

УДК 579.61: 616-053.2

К. В. Коцаренко, А. І. Вінніков, Л. П. Голодок, В. Є. Кудрявцева, С. Ю. Єгорова

Дніпропетровський національний університет ім. Олесь Гончара

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ АУТОЦИТОКІНІВ НА СТАН МІКРОФЛОРИ ТОВСТОЇ КИШКИ У ХВОРИХ ГАСТРОЕНТЕРОЛОГІЧНОГО ПРОФІЛЮ

Вивчено вплив препаратів аутоцитокінів на зміну біологічних властивостей мікроорганізмів, виділених від хворих на неспецифічний виразковий коліт. Установлено стимулювальну дію препаратів аутоцитокінів на ріст представників нормальної мікрофлори товстої кишки та пригнічувальний ефект відносно умовно-патогенних мікроорганізмів. З'ясовано, що аутоцитокіни не виявляють достовірного впливу на зміну антибіотикочутливості мікроорганізмів.

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

Oles' Gonchar Dnipropetrovsk National University

RESEARCH OF THE AUTOCYTOKININS INFLUENCE ON THE LARGE INTESTINE'S MICROFLORA IN GASTROENTEROLOGICAL PATIENTS

The autocyto kinins' influence on the change of biological characteristics of the microorganisms secured from patients with non-specific ulcerous colitis has been studied. It has been found that autocyto kinin samples have a stimulating influence on the growth of large intestine's normal microflora and inhibiting effect to opportunistic pathogenic microorganisms. Autocyto kinins are proved to have no significant influence on the antibiotic sensitivity of microorganisms.

Вступ

В усьому світі значно збільшилась кількість випадків заворювань шлунково-кишкового тракту, у тому числі це стосується неспецифічного виразкового коліту. У патогенетичній картині такого захворювання спостерігаються зміни цілого ряду метаболічних властивостей організму. Одні з головних змін стосуються імунної системи та складу мікрофлори. До складу імунної системи входять різні органи, а також клітини, що вільно циркулюють у крові [13]. Але особлива роль у ході імунної відповіді належить цитокінам – медіаторам імунної відповіді, які відіграють важливу роль у регуляції розмноження та диференціювання імунокомпетентних клітин [14].

Цитокіни залучені у розвиток і завершеність запальних реакцій, тобто мають виражені імунорегуляторні властивості. Тому багато дослідників розглядають їх як перспективні лікарські препарати. Встановлена кореляція між активністю патологічного процесу та збільшенням в ураженій ділянці слизової оболонки товстої кишки концентрації таких прозапальних цитокінів як ІЛ-1, ІЛ-2, ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-10, ФНО- α [15; 16]. Фармакологічна блокада прозапальних цитокінів сприяє зменшенню запальної реакції в кишці. Ці спостереження послужили підставою для розвитку нового напрямку терапії захворювань із використанням цитокінів [5; 9]. При неспецифічному виразковому ко-

літі (НВК) знайшли застосування імунотропні препарати з різними механізмами дії – від імунодепресантів до імуностимуляторів. Проте відсутність чітких уявлень про етіологію та патогенез порушень при НВК призводить до недостатньої ефективності методів імунотерапії [3; 6].

Поряд із цим останнім часом почали з'являтися відомості, що деякі мікроорганізми можуть використовувати певні цитокини як ростові чинники [10]. Це може призвести не до швидкого одужання, а навпаки, до прогресу хвороби мікробної етіології. Рядом дослідників вивчено дію препаратів синтетичних цитокинів на патогенні бактерії *in vitro* і *in vivo*. Вплив препаратів цитокинів на патогенні бактерії *in vitro* може давати різні результати: це стимуляція росту, бактерицидна дія, зміна біологічних властивостей [4; 12]. Виходячи з цих даних, залишається відкритим питання: як будуть поводитися мікроорганізми під дією природних цитокинів (аутоцитокінів), які виділені в нативному стані з людського організму, особливо, якщо це стосується лікування НВК. Тому мета цієї роботи – виявити вплив препаратів аутоцитокінів на мікрофлору товстої кишки та оцінити можливість їх використання при лікуванні неспецифічного виразкового коліту.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проведені на базі лабораторії імунології та мікробіології Інституту гастроентерології АМН України, а також на кафедрі мікробіології та вірусології Дніпропетровського національного університету ім. Олеся Гончара.

Об'єкт дослідження – аутоцитокіни, виділені від 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 за вмістом білка методом Лоурі [8]. Концентрація аутоцитокінів становила у середньому 50–100 мкг/мл [7].

Готували розведення аутоцитокінів від 1 : 1 до 1 : 256 у м'ясопептонному бульйоні (МПБ), окремо готували мікробну суспензію дослідних штамів за стандартом мутності – 1×10^9 колонієтвірних одиниць/мл (КУО/мл) у 3 мл 0,85 % фізіологічного розчину. У кожен пробір 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 у пробірці з найменшою концентрацією відповідає мінімальній інгібувальній концентрації (МІК) препарату [10]. Для визначення мінімальної бактерицидної концентрації (МБК) препарату робили висіви з пробірок із 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 виростало не більше 10 колоній, що свідчило про загибель 99,9 % клітин популяції [11].

Для визначення зміни антибіотикочутливості використовували метод дифузії в агар із використанням індикаторних дисків: бензилпеніцилін, оксацилін, еритроміцин, кліндаміцин, гентаміцин, ванкоміцин, ампіцилін, норфлуксацин, хлорамфенікол, тетрациклін, цефтриаксон (фірма НДСФ, Санкт-Петербург, Російська Федерація). До 1 мл препарату цитокинів і контрольної проби (1 мл 0,85 % фізіологічного розчину) додавали 0,2 мл суспензії досліджуваного штаму, що містила 10^9 КУО/мл мікробних клітин із добових агарових культур мікроорганізмів, робили висів на МПА. Результати дослідження інтерпретували залежно від діаметра зони (мм) затримки росту штамів мікроорганізмів навколо диска. Для оцінки впливу аутоцитокінів на ростові характеристики

мікроорганізмів використовували кількісний метод дослідження, заснований на визначенні кількості мікробних клітин у 1 мл рідини – метод сективних посівів. Робили перерахунок кількості колоній, що вирости, на кількість колонієтворних одиниць у 1 мл рідини згідно з таблицею [2].

Результати та їх обговорення

За даними дослідників [10], цитокіни здійснюють бактеріостатичну та бактерицидну дію на штами патогенних мікроорганізмів. У наших експериментах визначено відсутність такого впливу у випадку застосування аутоцитокінів при культивуванні штамів умовно-патогенних мікроорганізмів і представників кишкової нормофлори. Дослідження МІК та МБК препаратів аутоцитокінів на дослідні штами показали відсутність бактерицидної та бактеріостатичної дії препарату аутоцитокінів: у пробірках помітний ріст, а на газоні у місці додавання аутоцитокінів не було зони лізею або затримки росту.

Чутливість мікроорганізмів до антибіотиків вивчали методом дифузії в агар із використанням дисків. Вимірювали зони затримки росту (мм) у контрольних і дослідних пробах [1]. За контроль приймали пригнічення росту штамів *S. aureus* під дією антибіотиків, ефективних проти грампозитивних мікроорганізмів, без додавання аутоцитокінів. Для досліду використовували аутоцитокіни (табл. 1). Наведені результати показали, що достовірних відмінностей чутливості у контрольних і дослідних штамів не встановлено.

Таблиця 1

Показники чутливості *S. aureus* до антибіотиків за зонами 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 |

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

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

Для вивчення ростових характеристик досліджених штамів проводили преінкубацію суспензії штамів мікроорганізмів та препарату аутоцитокінів протягом 60 та 120 хв. при +37 °С, робили висів методом секторних посівів та підраховували середнє значення трьох експериментів (табл. 3).

Як видно з таблиці 3, аутоцитокіни по-різному впливають на різні штами мікроорганізмів. Для *S. aureus*, *Proteus spp.*, *E. coli* Нly+ спостерігали пригнічення росту відносно контролю (1 година преінкубації мікроорганізмів із препаратом аутоцитокінів).

Але через 2 години преінкубації кількість колоній збільшилась. Це свідчить про часовий поріг, дія аутоцитокінів із часом нівелюється. Для *E. coli* НФА через 2 години преінкубації спостерігали стимуляцію росту. Таким чином, встановлено факт стимуляції росту мікроорганізмів – представників кишкової нормофлори під дією аутоцитокінів.

Таблиця 2

Чутливість *Proteus spp.*, *E. coli* НLy+, *E. coli* НФА до антибіотиків за зонами 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 |

Таблиця 3

Вплив аутоцитокінів на чисельність мікроорганізмів, lg КУО/мл, n = 3

| Штами мікроорганізмів | Час інкубації, години | Контроль | Дослід |
|-----------------------|-----------------------|----------|--------|
| <i>S. aureus</i> | 1 | 8,0 | 6,7 |
| | 2 | 7,4 | 7,4 |
| <i>Proteus spp.</i> | 1 | 6,7 | 6,0 |
| | 2 | 6,7 | 6,7 |
| <i>E. coli</i> НLy+ | 1 | 6,7 | 6,4 |
| | 2 | 7,5 | 7,4 |
| <i>E. coli</i> НФА | 1 | 6,5 | 6,5 |
| | 2 | 7,0 | 7,5 |

Висновки

У ході дослідження дії препаратів аутоцитокінів встановлено відсутність бактерицидної та бактериостатичної дії на переважну більшість представників індигенної мікрофлори товстої кишки. Відмічено, що аутоцитокіни не виявляють достовірного впливу на зміну антибіотикочутливості мікроорганізмів, що робить можливим використання препаратів аутоцитокінів при антибіотикотерапії. Встановлену стимулювальну дію препаратів аутоцитокінів на ріст тестової культури *E. coli* НФА – представника нормальної мікрофлори. У той же час препарати пригнічують розвиток умовно-патогенних мікроорганізмів *E. coli* НLy+, *S. aureus*, *Proteus spp.* Це дає змогу використовувати препарати аутоцитокінів для стимуляції індигенної мікрофлори кишечника, при цьому пригнічуючи розвиток неспецифічного виразкового коліту.

Бібліографічні посилання

1. **Авдєєва Л. В.** Методичні підходи до визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків // Лабораторна діагностика. – 2005. – № 3. – С. 95.
2. **Бактеріологія і вірусологія:** Нормативне виробничо-практичне видання / Під ред. Т. В. Марухно. – К. : Медінформ, 2007. – С. 625.
3. **Береза Н. М.** Спосіб лечения неспецифического язвенного колита / Н. М. Береза, Т. П. Шамшонкова – Пат. № 23831А, Україна, МКИ А61 К38/00. Бюл. № 4. – 1998.
4. **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.

5. **Ковальчук Л. В.** Комплекс естественных иммунопептидов в лечении раневого процесса / Л. В. Ковальчук, М. В. Хорева, Т. П. Ванюшко / Материалы I съезда иммунологов в России. – Новосибирск, 1992. – С. 220.
6. **Ковальчук Л. В.** Иммуноцитокины и локальная иммунокоррекция / Л. В. Ковальчук, Л. В. Ганковская // Иммунология. – 1995. – № 1. – С. 98.
7. **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.
8. **Практикум по биохимии** / Под ред. С. Е. Северина, Г. А. Соловьевой – М. : Изд-во МГУ, 1989. – С. 81.
9. **Применение аутоцитокінов в лечении отдаленных метастазов рака поджелудочной железы** / А. Раухфаус, А. Маль, В. Насиф, А. Клер // Клінічна хірургія. – 1996. – № 8. – С. 120.
10. **Рисованная Е. И.** Новые представления о взаимодействии цитокинов, как медиаторов иммунного ответа, и микроорганизмов / Е. И. Рисованная, И. Е. Соколова / Современные научные достижения – 2007. Матер. II Междунар. научно-практ. конф. – Т. 5. Биологические науки. – Д. : Наука и образование, 2007. – С. 105.
11. **Романова Ю. М.** Некультивируемое состояние у патогенных бактерий: известные и возможные факторы индукции обратимого процесса // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 1998. – № 3. – С. 91.
12. **Романова Ю. М.** Цитокины – возможные активаторы роста патогенных бактерий / Ю. М. Романова, А. Л. Гинцбург // Вестник Российской АМН. – 2000. – № 1. – С. 90.
13. **Соколова І. Є.** Основи імунології / І. Є. Соколова, А. І. Вінніков, Т. М. Полішко. – Д. : Вид-во ДНУ, 2007. – С. 559.
14. **Goodnourn S.** Interferons: cell signaling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures / S. Goodnourn, L. Didcock / J. Gen. Virol. – 2000. – Vol. 81. – P. 86.
15. **Kwak J.** Cytokines secreted by lymphokine-activated killer cells induce endogenous nitric oxide synthesis and apoptosis in DLD-1 colon cancer cells / J. Kwak, M. Han, K. Choi / Cell. Immunol. – 2000. – N 2. – P. 99.
16. **Sen G. C.** Viruses and interferon // Annu. Rev. Microbiol. – 2001. – Vol. 55. – P. 255.

Надійшла до редколегії 29.03.2009