



#10 (50), 2019 część 3
Wschodnioeuropejskie Czasopismo Naukowe
(Warszawa, Polska)
Czasopismo jest zarejestrowane i publikowane w Polsce. W czasopiśmie publikowane są artykuły ze wszystkich dziedzin naukowych. Czasopismo publikowane jest w języku polskim, angielskim, niemieckim i rosyjskim.

Artykuły przyjmowane są do dnia 30 każdego miesiąca.

Częstotliwość: 12 wydań rocznie.

Format - A4, kolorowy druk

Wszystkie artykuły są recenzowane

Każdy autor otrzymuje jeden bezpłatny egzemplarz czasopisma.

Bezpłatny dostęp do wersji elektronicznej czasopisma.

Zespół redakcyjny

Redaktor naczelny - Adam Barczuk

Mikołaj Wiśniewski

Szymon Andrzejewski

Dominik Makowski

Paweł Lewandowski

Rada naukowa

Adam Nowicki (Uniwersytet Warszawski)

Michał Adamczyk (Instytut Stosunków Międzynarodowych)

Peter Cohan (Princeton University)

Mateusz Jabłoński (Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki)

Piotr Michalak (Uniwersytet Warszawski)

Jerzy Czarnecki (Uniwersytet Jagielloński)

Kolub Frennen (University of Tübingen)

Bartosz Wysocki (Instytut Stosunków Międzynarodowych)

Patrick O'Connell (Paris IV Sorbonne)

Maciej Kaczmarczyk (Uniwersytet Warszawski)

#10 (50), 2019 part 3
East European Scientific Journal
(Warsaw, Poland)
The journal is registered and published in Poland. The journal is registered and published in Poland. Articles in all spheres of sciences are published in the journal. Journal is published in **English, German, Polish and Russian.**

Articles are accepted till the 30th day of each month.

Periodicity: 12 issues per year.

Format - A4, color printing

All articles are reviewed

Each author receives one free printed copy of the journal

Free access to the electronic version of journal

Editorial

Editor in chief - Adam Barczuk

Mikołaj Wiśniewski

Szymon Andrzejewski

Dominik Makowski

Paweł Lewandowski

The scientific council

Adam Nowicki (Uniwersytet Warszawski)

Michał Adamczyk (Instytut Stosunków Międzynarodowych)

Peter Cohan (Princeton University)

Mateusz Jabłoński (Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki)

Piotr Michalak (Uniwersytet Warszawski)

Jerzy Czarnecki (Uniwersytet Jagielloński)

Kolub Frennen (University of Tübingen)

Bartosz Wysocki (Instytut Stosunków Międzynarodowych)

Patrick O'Connell (Paris IV Sorbonne)

Maciej Kaczmarczyk (Uniwersytet Warszawski)

**Dawid Kowalik (Politechnika
Krakowska im. Tadeusza Kościuszki)**

**Peter Clarkwood(University College
London)**

**Igor Dzedzic (Polska Akademia
Nauk)**

**Alexander Klimek (Polska Akademia
Nauk)**

**Alexander Rogowski (Uniwersytet
Jagielloński)**

Kehan Schreiner(Hebrew University)

**Bartosz Mazurkiewicz (Politechnika
Krakowska im. Tadeusza Kościuszki)**

**Anthony Maverick(Bar-Ilan
University)**

**Mikołaj Żukowski (Uniwersytet
Warszawski)**

**Mateusz Marszałek (Uniwersytet
Jagielloński)**

**Szymon Matysiak (Polska Akademia
Nauk)**

**Michał Niewiadomski (Instytut
Stosunków Międzynarodowych)**

Redaktor naczelny - Adam Barczuk

**Dawid Kowalik (Politechnika
Krakowska im. Tadeusza Kościuszki)**

**Peter Clarkwood(University College
London)**

**Igor Dzedzic (Polska Akademia
Nauk)**

**Alexander Klimek (Polska Akademia
Nauk)**

**Alexander Rogowski (Uniwersytet
Jagielloński)**

Kehan Schreiner(Hebrew University)

**Bartosz Mazurkiewicz (Politechnika
Krakowska im. Tadeusza Kościuszki)**

**Anthony Maverick(Bar-Ilan
University)**

**Mikołaj Żukowski (Uniwersytet
Warszawski)**

**Mateusz Marszałek (Uniwersytet
Jagielloński)**

**Szymon Matysiak (Polska Akademia
Nauk)**

**Michał Niewiadomski (Instytut
Stosunków Międzynarodowych)**

Editor in chief - Adam Barczuk

1000 kopii.

**Wydrukowano w «Aleje Jerozolimskie
85/21, 02-001 Warszawa, Polska»**

**Wschodnioeuropejskie Czasopismo
Naukowe**

**Aleje Jerozolimskie 85/21, 02-001
Warszawa, Polska**

E-mail: info@eesa-journal.com ,

<http://eesa-journal.com/>

1000 copies.

**Printed in the "Jerozolimskie 85/21, 02-
001 Warsaw, Poland»**

East European Scientific Journal

**Jerozolimskie 85/21, 02-001 Warsaw,
Poland**

E-mail: info@eesa-journal.com ,

<http://eesa-journal.com/>

СОДЕРЖАНИЕ

БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

Нуриева И. А., Топчиева Ш. А., Ахмедов Б. А., Сафарова И. М., Надирова Г. И., Салахова С. З. ВРЕДНАЯ ЭНТОМОФАУНА И КАЧЕСТВЕННЫЙ СОСТАВ КАШТАНА (<i>CASTÁNEA SATÍVA</i>) В АЗЕРБАЙДЖАНЕ.....	4
Герасимович А. Д., Новик Г. И. ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА ФАГОУСТОЙЧИВОСТИ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ <i>LACTOCOCCUS LACTIS</i>	8
Казловский И.С., Бельская И.В., Булатовский А.Б., Зинченко А.И. СИНТЕЗ ДИГУАНИЛАТЦИКЛАЗЫ <i>THERMOTOXA MARÍTIME</i> И ДВУХ ХИМЕРНЫХ БЕЛКОВ, ИСПОЛЬЗУЯ СИСТЕМУ БЕСКЛЕТОЧНОГО СИНТЕЗА БЕЛКА	16
Чайка Н.И., Непран И.В. ВЛИЯНИЕ ОБРАБОТКИ СЕМЯН ТЕТРАМИНОДИФЕНИЛОКСИДОМ НА ИЗМЕНