха, кроме распространенного тромбоза, отмечаются воспалительные измене-

ния с развитием эндо- и периваскулитов. В БМ сосудов содержание коллагена IV типа несколько превышает контрольный показатель, а ОПИ эндотелия сосудов в препаратах, обработанных МКА к CD34, выявляет тенденцию к повышению по сравнению с контролем (табл. 2).

На 21-е сутки эксперимента стенка холедоха по сравнению с предыдущим сроком еще более значительно утолщена, отечна, в субэпителиальных отделах диффузно инфильтрирована нейтрофилами. По данным морфометрического исследования, толщина стенки хо-

ледоха составляет $380,0 \pm 6,4$ мкм (табл. 1). В просвете холедоха обнаруживаются желчные тромбы, расположенные свободно и фиксированные к дезэпителизированной внутренней поверхности. Повреждение СО характеризуется уплощением и дистрофией эпителия, очаговой деструкцией, а также разрушением его собственной пластинки. Местами отмечается сглаживание складчатости СО. В участках сохранной эпителиальной выстилки высота эпителия, по данным морфометрического исследования, составляет $16,7 \pm 0,4$ мкм (табл. 1).

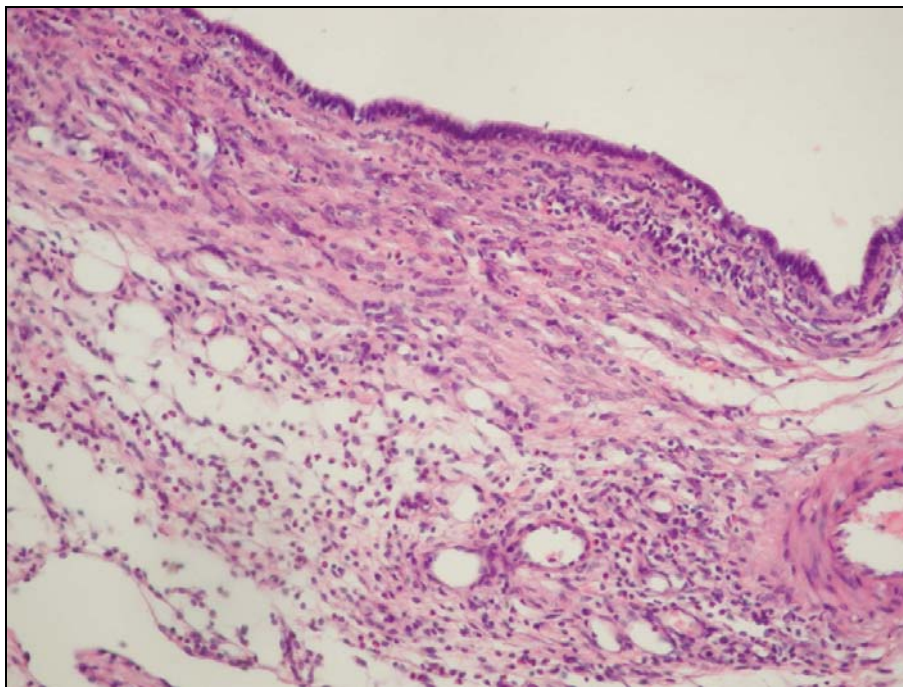


Рис. 1. Гистоструктура холедоха животного основной группы на 7-е сутки эксперимента: определяется утолщение стенки за счет выраженного отека и инфильтрации нейтрофилами; окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$



Рис. 2. Немногочисленные эпителиоциты холедоха, экспрессирующие рецепторы к CD34 (I) у животного основной группы на 14-е сутки эксперимента: прямой метод Кунса с МКА к CD34; размер прямоугольника соответствует 10 мкм

Содержание коллагена IV типа в БМ эпителия резко снижено, о чем свидетельствует достоверное снижение по сравнению с контролем показателя ОПИ этого коллагена. При этом достоверно снижается и интенсивность свечения эпителиоцитов, экспрессирующих рецепторы к CD34 (табл. 2).

В БМ сосудов содержание коллагена IV типа достоверно превышает контрольный показатель, равно как и ОПИ эндотелия сосудов в препаратах, обработанных МКА к CD34 (табл. 2). В микрососудах стенки холедоха обнаруживается картина пролиферативного эндотромбоваскулита.

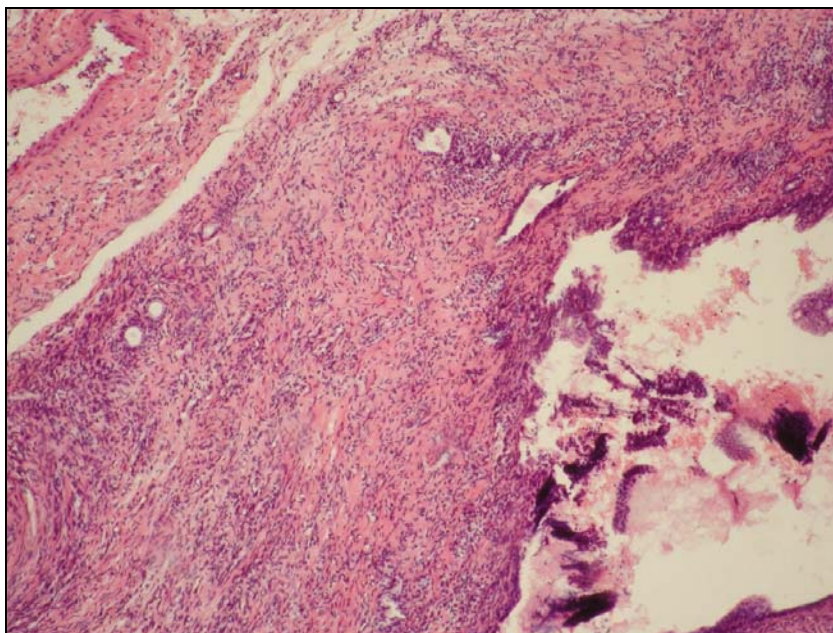


Рис. 3. Гистоструктура холедоха животного основной группы на 30-е сутки эксперимента: его стенка утолщена, отечна, диффузно инфильтрирована нейтрофилами, СО с глубоким некрозом; окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$

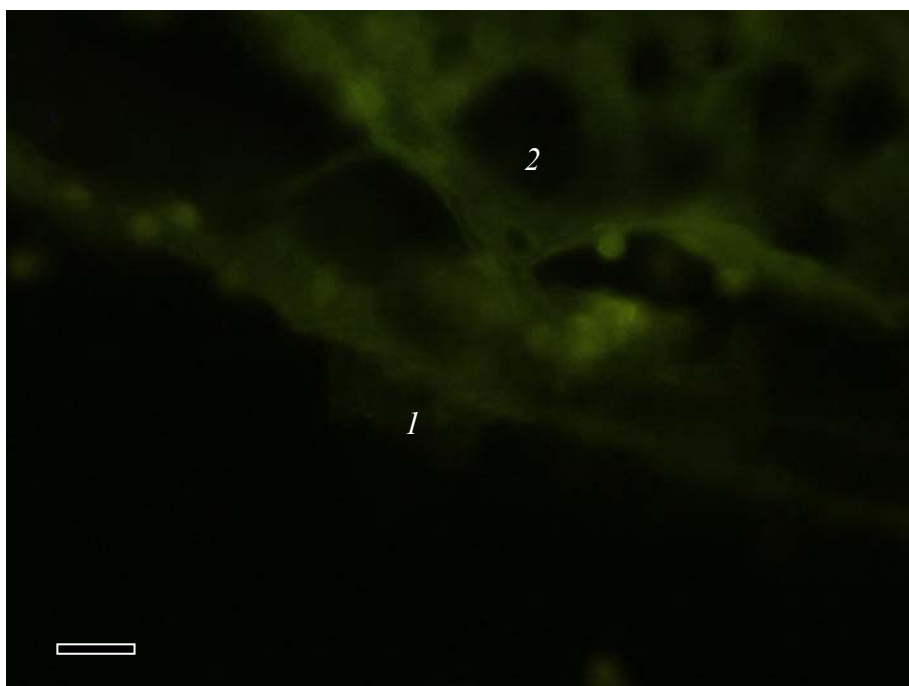


Рис. 4. Слабое свечение коллагена IV типа в эпителиальной БМ холедоха (1) и яркое его свечение в сосудах холедоха (2): прямой метод Кунса с МКА к коллагену IV типа; размер прямоугольника соответствует 10 мкм

На 30-е сутки эксперимента стенка холедоха утолщена, отечна, диффузно инфильтрирована нейтрофилами. В просвете холедоха обнаруживаются желчные тромбы СО со сглаженной складчатостью, эпителиальный покров уплощен, отмечается очаговая его деструкция с отторжением фрагментов эпителия в просвет про-

тока, а также поверхностные и глубокие некрозы (рис. 3). В микрососудах стенки холедоха картина пролиферативного эндотромбоваскулита. По данным морфометрического исследования, толщина стенки холедоха достигает максимального значения в данной экспериментальной группе и составляет $572,5 \pm 8,4$ мкм

(табл. 1). Такое значительное утолщение связано как с отеком и воспалительной инфильтрацией, так и с образованием грануляционной ткани в стенке холедоха. Высота эпителия холедоха в участках сохраненной эпителиальной выстилки составляет $11,7 \pm 0,37$ мкм и является наименьшим показателем в данной экспериментальной группе (табл. 1). БМ эпителия обеднены коллагеном IV типа (рис. 4), о чем свидетельствует резкое и достоверное снижение по сравнению с контролем показателя ОПИ этого коллагена (табл. 3). Достоверно снижается ОПИ эпителиоцитов, экспрессирующих рецепторы к CD34 (табл. 2). В БМ сосудов эти показатели продолжают увеличиваться (табл. 2).

Полученные нами результаты динамических патоморфологических исследований холедоха позволяют с новой позиции уточнить механизм развития острого холангита. Помимо ранее известного пути развития портальной бактериемии и эндотоксемии вследствие холангионозного рефлюкса, а также разрыва печеночных балок при нарастающем холестаза выявлен новый механизм, протекающий при непосредственном функциональном и органическом нарушении структурных компонентов холедоха. Впервые установлено, что при сохранении целостности эпителиального покрова СО холедоха, воспалительные изменения в нём носили слабо выраженный или умеренный характер, что подтверждает факт достаточной устойчивости эпителия желчных путей к инфекции даже при наличии холестаза и бактериохолии. В случаях, где происходила дезэпителизация СО холедоха вследствие «расширения» очаговых зон его некрозов, отмечалось усиление воспалительного процесса с признаками тяжелого гнойно-деструктивного холангита и перихолангита.

Представленные результаты исследования позволяют пересмотреть подходы к существующей лечебной тактике у пациентов с ОХ, особенно в случаях холедохолитиаза.

Выводы

Выраженность морфологических изменений общего желчного протока у животных с моделью острого холангита зависит от состояния эпителия его слизистой оболочки. В морфогенезе повреждения эпителиальной выстилки холедоха установлена существенная роль снижения адгезивных свойств эпителиоцитов, а также дефицита коллагена IV типа в составе эпителиальных БМ. Полученные результаты позволяют утверждать, что в патогенезе острого гнойного холангита помимо таких известных факторов как холестаза и инфекция не менее существенным третьим фактором развития является повреждение СО желчных протоков.

Библиографические ссылки

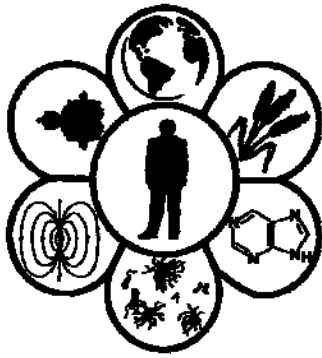
Ahaladze, G.G., 2013. Holedocholitiiaz. Holangit i biliarnyj sepsis: Gde granica? [Choledocholithiasis. Cholangitis and biliary sepsis: Where is the line?] *Annaly Hirurgicheskoy Gepatologii* 18(1), 54–58 (in Russian).
 Ahaladze, G.G., 2009. Patogeneticheskie aspekty gnojnogo holangita, pochemu net sistemnoj vospalitel'noj reakcii pri

mehanicheskoy zheltuhe? [Pathogenetic aspects of suppurative cholangitis. Why not systemic inflammatory response with obstructive jaundice?] *Annaly Hirurgicheskoy Gepatologii* 14(2), 9–15 (in Russian).

- Chacko, V.V., Shatalov, A.D., Vojtkuk, V.N., Fominov, C.M., Matvienko, V.A., 2013. Ostryj holangit i biliarnyj sepsis [Acute cholangitis and biliary sepsis]. *Ukrainskij Zhurnal Hirurgii* 2, 152–157 (in Russian).
 Dacenko, B.M., 2010. Obturacionnaja zheltuha: Patogeneticheskaja osnova razvitija gnojnogo holangita i biliarnogo sepsisa [Obstructive jaundice: Pathogenetic basis for the development of suppurative cholangitis and biliary sepsis]. *Annaly Vinnyckogo Nacional'nogo Medychnogo Universytentu* 14(1), 15–19 (in Russian).
 Dacenko, B.M., Borisenko, V.B., 2013. Mehanicheskaja zheltuha, ostryj holangit, biliarnyj sepsis: Ih patogeneticheskaja vzaimosvjaz' i principy differencial'noj diagnostiki [Jaundice, acute cholangitis, biliary sepsis: Their pathogenetic relationship and principles of differential diagnosis]. *Novosti Hirurgii* 5, 31–39 (in Russian).
 Eliseev, S.M., Kornilov, N.G., Chikotilov, S.P., Gumerov, R.R., 2010. Obosnovanie hirurgicheskoy taktiki pri mehanicheskoy zheltuhe [Justification of surgical tactics in obstructive jaundice]. *Bjul. VSNC SO RAMN* 5(75), 233–239 (in Russian).
 Fialkina, S.V., Bekbauov, S.A., Maznitsa, D.A., 2012. Intestine microbiocenosis in mechanical jaundice caused by obturation of biliary ducts. *Zh. Mikrobiol. (Moscow)* 3, P. 61–64.
 Gal'perin, E.I., Ahaladze, G.G., Kotovskij, K.G., Glebov, A.J., Chevokin, O.N., Momunova, O.N., 2009. Patogenez i lechenie ostrogo gnojnogo holangita [Pathogenesis and treatment of acute suppurative cholangitis]. *Annaly Hirurgicheskoy Gepatologii* 14(4), 13–21 (in Russian).
 Gubina-Vakulyk, I.G., Sorokina, I.V., Markovs'kyi, V.D., 2009. Sposib kil'kisnogo vyznachennja vmistu antygeny v biologichnyh tkanynah [The method of quantitative determination of antigen content in biological tissues]. Patent 46489 Ukraine, G 01N 33/00. Nu200906730; zajavl. 26.06.09; opubl. 25.12.09. *Bjul. N 4.* (in Ukrainian).
 Horwood, J., Akbar, F., Davis, K., Morgan, R., 2010. Prospective evaluation of a selective approach to cholangiography for suspected common bile duct stones. *Ann. R. Coll. Surg. Engl.* 92(3), 206–210.
 Khan, A.B., Khan, A.B., Salati, S.A., Bhat, N.A., Parihar, B.K., 2010. Association between intraoperative bactibilia and postoperative septic complications in biliary tract. *Surg. East Centr. African. J. Surg.* 15(2), 113–121.
 Kloek, J.J., van der Gaag, N.A., Aziz, Y., Rauws, E.A., van Delden, O.M., Lameris, J.S., Busch, O.R., Gouma, D.J., van Gulik, T.M., 2010. Endoscopic and percutaneous preoperative biliary drainage in patients with suspected hilar cholangiocarcinoma. *J. Gastrointest. Surg.* 14(1), 119–125.
 Koroľkov, A.J., 2009. Holangit i biliarnyj sepsis: Problema i puti reshenija [Cholangitis and biliary sepsis: Problems and solutions]. *Vestn. Hirurgii im. I.I. Grekova* 187(3), 17–20 (in Russian).
 Kozhemyakin, Y.M., Khromov, A.S., Filonenko, M.A., Saifutdinova, G.A., 2002. *Metodychni rekomendacii' po utrymannju laboratornyh tvaryn ta roboti z nymy* [Guidelines for the maintenance of laboratory animals and working with them]. Avicena, Kyiv (in Ukrainian).
 Kucukav, F., Okten, R.S., Cumhur, T., 2011. Percutaneous biliary intervention for primary sclerosing cholangitis in a patient with situs inversus totalis. *Turk. J. Gastroenterol.* 22(6), 636–640.
 Mosler, P., 2011. Management of acute cholangitis. *Gastroenterol. Hepatol.* 7(2), 121–123.
 Stolin, A.V., Prudkov, M.I., Nishnevich, E.V., 2009. The choice of treatment in patients with suppurative cholangitis. The

- Annals of the Russian Academy of Medical Sciences 3, 126–129.
- Suda, K., Ohtsuka, M., Ambiru, S., Kimura, F., Shimizu, H., Yoshidome, H., Miyazaki, M., 2009. Risk factors of liver dysfunction after extended hepatic resection in biliary tract malignancies. *Am. J. Surg.* 197, 752–758.
- Wang, Q., Gurusamy, K.S., Lin, H., Xie, X., Wang Wang, C., 2012. Pre-operative biliary drainage for obstructive jaundice. *Cochrane Database Syst. Rev.* 12, 9.
- Xu, E.J., Zheng, R.Q., Su, Z.Z., Li, K., Ren, J., Guo, H.Y., 2012. Intra-biliary contrast-enhanced ultrasound for evaluating biliary obstruction during percutaneous transhepatic biliary drainage: A preliminary study. *Eur. J. Radiol.* 81(12), 3846–3850.

Надійшла до редакції 11.10.2014



УДК 616.37–002+616.89–008.441.13+611–018.1

Особенности гибели и регенерации клеток поджелудочной железы на ранних этапах развития алкогольного хронического панкреатита

Н.Ю. Ошмянская, А.А. Галинский, Ю.А. Гайдар

ГУ «Институт гастроэнтерологии НАМН Украины», Днепропетровск, Украина

Экспериментальный панкреатит смоделирован на 39 белых лабораторных крысах-самцах, которых разделили на группы моделирования экспериментального алкогольного панкреатита на фоне недостатка и избытка оксида азота, группу экспериментального окклюзионного панкреатита, вызванного перевязкой главного панкреатического протока, и группу контроля. С использованием гистологических и иммуногистохимических методов на максимальном увеличении светового микроскопа изучены морфологическая структура, пути гибели и регенерации островков Лангерганса, характерные для ранних этапов развития заболевания, проанализированы особенности экспрессии маркеров пролиферации PCNA и Neurogenin-3, а также описаны гистологические изменения, которые обуславливают инициацию структурных нарушений в поджелудочной железе в условиях приема алкоголя на фоне дисбаланса NO-эргической регуляторной системы, вызванного избытком и недостатком оксида азота.

Ключевые слова: хронический панкреатит; островки поджелудочной железы; PCNA; Neurogenin-3

Peculiarities of death and regeneration of pancreas cells at early stages of alcoholic chronic pancreatitis

N.Y. Oshmyanska, A.A. Galinsky, Y.A. Gaidar

State Institution "Institute of Gastroenterology of NAMS of Ukraine", Dnipropetrovsk, Ukraine

The study has been conducted on 39 white laboratory male rats which formed 5 groups: experimental occlusal pancreatitis caused by ligation of the main pancreatic duct (n = 6), experimental alcoholic pancreatitis caused by oral intake of alcohol (n = 6), against the background of an excess (n = 6) or deficiency (n = 6) of nitric oxide, as well as a control group (n = 15). This study provides the detailed description of the processes of death and regeneration in the islets of Langerhans, typical for early stages of the disease. The expression of the proliferation markers (PCNA and Neurogenin-3) has been analyzed using histological and immunohistochemical methods along with the changes of morphological structure, that led to initiation of the alcoholic chronic pancreatitis against the background of imbalance in NO-ergic regulatory system caused by an excess or deficiency of nitric oxide. It has been found that ligation of the pancreatic duct in the experiment reconstructed the circumstances of chronic pancreatitis in rats and caused the activation of fibrosis and regeneration of endocrine and exocrine tissue. Compared with occlusion, the effects of ethanol on the pancreas also manifested in the activation of fibrogenesis, but the structural changes were negligible and could unlikely lead to advanced fibrosis and chronic pancreatitis in the future. On the other side, an imbalance of NO-system in alcoholic rats leads to disruption of the zymogens secretion in the acinar cells and dilatation of the capillary network in islets. Uneven distribution of zymogen granules may lead to their intracellular activation as evidenced by the deformation of acini and focal apoptosis without inflammatory response. In this case, violation of the key adaptive responses in the pancreas makes it more vulnerable to the effects of ethanol, its metabolites, and other environmental factors, and may increase the probability of chronic pancreatitis development. At the same time, forementioned process of cell death in the pancreas is considerably more prolonged, and long term course eliminates the activation of proliferation or functional tissue regeneration.

Keywords: chronic pancreatitis; pancreatic islets; PCNA; Neurogenin-3

Введение

Хронический панкреатит (ХП) – прогрессирующее воспалительное заболевание, которое характеризуется необратимым разрушением секреторной паренхимы поджелудочной железы (ПЖ) (Тkach, 2013). За последние 30 лет отмечена общемировая тенденция к увеличению заболеваемости острым и хроническим панкреатитом более чем в два раза, с неуклонным ростом. Ежегодно впервые выявленный панкреатит регистрируют у 8,2–10,0 человек на 100 000 населения Земли. Распространенность ХП у детей составляет 9–25 случаев, у взрослых – 27,4–50,0 случаев на 100 000 населения (Mauev, 2006).

Нет никаких сомнений, что алкоголь является наиболее частым фактором, связанным с развитием ХП. Алкогольный ХП обнаруживается у людей среднего возраста (30–40 лет), чаще мужчин, уже в хроническом состоянии, и с клинической точки зрения характеризуется периодически повторяющимися приступами боли в животе. В западных странах в период с 1940 по 2003 год частота алкоголя как этиологического фактора ХП увеличилась с 19% до 50% и даже до 80% (Sarles et al., 1999).

С практической точки зрения, понимание патогенеза ХП может привести к идентификации новых молекулярных мишеней и разработке новых потенциальных терапевтических агентов. Механизм, который инициирует фиброз ПЖ, предложен Talukdar et al. (2006): окисление этанола в ацетальдегид обеспечивает активацию панкреатических стеллатных клеток (ПСК), минуя стадию преактивации; этот процесс порождает состояние окислительного стресса ПСК, который сопровождается фиброгенезом. Эта теория подразумевает, что ПСК могут быть стимулированы на ранних стадиях хронического потребления алкоголя даже в отсутствие воспаления, и функциональные изменения прогрессируют даже после прекращения потребления (Vonlaufen et al., 2014).

Важность окислительного стресса у больных хроническим панкреатитом подтверждалась также дыхательными пробами (Morselli-Labate et al., 2007). Тем не менее, хотя в соответствии с этой гипотезой спирт индуцирует фиброз ПЖ, часто появляются сообщения об отсутствии ХП при анамнезе алкоголизма. Кроме того, в экспериментальных моделях алкогольного ХП не удавалось получить картину повреждения, аналогичную той, которая наблюдается у человека. Таким образом, алкоголь представляет собой фактор риска и способен вызывать фиброз, благодаря действию на ПСК, но его роль в этиопатогенезе заболевания все еще изучена не до конца.

Материал и методы исследований

Экспериментальное исследование проводили на 39 белых лабораторных крысах-самцах (возраст – 6 месяцев, масса – 190–200 г). Крысы находились в стандартных условиях, с естественной сменой освещения и соблюдением общего рациона. У всех животных был свободный доступ к пище и воде. Экспериментальный панкреатит смоделирован четырьмя способами.

1. Лигирование главного панкреатического протока (n = 6). За 20 часов до начала эксперимента крыс в этой

группе подвергали пищевой депривации при свободном доступе к воде. Затем под наркозом (этаминал натрия, 85 мг/кг) путем хирургического вмешательства осуществляли перевязки (лигатуру) главного панкреатического протока в хвостовой части поджелудочной железы нерассасывающейся нитью «Кетгут» 3/0. Операционную рану после манипуляции зашивали послойно.

2. Пероральный прием алкоголя (n = 6) в дозе 4 мл/кг массы, один раз в сутки.

3. Пероральный прием алкоголя на фоне внутрибрюшинного введения донатора готовых молекул оксида азота (n = 6). В ходе эксперимента ежедневно, на фоне приема алкоголя по схеме из п. 2, интраперитонеально (в нижнюю часть брюшной стенки) вводили раствор нитропруссиды натрия производства «Реахим» (Украина) в субтоксической дозе (1,5 мг/кг в 2,0 мл 0,9% раствора).

4. Пероральный прием алкоголя на фоне внутрибрюшинного введения неспецифического ингибитора NO-синтазы (n = 6). В ходе эксперимента ежедневно, на фоне приема алкоголя по схеме из п. 2, интраперитонеально (в нижнюю часть брюшной стенки) вводили раствор NG-нитро-L-аргинина производства «Sigma-Aldrich» (USA) в субтоксической дозе (40 мг/кг в 2,0 мл 0,9% раствора NaCl).

Контрольную группу составили крысы, которым осуществляли только вскрытие кожного покрова на животе и сразу же его сшивали (n = 6) или внутрибрюшинно вводили 0,9% раствор NaCl (n = 9).

Через 30 суток крыс выводили разовым введением летальной дозы кетамина гидрохлорида (220 мг/кг веса), после чего выполняли декапитацию гильотиной для взятия крови. Все растворы готовили непосредственно перед введением (согласно рекомендациям производителя препаратов) и вводили животным в 9–10 часов утра.

Исследования проводили, придерживаясь нормативов Конвенции по биоэтике Совета Европы (в 1997 г.), Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных исследований, общих этических принципов экспериментов на животных, принятых законом Украины (№ 1759-VI от 15.12.2009 г.) «О защите животных от жестокого обращения».

Для выполнения гистологических исследований ПЖ отчищали от жира и лимфатических узлов. После этого 10–15% органа фиксировали в 10% растворе нейтрального забуференного формалина для последующего гистологического исследования. Биоптаты обезживали в спиртах восходящей концентрации и заливали в парафин. Гистологические срезы толщиной 3–5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином и по Маллори в модификации Слинченко.

Результаты и их обсуждение

У животных контрольной группы гистологическое строение ПЖ соответствовало норме. Экзокринные клетки, подобные друг другу по размеру и форме, формировали ацинусы, с ядрами, расположенными по периферии, и цитоплазмой, равномерно заполненной зимогенными гранулами – к центру. Выводные протоки мелкого калибра не были заметны среди ацинарной ткани;

средние и крупные протоки были окутаны небольшим количеством соединительной ткани. Эндокринные клетки встречались в островках Лангерганса разного размера, с четко очерченными краями.

После 30 суток применения классической модели ХП, построенной на лигировании ГПП, отмечалась выраженная дилатация протоков всех калибров. Расширенные протоки с зияющим просветом занимали большую часть биоптата, в протоковом эпителии отмечались признаки гиперплазии. Некоторые дольки были полностью атрофированы, другие, в которых протоковая система была поражена в меньшей степени, сохраняли часть структуры. Наблюдались ацинарные клетки в состоянии апоптоза, а также зоны роста ацинарной ткани – так называемые «ацинарные почки». Плотная фиброзная ткань была расположена вокруг протоков на месте разрушенных долек, рыхлая фиброзная ткань заполняла междольковое пространство и содержала ацинусы, островки и сосуды.

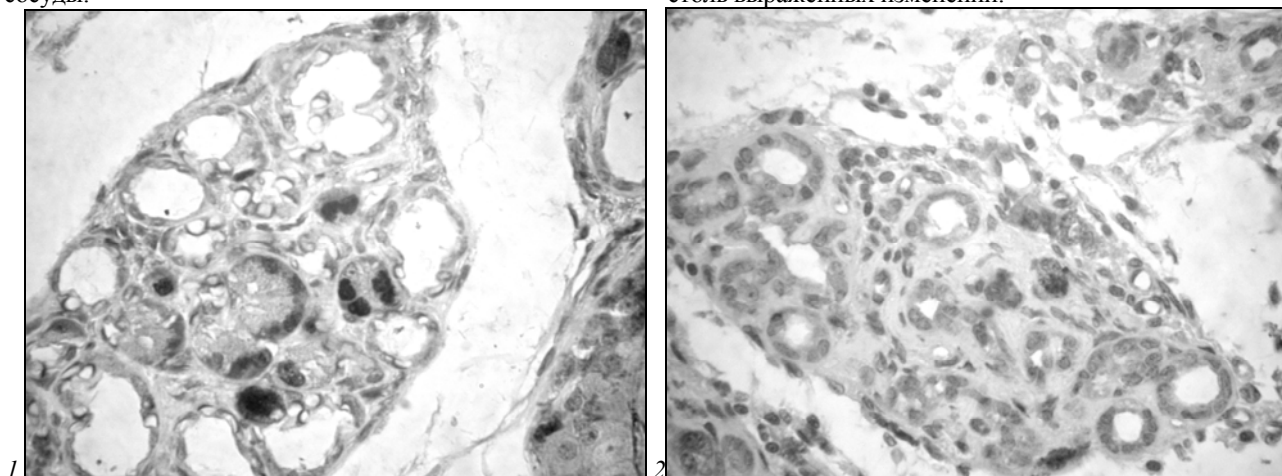


Рис. 1. ПЖ крысы с экспериментальным окклюзионным панкреатитом:

1 – рост «ацинарной почки», маркер PCNA в новообразованных ацинарных клетках, 2 – NGN3-опосредованное новообразование островков в области протоков; непрямая иммунопероксидазная реакция, увеличение $\times 200$

Ацинарное строение было преимущественно сохранено, фиброзная ткань в значительно меньших количествах расположена в перипротоковой области и не проникала внутрь долек. Воспалительная инфильтрация отсутствовала, клетки в состоянии апоптоза практически не встречались. Граница фиброзной и ацинарной ткани отличалась большей частотой митозов, но при этом менее плотным расположением клеток. Встречались островки Лангерганса всех размеров, преимущественно правильной формы.

В случае дополнительного воздействия донатором или ингибитором NO отмечалось более выраженное нарушение строения: деформация ацинусов, беспорядочное расположение ядер (рис. 2). Встречались ацинарные клетки разного размера, в том числе в состоянии митоза, а также клетки с размытыми контурами и нечетко очерченным ядром. Обращало на себя внимание неравномерное распределение зимогенных гранул в клетках. В группе крыс, получавших нитропруссид натрия, встречались клетки с избыточным накоплением зимогенов, при этом гранулы располагались более плотно и были смещены к краю клетки. Наиболее заметным нарушением накопления секрета было в группе крыс, получавших NG-нитро-L-аргинин: здесь наблюдались целые поля

При иммуногистохимическом исследовании обнаружено большое количество островков Лангерганса, состоящих преимущественно из β -клеток. Обращало на себя внимание наличие особенно крупных островков неправильной формы, расположенных среди протоков небольшого калибра и окруженных более мелкими островками, состоящими из 2–3 клеток. Подобная картина, которая не наблюдалась в группе контроля, сопровождалась активным восстановлением экзокринной и эндокринной ткани. Маркер ядерной пролиферации PCNA определялся в более чем 50% всех ацинарных и эндокринных клеток. Эмбриональный маркер Ngn3, характерный для новообразования клеток островков, встречался в единичных островках (рис. 1).

В отличие от результатов применения вышеупомянутой модели, при моделировании алкогольного панкреатита путем перорального введения алкоголя на фоне дисбаланса NO-эргической системы не наблюдалось столь выраженных изменений.

ацинарных клеток в состоянии гипосекреции, с более светлой цитоплазмой. При этом ацинусы правильной формы содержали больше зимогенных гранул, чем деформированные.

У крыс, получавших алкоголь на фоне недостатка NO, отмечались также видимые изменения капиллярной сети островков Лангерганса – расширение межклеточных пространств, выраженное кровенаполнение.

При иммуногистохимическом исследовании у крыс, принимающих этанол, не было обнаружено свидетельств повреждения или активной регенерации в островках Лангерганса, в том числе Ngn3-опосредованного новообразования эндокринных клеток, которое наблюдалось в обтурационной модели.

Моделирование острого и хронического панкреатита в эксперименте подразумевает различный набор условий и потенциальных стимулов, поэтому результаты могут значительно отличаться. С другой стороны, разные результаты получены с аналогичными моделями регенерации, что и привело к путанице. Две основные экспериментальные модели, существующие на сегодняшний день, сводятся к реконструкции двух типов развития ХП: окклюзионный и алкогольный панкреатит.

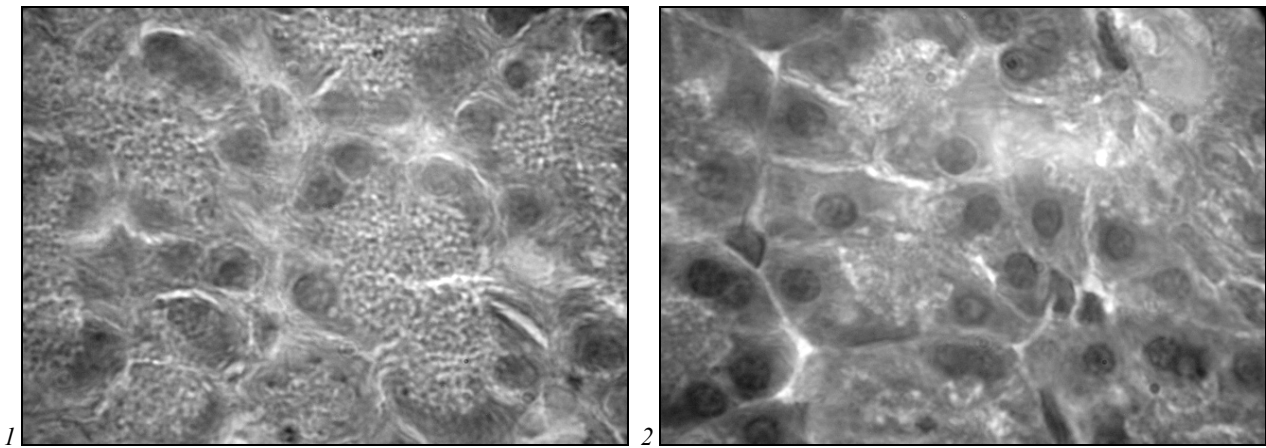


Рис. 2. Архитектура ацинусов:

1 – ПЖ крысы контрольной группы, 2 – ПЖ крысы, принимающей этанол и аргинин, деформация структуры, снижение накопления секрета; окраска гематоксилином и эозином, иммерсионный объектив, увеличение $\times 1000$

При моделировании краткосрочной окклюзии в эксперименте (использование рассасывающегося шовного материала) значительные объемы ЭЦМ откладываются в интрабулярном и периацинарном пространстве, однако приблизительно через 2 недели после индукции панкреатита гистологическая картина, масса органа и содержание коллагена возвращаются к норме (Ellenrieder et al., 2004). В клинике пациенты с окклюзионным билиарным панкреатитом после удаления конкремента также демонстрируют значительное облегчение болевого синдрома и остановку фиброобразования, в то время как при алкогольном панкреатите даже после прекращения приема алкоголя прогрессирование фиброза замедляется, но не прекращается.

Механизм, посредством которого потребление алкоголя приводит к фиброзной трансформации ПЖ, выяснен до конца, однако *in vitro* показано, что окисление этанола в ацетальдегид обеспечивает активацию ПСК, через состояние окислительного стресса, которое впоследствии активирует путь фиброгенеза (Talukdar et al., 2006). Несмотря на это, часто появляются сообщения о людях с анамнезом алкоголизма и без развития хронического панкреатита, а животные модели не могут полностью повторить картину повреждения, которая наблюдается у человека (Vonlaufen et al., 2014).

В эксперименте мы наблюдали активацию процессов фиброгенеза как при использовании обтурационной модели (перевязка ГПП нерассасывающейся нитью в течение 30 суток), так и при моделировании алкогольного панкреатита. Однако во втором случае структурные изменения в ПЖ были очень незначительными. Фиброз развивался преимущественно в перипротоковой области, и хотя на границе фиброзной и функциональной ткани наблюдалась деформация ацинусов, этот процесс практически полностью компенсировался регенерационным потенциалом ПЖ. Это подтверждает распространенную гипотезу о том, что хотя алкоголь является фактором, способствующим возникновению и развитию как острого, так и хронического панкреатита, одного этанола недостаточно для того, чтобы вызвать стойкие изменения. Высказано предположение, что этанол только «сенситизирует» клетки ПЖ, а непосредственный вред наносят дополнительные факторы, такие как курение, наследст-

венность, нарушение питания и другие (Satoh et al., 2006). Логично предположить, что ПЖ оснащена гибкой системой адаптации, которая защищает ее от внешнего воздействия, и развитие ХП является следствием нарушения в этой системе. Одной из составляющих этой системы может быть оксид азота (*NO*) – молекула с широким спектром биорегуляторного действия.

NO является жирорастворимым газом, высокоактивным и нестабильным соединением, которое образуется из L-аргинина под влиянием фермента *NO*-синтазы, легко проникает через клеточные мембраны, подвергается процессам окисления с переходом в нитриты и нитраты (Severina, 2002). *NO* действует во всех направлениях, является универсальным регулятором физиологических функций и передачи нервных импульсов, мощным периферическим вазодилататором, принимает участие в регуляции моторики и секреции. *NO* также оказывает цитопротекторное действие и является мощным медиатором воспаления, выделяясь в ответ на воздействие бактерий, вирусов, провоспалительных цитокинов (Lucas et al., 2000). Мы обнаружили, что при дисбалансе системы *NO*, вызванном приемом донатора готовых молекул *NO* натрия нитропруссидного и неспецифического ингибитора *NO*-синтаз NG-нитро-L-аргинина на фоне перорального приема алкоголя, у животных отмечается нарушение ацинарного строения ПЖ, неравномерное распределение зимогенов в ацинарных клетках и дилатация капиллярной сети островков Лангерганса. Именно интраацинарная активация трипсиногена приводит к гибели ацинарной клетки и считается ключевым событием в развитии панкреатита. Механизм этого патологического процесса до конца изучен, однако последние исследования доказывают его связь с употреблением алкоголя (Saluja et al., 2007).

Неравномерное распределение зимогенных гранул, которое отмечалось нами в моделях с дисбалансом *NO*-эргической системы, может приводить к их внутриклеточной активации и вызывать гибель клеток, что подтверждается деформацией ацинусов при отсутствии воспалительной реакции. Этот эффект, однако, характерен только для ацинарных клеток. В островках Лангерганса мы наблюдали только компенсаторное расширение капилляров, без вовлечения эндокринных клеток.

При этом процессы активного восстановления, которые наблюдаются при реализации окклюзионной модели, в том числе Ngn3-опосредованный эмбриональный путь новообразования островковых клеток, по-видимому, не задействованы при развитии алкогольного панкреатита. Это можно объяснить тем, что процесс атрофии функциональных клеток и активации ПСК в данном случае происходит слишком медленно, без участия воспаления или других факторов, оказывающих влияние на активацию регенерации.

Выводы

Лигирование протока ПЖ в эксперименте, дистально от его впадения в желчный проток, реконструирует у крыс обстоятельства ХП и вызывает активацию фиброобразования и регенерации эндокринной и экзокринной ткани. По сравнению с обтурацией, воздействие этанола на ПЖ проявляется в активации процессов фиброгенеза, при этом структурные изменения в железе крайне незначительны и вряд ли в дальнейшем могут привести к распространенному фиброзу и хроническому панкреатиту.

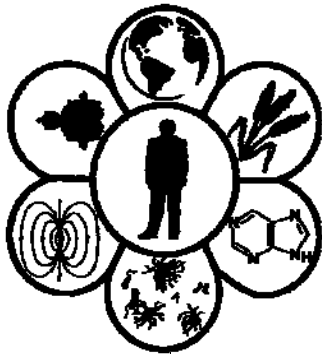
Дисбаланс протекторной системы *NO* на фоне приема алкоголя у крыс приводит к нарушению секреции зимогенов в ацинарных клетках и дилатации капиллярной сети островков Лангерганса. Неравномерное распределение зимогенных гранул может приводить к их внутриклеточной активации и точечной гибели клеток, подтверждением чего служит деформация ацинусов при отсутствии воспалительной реакции. В этом случае нарушение ключевых адаптивных реакций в ПЖ делает орган более уязвимым к воздействию этанола, его метаболитов и других факторов окружающей среды и может повысить вероятность развития ХП. При этом процесс отмирания клеток ПЖ протекает значительно более медленно, что исключает активацию процессов пролиферации и новообразования функциональной ткани.

Библиографические ссылки

Ellenrieder, V., Schneiderhan, W., Bachem, M., Adler, G., 2004. Fibrogenesis in the pancreas. *Rocz. Akad. Med. Bialymst.* 49, 40–46.

- Lucas, K., Pitari, G., Kazerounian, S., Ruiz-Stewart, I., Park, J., Schulz, S., Chepenik, K., Waldman, S., 2000. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol. Rev.* 52(3), 375–414.
- Maev, I.V., Kazjulin, A.N., Samsonov, A.A., Kucherjavij, J.A., 2006. Hronicheskij pankreatit (algoritm diagnostiki i lechebnoj taktiki). *Posobie dlja vrachej obshej praktiki, terapevtov, gastrojenterologov* [Chronic pancreatitis (diagnostic and treatment tactics). Allowance for general practitioners, internists, gastroenterologists]. GOU VUNMC MZiSR RF, Moscow (in Russian).
- Morselli-Labate, A.M., Fantini, L., Pezzilli, R., 2007. Hydrogen sulfide, nitric oxide and a molecular mass 66 u substance in the exhaled breath of chronic pancreatitis patients. *Pancreatology* 7, 497–504.
- Saluja, A., Lerch, M., Phillips, P., Dudeja, V., 2007. Why does pancreatic overstimulation cause pancreatitis? *Annu. Rev. Physiol.* 69, 249–269.
- Sarles, H., Cros, R., Bidart, J., 1979. A multicenter inquiry into the etiology of pancreatic diseases. *Digestion* 19(2), 110–125.
- Satoh, A., Gukovskaya, A., Reeve Jr, J., Shimosegawa, T., Pandol, S., 2006. Ethanol sensitizes NF-kappaB activation in pancreatic acinar cells through effects on protein kinase C-varepsilon. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 291(3), 432–438.
- Severina, I.S., 2002. Oksid azota. Rol' rastvorimog guanilatciklazy v mehanizmah ego fiziologicheskikh jeffektov [Nitric oxide. The role of soluble guanylat cyclase in the mechanisms of its physiological effects]. *Voprosy Medicinskoj Himii* [Problems of Medical Chemistry] 1, 4–30 (in Russian).
- Talukdar, R., Saikia, N., Singal, D.K., Tandon, R., 2006. Chronic pancreatitis: Evolving paradigms. *Pancreatology* 6, 440–449.
- Tkach, M.N., 2013. Prakticheskie podhody k diagnostike hronicheskogo pankreatita [Practical approaches to the diagnosis of chronic pancreatitis]. *Suchasna Gastroenterologija* [Modern Gastroenterology] 69(1), 136–148 (in Russian).
- Vonlaufen, A., Spahr, L., Apte, M.V., 2014. Alcoholic pancreatitis: A tale of spirits and bacteria. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* 5(2), 82–90.

Надійшла до редколегії 04.10.2014



УДК 577.156:612.015

Нейропротекторні ефекти α -ліпоєвої кислоти на розвиток окисного стресу й астрогліозу у мозку СТЗ-діабетичних щурів

С.В. Кириченко, І.В. Прищеп, В.С. Лагода, М.О. Велика, В.С. Недзвєцький

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпропетровськ, Україна

Досліджено вплив стрептозотозин-індукованого діабету на розвиток окисного стресу в нервовій тканині, стан гліальних проміжних філаментів, показано протекторний вплив α -ліпоєвої кислоти. У мозку щурів із стрептозотозин-індукованим діабетом визначено достовірне зростання вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів. Зміни поліпептидного складу гліального фібрилярного білка виявлено 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. Виявлено 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 розвитку діабетичної енцефалопатії. Отримані результати вказують на можливість реконструкції цитоскелета гліальних клітин під протекторним впливом α -ліпоєвої кислоти.

Ключові слова: стрептозотозин-індукований діабет; окисний стрес; гліальні проміжні філаменти; α -ліпоєва кислота

Neuroprotective effects of α -lipoic acid on the development of oxidative stress and astrogliosis in the brain of STZ-diabetic rats

S. Kyrychenko, I. Prishchepa, V. Lagoda, M. Velika, V. Nedzvetsky

Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Dnipropetrovsk, Ukraine

The aim of this study was to examine whether the antioxidant alpha-lipoic acid protects neurons from diabetic-reperfusion injury. The streptozotocin (STZ) rat model was used to study the glial reactivity and prevention of gliosis by alpha-lipoic acid (alpha-LA) administration. The expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) was determined, as well as lipid peroxidation (LPO) and glutathione (GSH) levels in some brain tissues. We observed significant increasing of lipid peroxidation products in both hippocampus and cortex. Changes of polypeptide GFAP were observed in hippocampus and cortex. Both soluble and filamentous forms of GFAP featured the increase in hippocampus of rat with hyperthyreosis. In the 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 range 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 response under conditions of diabet encephalopathy. Administration of alpha-LA reduced the expression both of glial and neuronal markers. In addition, alpha-LA significantly prevented the increase in LPO levels found in diabetic rats. GSH levels increased by the administration of alpha-LA. This study suggests that alpha-LA prevents neural injury by inhibiting oxidative stress and suppressing reactive gliosis. All these changes were clearly counteracted by alpha-lipoic acid. The results of this study demonstrate that alpha-lipoic acid provides for protection to the GFAP, as a whole, from diabet-reperfusion injuries.

Keywords: streptozotocin (STZ); alpha-lipoic acid (alpha-LA); glial fibrillary acidic protein; lipid peroxidation

Вступ

Білки проміжних філаментів розглядаються як надійні гістоспецифічні маркери. У нервовій тканині проміжні філаменти представлені триплетом білків нейрофіламентів та гліальним фібрилярним кислим білком (ГФКБ). ГФКБ є головним структурним компонентом проміжних філаментів астроцитарного цитоскелета, розглядається як надійний маркер астроцитів. Реакція астроцитів на дію факторів, що ушкоджують нервові клітини, супроводжується посиленням синтезом ГФКБ й інтенсивним фібрилогенезом. Існують дані про зміну структури проміжних філаментів і фізико-хімічних властивостей цитоскелетних білків при патологіях різної етіології та дії ушкоджувальних факторів (Eng et al., 2000). Рівень ГФКБ використовується для оцінки розподілу гліальних клітин у відповідь на нейрональне ушкодження. Існують дані про те, що ГФКБ необхідний для підтримання стабільної морфології астроцитів, формування гліального рубця та модуляції гліально-нейрональної взаємодії в нормі та при нейропатіях різної природи (Lerekhin, 2001). ГФКБ залучається до реакції астроцитів на нейрональне ушкодження, що може відігравати роль у морфогенезі центральної нервової системи (Enns et al., 2007).

Антиоксиданти розглядаються як потенційні протектори у захисті від розвитку оксидативного стресу. Вивчено властивості α -ліпоєвої кислоти як біологічного антиоксиданта та пастки для вільних радикалів (Detru, 2006). Тканини центральної нервової системи та периферичних нервів здатні поглинати α -ліпоєву кислоту. Продемонстровано антиоксидантний ефект цієї кислоти у разі використання таких прооксидантів як гідроксидрадикал, гіпохлорна кислота, перекис водню, синглетний кисень, закис азоту та пероксинітрил (Rose, 2006; Bernal, 2007). Недавно запропоновано використання α -ліпоєвої кислоти як терапевтичного агента-антиоксиданта у лікуванні низки нейродегенеративних захворювань (Enns et al., 2007). Мета даної статті – подальше вивчення антиоксидантних властивостей α -ліпоєвої кислоти та її впливу на рівень гліальних маркерів у мозку щурів в умовах щоденного споживання протягом 45 діб після індукції неконтрольованого діабету.

Матеріал і методи досліджень

У дослідженні використано 45 білих щурів-самців лінії Вістар, масою 190–230 г. Спочатку формували дві групи. Тваринам першої групи інтраперитонеально (одноразово) вводили розчинений у натрій-цитратному буфері (рН 4,5) стрептозотоцин (СТЗ) («Sigma», США) у дозі 50 мг/кг маси тварин. Вміст глюкози визначали за 3 доби після ін'єкції. Для подальшого проведення експерименту відбирали тварин із рівнем глюкози понад 250 мг/100 мл. Цих щурів випадковим чином поділяли на дві групи. Тваринам першої групи робили щоденні інтраперитонеальні ін'єкції α -ліпоєвої кислоти в дозі 100 мг/кг (група α -ЛК, $n = 15$) протягом 6 тижнів, тваринам другої групи вводили буфер (група СТЗ, $n = 15$). Тваринам контрольної групи ($n = 15$) робили ін'єкції

ЗФР. Масу тварин і рівень розвитку діабету контролювали за 6 тижнів до завершення експерименту.

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-буфера (рН 8,0), що містив 2 мМ ЕДТА, 1 мМ 2-меркаптоетанолу, 0,1 мМ фенілметилсульфонілфториду та сосвий інгібітор трипсину (10 мкг/мл). Гомогенат центрифугували при 30 000 г протягом 60 хв. Супернатант (S_1) містив розчинні білки. Осад ресуспендували в 0,5 мл тієї ж буферної системи, яка додатково містила 4 М сечовину. Супернатант, який отримували після другого центрифугування (S_2), містив нерозчинні білки проміжних філаментів. Уміст 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 : 1 500, 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 варіаційної статистики для малих вибірок. Відносний вміст ГФКБ виражали у вигляді середньої величини \pm стандартна похибка середньої ($\bar{x} \pm SE$), достовірну різницю між групами оцінювали із застосуванням t -критерію Стьюдента ($P < 0,05$) після перевірки гіпотез про нормальність розподілу.

Результати та їх обговорення

Уведення стрептозотоцину викликало яскраво виражену гіперглікемію порівняно з контрольною групою щурів. Ін'єкції α -ліпоєвої кислоти (100 мг/кг) протягом 45 діб спричинили значне зниження рівня глюкози порівняно з СТЗ-діабетичною групою щурів. Виявлений рівень перекисного окислення ліпідів був значно вищим у групі СТЗ-діабетичних тварин відносно контрольної групи (рис. 1), а вміст відновленого глутатіону був істотно зниженим у тканинах мозку тварин з індукованим діабетом відносно контролю (рис. 2). Однак уміст продуктів ПОЛ значно знижувався, а вміст відновленого глутатіону у гіпокампі та корі зростав під час курсових ін'єкцій α -ліпоєвої кислоти в групі α -ліпоєвої кислоти щодо групи СТЗ-діабетичних щурів. Усе це разом свідчить про виражений антиоксидантний ефект α -ліпоєвої кислоти за умов гіперглікемії, індукованої введенням СТЗ.

Рівень експресії ГФКБ був значно вищим у всіх досліджених відділах мозку у тварин із групи СТЗ щодо контрольної групи (рис. 3). Уміст деградованих поліпептидів ГФКБ був також істотно збільшеним у всіх відділах мозку щурів із діабетом. Разом із підвищенням загального вмісту ГФКБ виявлено також значне зростання вмісту поліпептидних фрагментів ГФКБ в усіх досліджених відділах мозку діабетичних щурів (рис. 4). На підставі отриманих результатів можна припустити, що СТЗ-індукований діабет викликає реактивний гліоз, оскільки обидва білки є маркерами активності глії.

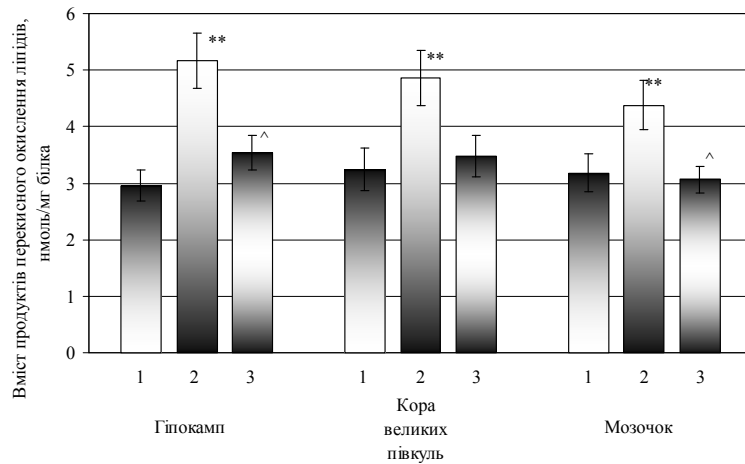


Рис. 1. Вміст кінцевих продуктів перекисного окиснення ліпідів у відділах мозку щурів контрольної (1), СТЗ-діабетичної (2) та СТЗ-діабетичної + α -ЛК (3):
 ** – $P < 0,01$ порівняно з контрольною групою; ^ – $P < 0,05$ порівняно з СТЗ-діабетичною групою

Уведення α -ліпоєвої кислоти (100 мг/кг) протягом 45 днів сприяло статистично достовірному зниженню вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів, а також підвищенню вмісту відновленого глутатіону в гіпокампі та корі великих півкуль порівняно з СТЗ-діабетичною групою. У той же час, рівень експресії ГФКБ суттєво підвищений у всіх досліджених відділах мозку тварин СТЗ-діабетичної групи відносно контрольної. Повторні ін'єкції α -ліпоєвої кислоти викликали в групі α -ЛК істотне гальмування експресії гліального маркера ГФКБ.

Ін'єкції α -ліпоєвої кислоти викликали також суттєве зниження вмісту деградованих поліпептидних фрагментів ГФКБ. Значні зміни вмісту та поліпептидного складу ГФКБ свідчать про інтенсивні цитоскелетні перебудови та пригнічення астрогліозу введенням α -ліпоєвої кислоти. Визначено значущі кореляції між вмістом ГФКБ і продуктів перекисного окиснення ліпідів у гіпокампі ($r = 0,675$, $P < 0,01$) і корі великих півкуль ($r = 0,603$, $P < 0,05$) мозку діабетичних щурів.

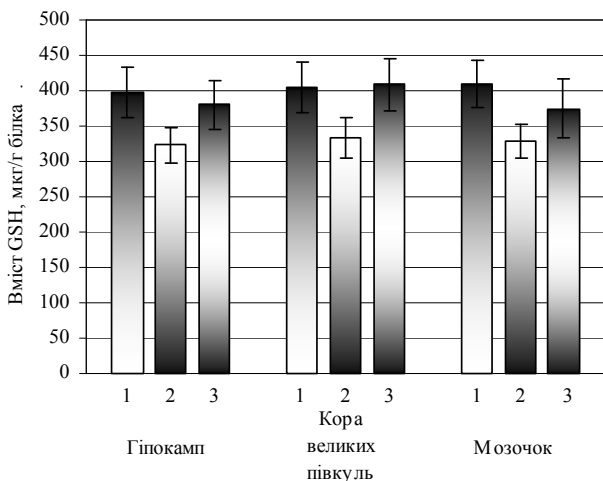


Рис. 2. Вміст глутатіону відновленого у відділах мозку щурів контрольної (1), СТЗ-діабетичної (2) та СТЗ-діабетичної + α -ЛК (3)

Дегенерація та загибель нейронів при діабеті можуть бути пов'язані зі збільшеним утворенням вільних радикалів через порушення функціонування мітохондрій і антиоксидантної системи (Graham, 1999). Виявлено

збільшення загибелі нейронів у разі оксидативного стресу, що може бути однією з причин діабетичної нейропатії. Глутатіон є антиоксидантом у всіх типах тваринних клітин. Він реагує з вільними радикалами та може захистити клітини від ушкоджень, індукованих синглетним киснем, гидроксид- і супероксид-радикалами. Відповідно попереднім дослідженням у нашій статті показано зниження вмісту глюкози за умови введення щурам α -ліпоєвої кислоти на тлі СТЗ-індукованого діабету.

Цілком можливо, що до такого зниження вмісту глюкози залучається механізм, за допомогою якого введення кислоти спричинювало посилення стимульованого інсуліном метаболізму глюкози у м'язових клітинах. Припускається, що гіперглікемія індукує реактивний гліоз із залученням залежних від вільних радикалів метаболічних шляхів, які активують гліальні клітини.

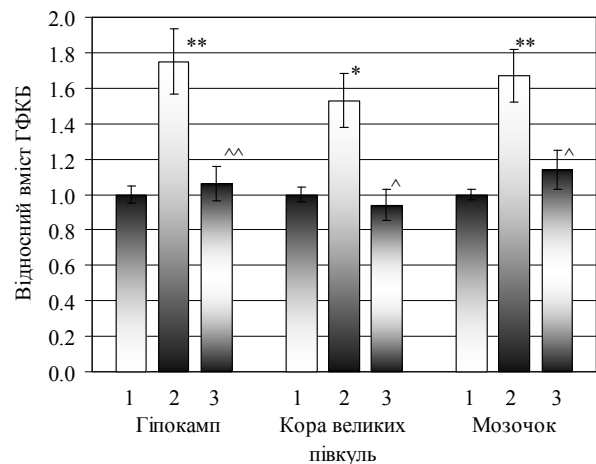


Рис. 3. Відносний вміст фракції загального ГФКБ у мозку щурів: 1 – контрольна група, 2 – СТЗ-діабетична група, 3 – СТЗ-діабетична група щурів, які отримували ін'єкції α -ЛК (100 мг/кг) (n = 14–16); * – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$ – достовірність різниці відносно контрольної групи; ^ – $P < 0,05$; ^^ – $P < 0,01$ – відносно групи СТЗ-діабетичних щурів

Наявність позитивної кореляції між експресією гліальних маркерів і вмістом продуктів ПОЛ у гіпокампі та корі великих півкуль мозку діабетичних щурів підтверджує цю гіпотезу. Астроцити центральної нервової

системи активуються до проліферації та диференціації у разі механічних і фізичних пошкоджень, захворювань різної природи та хімічного інсульту (Pekny et al., 2004). Можливо припустити позитивний вплив астрогліозу на

виживаність нейронів. Однак відомо, що активовані гліальні клітини секретують також цитокини, компоненти системи комплементу та вільні радикали, які спричинюють ушкодження нервових клітин.



Рис. 4. Імуноблотинг ГФКБ із мозку щурів: *a* – імуноблотинг цитоскелетних фракцій ГФКБ, *б* – імуноблотинг тритонових фракцій ГФКБ, *в* – імуноблотинг розчинних цитоскелетних фракцій ГФКБ; 1 – контрольна група, 2 – СТЗ-діабетична група, 3 – СТЗ-діабетична група щурів, які отримували ін'єкції α -ліпоєвої кислоти (100 мг/кг)

Виявлене зниження вмісту продуктів ПОЛ у відділах мозку діабетичних щурів в умовах уведення α -ліпоєвої кислоти дозволяє припустити, по-перше, що введення α -ліпоєвої кислоти запобігає порушенням обміну ліпідів при діабеті і, по-друге, принаймні часткова протективна дія α -ліпоєвої кислоти при гіперглікемічному нейрональному ушкодженні реалізується за рахунок перехоплення вільних радикалів і антиокисних властивостей. Ці припущення збігаються з раніше описаним захисним ефектом кислоти за токсичного нейронального ушкодження за рахунок перехоплення вільних радикалів (Song et al., 2005). Уведення α -ліпоєвої кислоти викликало збільшення вмісту відновленого глутатіону у відділах мозку, що дозволяє припустити захисний ефект від окисного стресу за рахунок антиокисних властивостей кислоти та збільшення, у свою чергу, захисного потенціалу тканин мозку проти індукованого стрептозоточином оксидативного стресу (Baydas et al., 2004).

α -Ліпоєва кислота може виявитися ефективною при запобіганні та терапії оксидативного стресу в ряді модельних або клінічних ситуацій. Такі антиоксиданти як α -ліпоєва кислота, глутатіон і вітаміни А, Е, С беруть участь у детоксифікації перекису водню, гідроксид- і пероксидрадикалів, реактивних сполук азоту. Крім того, вони активують антиоксидативні ферменти супероксиддисмутазу та глутатіонпероксидазу. Оксидативний стрес при діабеті спричинює ушкодження нуклеїнових кислот, білків і ліпідів, що супроводжується клітинною дисфункцією і некрозом, а також викликає функціональну та структурну дегенерацію центральної нервової системи (Bruckner, 2002). Таким чином, антиоксиданти можуть знаходити застосування у профілактиці серцево-судинних і мозкових ускладнень діабету, знижуючи нагромадження активних форм кисню.

Захисний ефект α -ліпоєвої кислоти також виражався у зменшенні реактивності глії. Отримані дані уперше демонструють зниження експресії гліальних і нейронального маркерів у різних відділах мозку діабетичних щурів в умовах уведення α -ліпоєвої кислоти. Унаслідок

позитивної асоціації між рівнем маркерів і вагою враження це зниження можна розглядати як позитивну тенденцію до відновлення порушеного при діабеті функціонування нервової системи. Gonzalez-Perez et al. (2002) знайшли зниження реактивного гліюзу в моделі тромбоемболічного інсульту у щурів при введенні α -ліпоєвої кислоти та вітаміну Е внаслідок їх антиоксидантної активності. Можливий одночасний внесок декількох ушкоджувальних агентів у реакцію астроцитів при діабеті, одним із них служить атака центральної нервової системи вільними радикалами (Yang et al., 2010). У даній праці показано пряму відповідь астроцитів на оксидативний стрес, яка супроводжується підвищенням експресії гліальних маркерів при гіперглікемії та її зниженням у разі уведення антиоксиданта (α -ліпоєвої кислоти). Крім того, зниження експресії нейрон-специфічної енolази у разі уведення кислоти може вказувати на її захисний ефект за ушкодження нейронів в умовах гіперглікемії. Крім антиоксидантних властивостей α -ліпоєва кислота може бути нейропротектором *in vivo* за рахунок пригнічення надмірної реактивності глії, що ускладнює нейропатію при діабеті. Уведення кислоти може викликати подвійний протекторний ефект при діабетичній нейропатії за рахунок зниження як оксидативного стресу, так і реактивності глії.

Останнім часом активно досліджуються властивості α -ліпоєвої кислоти як нетоксичного природного антиоксиданта (Bonfont-Rousselot, 2004). Тканини центральної нервової системи та периферичних нервів здатні швидко поглинати α -ліпоєву кислоту. Продемонстровано антиоксидантний ефект цієї кислоти під час застосування таких прооксидантів як гідроксид-радикал, гіпохлорна кислота, перекис водню, синглетний кисень, закис азоту та пероксинітрил. Недавно запропоновано використання α -ліпоєвої кислоти як терапевтичного агента – антиоксиданта для лікування низки нейродегенеративних захворювань (Poony et al., 2005).

Дегенерація та загибель нейронів при діабеті можуть бути пов'язані з активацією утворення вільних радикалів

через порушення функціонування мітохондрій і антиоксидантної системи (Gandhi, 2010).

Представлені результати свідчать про те, що активність гліальних клітин має вирішальне значення для репарації нейрональних ушкоджень різної природи. У той самий час надмірно інтенсивний розвиток астрогліозу може бути не тільки корисним, а і в окремих випадках перешкоджати репарації через формування гліально-мезодермального рубця. Існують дані, що гіпертрофовані астроцити, які утворюють гліальний рубець у відповідь на хімічний інсульт, можуть гальмувати проростання нейритів. Таким чином, антиоксиданти виявляють нейропротекторну дію не лише через безпосереднє гальмування окисного стресу, а й завдяки зниженню надмірно інтенсивної астрогліальної відповіді.

Висновки

При експериментальному стрепозотоцин-індукованому діабеті відбувається суттєве підвищення вмісту ТБК-реактивних продуктів у відділах мозку щурів порівняно з контрольною групою та зниження рівня глутатіону. Визначено збільшення вмісту астроцитарного цитоскелетного маркера ГФКБ та поліпептидного складу у мозку щурів експериментальної групи, які корелюють із вмістом ТБК-реактивних продуктів. Уведення α -ліпоєвої кислоти (100 мг/кг) протягом 45 діб сприяло статистично достовірному зниженню вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів, а також підвищенню вмісту відновленого глутатіону в гіпокампі та корі великих півкуль порівняно з СТЗ-діабетичною групою та суттєвому зниженню вмісту деградованих поліпептидних фрагментів ГФКБ. Значні зміни вмісту та поліпептидного складу ГФКБ свідчать про інтенсивні цитоскелетні перебудови та пригнічення астрогліозу уведенням α -ліпоєвої кислоти.

Бібліографічні посилання

Baydas, G., Donder, E., Kiliboz, M., Sonkaya, E., Tuzcu, M., Yasar, A., Nedzvetskii, V.S., 2004. Neuroprotection by α -lipoic acid in streptozotocin-induced diabetes. *Biochemistry (Moscow)* 69(9) 1233–1238.

Bernal, J., Nunez, J., 1995. Thyroid hormones and brain development. *Eur. J. Endocrinol.* 133(4), 390–398.

Bonnefont-Rousselot, D., 2004. The role of antioxidant micro-nutrients in the prevention of diabetic complications. *Treat Endocrinol.* 3(1), 41–52.

