

## **МОЖЛИВІСТЬ ВИКОРИСТАННЯ АУТОЦИТОКІНІВ ДЛЯ ПОПЕРЕДЖЕННЯ ЗНИЖЕННЯ ІМУННОГО СТАТУСУ В УМОВАХ НЕСПРИЯТЛИВОЇ ЕКОЛОГІЧНОЇ СИТУАЦІЇ**

*Дніпропетровський національний університет ім. О. Гончара*

Досліджено вплив препаратів аутоцитокінів на зміну біологічних властивостей умовно-патогенних мікроорганізмів та представників нормофлори товстої кишки хворих на неспецифічний виразковий коліт. З'ясовано, що аутоцитокіни не виявляють достовірно значущого впливу на зміну антибіотикочутливості мікроорганізмів. Установлено стимулювальну дію препаратів аутоцитокінів на ріст представників нормальної мікрофлори товстої кишки та пригнічуючий ефект стосовно умовно-патогенних мікроорганізмів. Ці результати дають основу для пошуку можливостей використання аутоцитокінів для імунокорекції організму пацієнтів в умовах складної екологічної ситуації.

*Ключові слова:* імунокорекція, аутоцитокіни, антибіотикочутливість, неспецифічний виразковий коліт..

К. В. Коцаренко, А. И. Винников, Л. П. Голодок, В. Е. Кудрявцева, С. Ю. Егорова

*Днепропетровский национальный университет им. О. Гончара*

## **ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АУТОЦИТОКИНОВ ДЛЯ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ СНИЖЕНИЯ ИММУННОГО СТАТУСА В УСЛОВИЯХ НЕБЛАГОПРИЯТНОЙ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ**

Исследовано влияние препаратов аутоцитокінов на изменение биологических свойств условно-патогенных микроорганизмов и представителей нормофлоры толстой кишки больных неспецифическим язвенным колитом. Установлено, что аутоцитокіны не имеют достоверно значительного влияния на изменение антибиотикочувствительности микроорганизмов. Установлено стимулирующее действие препаратов аутоцитокінов на рост представителей нормальной микрофлоры толстой кишки и угнетающий эффект относительно условно-патогенных микроорганизмов. Эти результаты дают основание для поиска возможностей аутоцитокінов для иммуннокоррекции организма пациентов в условиях сложной экологической ситуации.

*Ключевые слова:* иммуннокоррекция, аутоцитокіны, антибиотикочувствительность, неспецифический язвенный колит.

K. V. Kotsarenko, A. I. Vinnikov, L. P. Golodok, V. E. Kudryavceva, S. Y. Egorova

*O. Gonchar Dnipropetrovsk National University*

## **APPLICATION OF THE AUTOCITOCIN FOR THE IMMUNITY LOSS PREVENTION IN THE DIFFICULT ENVIRONMENTS**

An influence of the autocitocin preparations on the biological characteristics change of the opportunistic and normal microflora microorganisms in a large intestine taken from nonspecific ulcerous colitis patients has been researched. Autocitocins have revealed no impact on the microorganisms' antibiotic susceptibility change. It has been found out that autocitocin preparations have a stimulating effect on the growth of normal microflora gut organisms and an inhibiting effect on opportunistic microorganisms. These data give cause for the use of autocitocin in order to correct the immunity of patients in difficult environments.

*Keywords:* immunity correction, autocitocin, antibiotic susceptibility, nonspecific ulcerous colitis.

Біосфера як сукупність усіх живих організмів, що мешкають на нашій планеті, знаходиться в постійній динамічній рівновазі процесів, які призводять до круговороту речовин, виникнення трофічних зв'язків, сприяють біологічному різноманіттю живого світу. В умовах урбанізації суспільства, коли збільшується антропогенна дія на навколишнє середовище, організму людини все важче підтримувати гомеостаз, тобто постійність складу внутрішньоклітинного середовища.

Ситуація ускладнюється погіршенням стану довкілля, особливо в промислових регіонах, де викиди підприємств поряд із побутовими відходами становлять значну долю серед усіх

негативних факторів впливу. Розклад відходів на відкритих звалищах супроводжується виділенням великої кількості речовин ксенобіотичного походження, що мають канцерогенні, токсигенні та мутагенні властивості. Проживання в зонах екологічного неблагополуччя, а також забруднення середовища існування негативно впливає на інтенсивність імунної відповіді. Порухення системи імунітету зачіпають як клітинний, так і гуморальний рівень. Усе це знижує захисні сили організму (Гирко, 2001).

Ураховуючи функціональне навантаження імунної системи в людей, що проживають у регіонах з екологічно несприятливою обстановкою, особливо в регіонах, постраждалих від аварії на Чорнобильській атомній електростанції, необхідно виключити додаткову дію інших несприятливих чинників, продукти харчування алергенної дії, глистової інвазії, які можуть посилити наявні порушення в імунному статусі. При проведенні імунокорегуючої терапії перевагу віддають препаратам, які мають неспецифічну імуностимулюючу дію, наприклад рослинні адаптогени. Вони активують клітинну ланку імунної системи, фагоцитарну активність макрофагів та продукцію цитокінів (Перковская, 2001). Але для більш вираженої і повної імунокорекції застосовують препарати природних та синтетичних цитокінів. Ці білкові речовини є медіаторами імунної відповіді, які відіграють важливу роль у регуляції розмноження і диференціювання імунокомпетентних клітин. Цитокіни залучені в розвиток і завершеність запальних реакцій (Основи імунології, 2007).

Оскільки цитокіни мають виражені імунорегуляторні властивості, багато дослідників розглядають їх як перспективні лікарські препарати. Та в останній час почали з'являтися відомості, що деякі мікроорганізми можуть використовувати певні цитокіни як ростові фактори. Це може призвести не до швидкого одужання, а, навпаки, до прогресу хвороби мікробної етіології. Тому постає проблема широкого використання препаратів цитокінів у медичній практиці.

Рядом дослідників вивчалася дія синтетичних препаратів цитокінів на патогенні бактерії *in vitro* та *in vivo* (Романова, 2000). За одержаними ними даними вплив препаратів цитокінів на патогенні бактерії *in vitro* здійснюється за трьома напрямками: стимуляція росту, бактерицидна дія, зміна біологічних властивостей (Афанасьєв, 2005; Романова, 2000).

Поряд із цим залишається відкритим питання: як будуть поводити себе мікроорганізми під дією природних цитокінів (аутоцитокінів), виділених у нативному стані з людського організму.

Оскільки неспецифічний виразковий коліт (НВК) – найбільш показове захворювання ШКТ, при якому підвищується кількість природних цитокінів, то для експерименту використані аутоцитокіни, отримані від пацієнтів із цим захворюванням (Береза, 1998).

Мета цієї роботи – виявити вплив препаратів аутоцитокінів на мікрофлору товстої кишки та оцінити можливість їх використання для попередження зниження імунного статусу в умовах несприятливої екологічної ситуації.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проведені на базі лабораторії імунології та мікробіології ДУ «Інститут гастроентерології АМН України», а також на кафедрі мікробіології та вірусології Дніпропетровського національного університету ім. О. Гончара.

Об'єкт дослідження – аутоцитокіни, виділені від трьох хворих на НВК ( $n = 3$ ), та штами мікроорганізмів: *Escherichia coli* з нормальною ферментативною активністю (НФА), *E. coli* з гемолітичною активністю (НЛу+), *Staphylococcus aureus*, *Proteus spp.* Аутоцитокіни отримували з 10 мл венозної гепаринізованої крові методом градієнтного центрифугування (фікол – верографін). Стандартизували по білку за методом Лоурі (Практикум по біохімії, 1989). Концентрація аутоцитокінів становила у середньому 50–100 мкг/мл (Ковальчук, 2006). Готували розведення аутоцитокінів від 1:1 до 1:256 у м'ясопептонному бульйоні (МПБ), окремо готували мікробну суспензію дослідних штамів за стандартом мутності –  $1 \times 10^9$  колонієутворюючих одиниць в мл (КУО/мл) у 3 мл 0,85%-ного фізіологічного розчину. У кожен пробірник з розведеннями зразків і в контрольну пробірку (з фізіологічним розчином) вносили по 0,2 мл інокуляту. Інкубували 18–24 години при  $+ 37^\circ\text{C}$  у термостаті. Відсутність помітного росту в пробірці з найменшою концентрацією відповідає мінімальній інгібуючій концентрації (МІК) препарату. Для визначення мінімальної бактерицидної концентрації (МБК) препарату робили висіви з пробірок з відсутністю помітного росту по 0,1 мл на чашки Петрі з м'ясопептонним агаром (МПА). Чашки інкубували 24 години при  $37^\circ\text{C}$ . МБК препарату відповідала пробірці, висів з якої не давав росту чи на агарі виросло не більше 10 колоній, що свідчило про загибель 99,9 % клітин популяції (Романова, 1998).

Для визначення зміни антибіотикочутливості використовували метод дифузії в агар з використанням індикаторних дисків: бензилпеніцилін, оксацилін, еритроміцин, кліндаміцин, гентаміцин, ванкоміцин, ампіцилін, норфлуксацин, хлорамфенікол, тетрациклін, цефтриаксон (фірма «НДСФ», Санкт-Петербург, Російська Федерація). До 1 мл препарату цитокінів і контрольної проби (1 мл 0,85%-ного фізіологічного розчину) додавали 0,2 мл суспензії досліджуваного штаму, що містила  $10^9$  КУО/мл мікробних клітин з добових агарових культур мікроорганізмів, робили висів на МПА.

Результати дослідження інтерпретували залежно від величини діаметру (у мм) зони затримки росту штабів мікроорганізмів навколо диску. Для оцінки впливу аутоцитокінів на ростові характеристики мікроорганізмів використовували кількісний метод дослідження, заснований на визначенні числа мікробних клітин в 1 мл рідини – метод секторних посівів. Робили перерахунок кількості колоній, що вирости, на кількість колонієутворюючих одиниць в 1 мл рідини згідно з таблицею (Бактеріологія і вірусологія, 2007).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За даними дослідників, цитокіни здійснюють бактеріостатичну та бактерицидну дію на штаби патогенних мікроорганізмів (Рисованная, 2007). У наших експериментах визначено відсутність такого впливу у випадку застосування аутоцитокінів при культивуванні штабів умовно-патогенних мікроорганізмів та представників кишкової нормофлори. Так, дослідження МІК та МБК препаратів аутоцитокінів на дослідні штаби показали відсутність бактерицидної та бактеріостатичної дії препарату аутоцитокінів: у пробірках був помітний ріст, а на газоні у місті додавання аутоцитокінів не було зони лізису або затримки росту.

Чутливість мікроорганізмів до антибіотиків вивчали методом дифузії в агар з використанням дисків. Вимірювали зони затримки росту (в мм) у контрольних і дослідних пробах (Авдєєва, 2005). За контроль приймали пригнічення росту штабів *S. aureus* під дією антибіотиків, ефективних у випадку з грампозитивними мікроорганізмами, без додавання аутоцитокінів. Для дослідів використовували аутоцитокіни (табл. 1).

Таблиця 1

### Показники чутливості *S. aureus* до антибіотиків по зонах затримки росту (мм), n = 3

Антибіотики	Контроль	Дослід
Пеніцилін	26±3,2	24±2,8
Оксацилін	18±2,1	18±1,9
Еритроміцин	10±1,5	8±1,3
Кліндаміцин	24±2,7	24±2,9
Гентаміцин	18±2,1	18±2,4
Ванкоміцин	14±1,9	14±1,8

Наведені результати показали, що достовірних відмінностей чутливості в контрольних і дослідних штабів не встановлено.

Крім того, визначали чутливість представників грамнегативних умовно-патогенних бактерій: представників роду *Proteus* та роду *Escherichia*. Для них використовували інший спектр антибіотиків, ефективних проти грамнегативних бактерій. За контроль приймали чутливість мікроорганізмів без додавання аутоцитокінів, у досліді використовували аутоцитокіни (табл. 2).

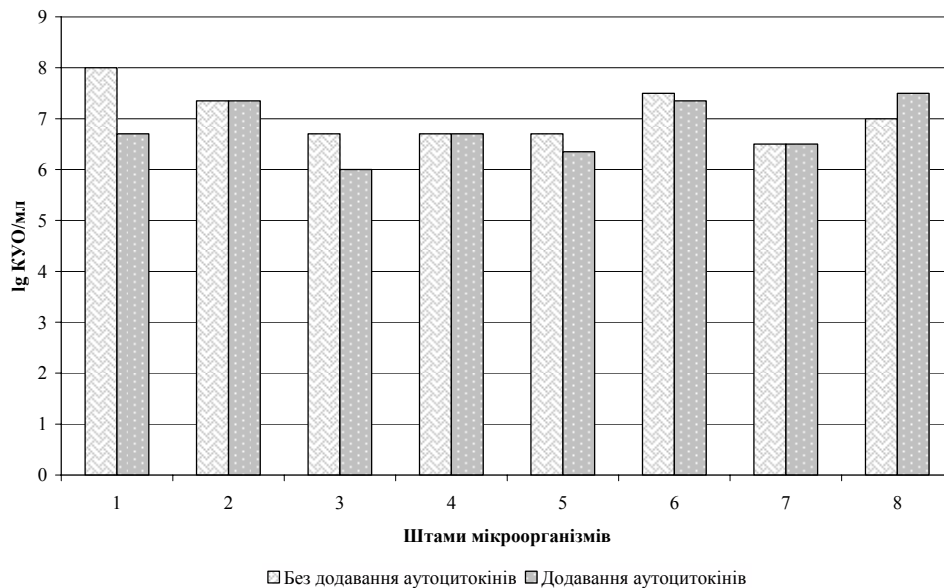
Таблиця 2

### Чутливість *Proteus spp.*, *E. coli* Нly+, *E. coli* НФА до антибіотиків по зонах затримки росту (мм), n = 3

Антибіотики	<i>Proteus spp</i>		<i>E. coli</i> Нly+		<i>E. coli</i> НФА	
	Контроль	Дослід	Контроль	Дослід	Контроль	Дослід
Ампіцилін	16±1,9	15±1,7	16±2,1	16±1,5	15±1,8	14±1,6
Хлорамфенікол	20±2,6	20±2,4	20±2,5	20±2,7	24±3,0	22±3,0
Тетрациклін	16±1,8	16±1,9	16±1,8	16±1,9	16±1,9	15±1,8
Цефтриаксон	18±2,2	17±2,0	24±2,8	24±2,9	26±3,1	24±3,4
Норфлоксацин	20±2,5	20±2,6	20±2,6	20±2,8	20±2,5	20±2,9

Для грамнегативних бактерій також не встановлено достовірно значущих відмінностей чутливості до антибіотиків. У той же час можливо відмітити тенденцію до підвищення резистентності: так, у *S. aureus* відмічено таку тенденція стосовно пеніциліну та еритроміцину; для *Proteus spp.* – стосовно ампіциліну та цефтриаксону; для *E. coli* НФА – стосовно ампіциліну, хлорамфеніколу, тетрацикліну, цефтриаксону. Тому є сенс припустити, що залишається можливість використання антибіотиків на фоні лікування аутоцитокінами.

Для вивчення ростових характеристик досліджуваних штабів проводили преінкубацію суспензії штабів мікроорганізмів та препарату аутоцитокінів протягом 60 та 120 хв. при 37 °С, робили висів методом секторних посівів та підраховували середнє значення трьох експериментів (рисунок).



#### Вплив аутоцитокінів на чисельність мікроорганізмів в Ig КУО/мл:

- |  |  |
|--|--|
| 1. <i>S.aureus</i> , 1 година інкубації;     | 2. <i>S.aureus</i> , 2 години інкубації      |
| 3. <i>Proteus spp.</i> , 1 година інкубації; | 4. <i>Proteus spp.</i> , 2 години інкубації; |
| 5. <i>E.coli Hly+</i> , 1 година інкубації;  | 6. <i>E.coli Hly+</i> , 2 години інкубації;  |
| 7. <i>E. coli НФА</i> , 1 година інкубації;  | 8. <i>E. coli НФА</i> , 2 години інкубації.  |

Як видно з рисунку, аутоцитокіни по-різному впливають на різні штами мікроорганізмів. Для *S. aureus*, *Proteus spp.*, *E. coli Hly+* спостерігали пригнічення росту по відношенню до контролю (1 година преінкубації мікроорганізмів з препаратом аутоцитокінів). Але через 2 години преінкубації кількість колоній збільшилась. Це свідчить про часовий поріг, дія аутоцитокінів з часом нівелюється. Для *E. coli НФА* через 2 години преінкубації спостерігали стимуляцію росту.

Таким чином, отримані дані вказують на позитивний ефект при використанні препаратів аутоцитокінів, отриманих від хворих на НВК. Спостерігається тенденція до пригнічення росту умовно-патогенних мікроорганізмів і стимуляції нормофлори. Виходячи з того що нормальна мікрофлора є одним із природних захисних факторів організму, можливо стверджувати про підвищення рівня імунного статусу, що в умовах несприятливої екологічної ситуації сприятиме захисту організму від негативних факторів навколишнього середовища.

#### ВИСНОВКИ

1. У ході дослідження дії препаратів аутоцитокінів встановлено відсутність бактерицидної та бактериостатичної дії на переважну більшість представників індигенної мікрофлори товстої кишки.

2. Відмічено, що аутоцитокіни не виявляють достовірно значущого впливу на зміну антибіотикочутливості мікроорганізмів, що робить можливим використання препаратів аутоцитокінів при антибіотикотерапії.

3. Установлено стимулювальну дію препаратів аутоцитокінів на ріст тестової культури *E. coli НФА* – представника нормальної мікрофлори. У той же час встановлено, що препарати пригнічують розвиток умовно-патогенних мікроорганізмів *E. coli Hly+*, *S. aureus*, *Proteus spp.* Це дає змогу використовувати препарати аутоцитокінів для стимуляції індигенної мікрофлори кишечника, при цьому пригнічуючи розвиток неспецифічного виразкового коліту.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

Авдєєва Л. В. Методичні підходи до визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків / Л. В. Авдєєва // Лабораторна діагностика. – 2005. – № 3. – С. 95.

Афанасьєв С. С. Влияние препаратов цитокинов на устойчивость бактерий к антибиотикам in vitro / С. С. Афанасьев, А. В. Алёшкин, А. А. Воробьев и др. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2005. – № 3. – С. 99.

**Бактеріологія і вірусологія:** Нормативне виробничо-практичне видання / Під ред. Т. В. Марухно. – К. : Медінформ, 2007. – С. 625.

**Береза Н. М.** Способ лечения неспецифического язвенного колита / Н. М. Береза, Т. П. Шамшонкова. – Пат. №23831А, Украина, МКИ А61 К38/00. – 1998. – Бюл. № 4.

**Гирко И. Н.** Показатели специфической резистентности у часто и длительно болеющих детей, проживающих в экологически неблагоприятных регионах Республики Беларусь / И. Н. Гирко, Г.А. Шишко, А.Ф. Перковская и др. // Медицинская иммунология. – 2001. – Т. 3, № 2. – С. 288.

**Ковальчук Л. В.** Бактерицидное действие комплекса природных цитокинов на *Streptococcus pyogenes* in vitro / Л. В. Ковальчук, Л. В. Ганковская, Т. А. Шведова и др. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2006. – № 3. – С. 114.

**Основи імунології** / І. Є. Соколова, А. І. Вінніков, Т. М. Полішко. – Д. : Вид-во ДНУ, 2007. – С. 559.

**Перковская А. Ф.** Состояние иммунной системы у детей, проживающих в экологически неблагоприятных условиях Республики Беларусь и особенности иммунокорректирующей терапии / А. Ф. Перковская, И. Н. Гирко, Е. Е. Тарасова и др. // Медицинская иммунология. – 2001. – Т. 3, № 2. – С. 295.

**Практикум по биохимии:** Учеб. пособие / Под ред. С. Е. Северина, Г. А. Соловьевой. – М. : Изд-во МГУ, 1989. – С. 81.

**Рисованная Е. И.** Новые представления о взаимодействии цитокинов, как медиаторов иммунного ответа, и микроорганизмов / Е. И. Рисованная, И. Е. Соколова // Современные научные достижения – 2007: Материалы II Междунар. науч.-практ. конф. – Т. 5. Биологические науки. – Д. : Наука и образование, 2007. – С. 105.

**Романова Ю. М.** Некультивируемое состояние у патогенных бактерий: известные и возможные факторы индукции обратимого процесса / Ю. М. Романова // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 1998. – № 3. – С. 91.

**Романова Ю. М.** Цитокины – возможные активаторы роста патогенных бактерий / Ю. М. Романова, А. Л. Гинцбург // Вестник Российской АМН. – 2000. – № 1. – С. 90.

*Надійшла до редколегії 05.02.09*