Bruckner, I., Bustan, C., Adamescu, E., Dobjanschi, C., 2002. Diabetic neuropathy-choices of treatment. *Rom. J. Intern. Med.* 40(1–4), 53–60.

Eng, L.F., 2000. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969–2000). *Neurochem. Res.* 25(9–10), 1439–1451.

Gandhi, G.K., Ball, K.K., Cruz, N.F., Diemel, G.A., 2010. Hyperglycaemia and diabetes impair gap junctional communication among astrocytes. *ASN Neuro* 15(2), e00030.

Gonzalez-Perez, O., Gonzalez-Castaneda, R.E., Huerta, M., Luquin, S., Gomez-Pinedo, U., Sanchez-Almaraz, E., Navarro-Ruiz, A., Garcia-Estrada, J., 2002. Beneficial effects of alpha-lipoic acid plus vitamin E on neurological deficit, reactive gliosis and neuronal remodeling in the penumbra of the ischemic rat brain. *Neurosci. Lett.* 321(1–2), 100–104.

Graham, D.G., 1999. Neurotoxicants and the cytoskeleton. *Curr. Opin. Neurol.* 12(6), 733–737.

Lepekhin, E.A., Eliasson, C., Berthold, C.H., Berezin, V., Bock, E., Pekny, M., 2001. Intermediate filaments regulate astrocyte motility. *J. Neurochem.* 79(3), 617–625.

O'Callaghan, J.P., Jensen, K.F., Miller, D.B., 1995. Quantitative aspects of drug and toxicant-induced astrogliosis. *Neurochem. Int.* 26(2), 115–124.

Panickar, K.S., Jayakumar, A.R., Rama Rao, K.V., 2007. Down-regulation of the 18-kDa translocator protein: Effects on the ammonia-induced mitochondrial permeability transition and cell swelling in cultured astrocytes. *Glia* 55(16), 1720–1727.

Pekny, M., Pekna, M., 2004. Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *J. Pathol.* 204(4), 428–437.

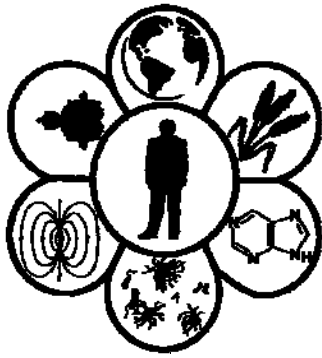
Poon, H.F., Farr, S.A., Thongboonkerd, V., Lynn, B.C., Banks, W.A., Morley, J.E., Klein, J.B., Butterfield, D.A., 2005. Proteomic analysis of specific brain proteins in aged SAMP8 mice treated with alpha-lipoic acid: Implications for aging and age-related neurodegenerative disorders. *Neurochem. Int.* 46(2), 159–168.

Rose, C., 2006. Effect of ammonia on astrocytic glutamate uptake/release mechanisms. *J. Neurochem.* 97, 11–15.

Song, K.H., Lee, W.J., Koh, J.M., Kim, H.S., Youn, J.Y., Park, H.S., Koh, E.H., Kim, M.S., Youn, J.H., Lee, K.U., Park, J.Y., 2005. alpha-Lipoic acid prevents diabetes mellitus in diabetes-prone obese rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 326(1), 197–202.

Yang, Z., Li, K., Yan, X., Dong, F., Zhao, C., 2010. Amelioration of diabetic retinopathy by engrafted human adipose-derived mesenchymal stem cells in streptozotocin diabetic rats. *Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 2, 345–349.

Надійшла до редколегії 12.07.2014



Зміст

| | |
|--|-----|
| Галкін О.Ю., Горшунов Ю.В. Оцінка методів біокон'югації для отримання синтетичних позитивних контролів для імуноферментного аналізу модифікації «IgM-пастка» | 85 |
| Воронкова О.С., Сірокваша О.А., Шевченко Т.М., Вінніков А.І. Фаготип і чутливість до антибіотиків плівкотвірних штамів <i>Staphylococcus aureus</i> , виділених із дихальних шляхів | 90 |
| Бурмас Н.І., Фіра Л.С. Структура та функції печінки в умовах хромово-ізоніазидо-рифампіцинового ураження щурів після застосування сорбексу | 94 |
| Маслак Г.С. Вплив протипухлинної терапії на експонування Tn-антигену на мембранах лейкоцитів хворих на лейкози | 99 |
| Жалейко І.О., Білько Д.І., Дягіль І.С., Білько Н.М. Порівняльна оцінка морфофункціональної активності клітин кісткового мозку пацієнтів при хронічній мієлоїдній лейкемії у разі терапії препаратами групи інгібіторів тирозинкіназ першого та другого покоління | 104 |
| Ядерна А.Г., Голодок Л.П., Вінніков А.І. Співвідношення аеробної та анаеробної мікрофлори уrogenітального тракту при дисбактеріозі у жінок м. Дніпропетровськ | 110 |
| Гарифуліна М.А., Воронкова О.С., Шевченко Т.М., Вінніков А.І. Характеристика стафілококів та їх роль у патології дітей | 115 |
| Ткач О.П., Вакерич М.М., Ніколайчук В.І. Вплив солі марганцю на рослини <i>Triticum aestivum</i> | 121 |
| Бойко Л.А., Фіра Л.С., Лихацький П.Г. Ефективність застосування ентеросгелю в умовах одночасного ураження щурів карбофосом і тетрахлорметаном | 125 |
| Борисенко В.Б., Белов С.Г., Сорокіна І.В., Горголь Н.И. Патогенетические аспекты острого холангита | 131 |
| Ошмянская Н.Ю., Галинский А.А., Гайдар Ю.А. Особенности гибели и регенерации клеток поджелудочной железы на ранних этапах развития алкогольного хронического панкреатита | 138 |
| Кириченко С.В., Прищепа І.В., Лагода В.С., Велика М.О., Недзвецкий В.С. Нейропротекторні ефекти α -ліпоєвої кислоти на розвиток окисного стресу й астрогліозу у мозку СТЗ-діабетичних щурів | 143 |



Content

| | |
|---|-----|
| Galkin O.Y., Gorshunov Y.V. Evaluation of bio-conjugation methods for obtaining of synthetic positive control for IgM-capture ELISA | 85 |
| Voronkova O.S., Sirokvasha O.A., Shevchenko T.N., Vinnikov A.I. Phage type and sensitivity to antibiotics of <i>Staphylococcus aureus</i> film-forming strains isolated from airway mucosa | 90 |
| Burmas N.I., Fira L.S. Structure and function of the liver in conditions of chrome-isoniazid-rifampicin affection of rats after applying of sorbex | 94 |
| Maslak G.S. Effect of anticancer therapy on Tn antigen exposure on the leucocyte membranes in patients with leukemia | 99 |
| Zhaleyko I.O., Bilko D.I., Dyagil I.S., Bilko N.M. Comparative evaluation of bone marrow cells morpho-functional activity in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors of the first and second generation | 104 |
| Yaderna A.H., Golodok L.P., Vinnikov A.I. Correlation between aerobic and anaerobic microflora of the urogenital tract at dysbiosis in women of Dnipropetrovsk city | 110 |
| Haryfulina M.A., Voronkova O.S., Shevchenko T.M., Vinnikov A.I. Characterization of staphylococci and their role in pathology of children | 115 |
| Tkach E., Vakerich M., Nikolaychuk V. Action of manganese salt on <i>Triticum aestivum</i> | 121 |
| Boyko L.A., Fira L.S., Lychatskiy P.G. Effectiveness of enterosgel usage in the conditions of simultaneous destruction of rats by karbofos and carbon tetrachloride | 125 |
| Borisenko V., Belov S., Sorokina I., Gorgol N. Pathogenic aspects of acute cholangitis | 131 |
| Oshmyanska N.Y., Galinsky A.A., Gaidar Y.A. Peculiarities of death and regeneration of pancreas cells at early stages of alcoholic chronic pancreatitis | 138 |
| Kyrychenko S., Prishchepa I., Lagoda V., Velika M., Nedzvetsky V. Neuroprotective effects of α -lipoic acid on the development of oxidative stress and astrogliosis in the brain of STZ-diabetic rats | 143 |

Редакційна колегія (Editorial Board)

Голова редакційної колегії (Editor-in-Chief):

Пахомов Олександр Євгенович – Дніпропетровський національний університет ім. Олеся 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. Олеся 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. Олеся 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. Олеся Гончара, завідувач каф. мікробіології, вірусології та біотехнології; д-р біол. наук, проф.;

Гассо Віктор Якович – Дніпропетровський національний університет ім. Олеся 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. Олеся Гончара, проф. каф. клінічної лабораторної діагностики; д-р мед. наук, проф.;

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

Кулікова Фаїна 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.;

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

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

Татаровський Олександр Петрович – Дніпропетровський національний університет ім. Олеся 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. Олеся Гончара, проф. каф. біофізики та біохімії; д-р біол. наук, проф.;

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

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

Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Медицина

Заснований у 2010 р.

Том 5(2)

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 22.11.2014. Формат 60×84 ¹/₈. Папір друкарський. Друк плоский. Ум. друк. арк. 10,1. Ум. фарбовідб. 10,1. Обл.-вид. арк. 10,1. Тираж 100 пр. Вид. № 1978. Замовлене

Свідоцтво державної реєстрації № ДК – 289 від 21.12.2000 р.

Видавництво Дніпропетровського університету,
пр. Гагаріна, 72, м. Дніпропетровськ, 49010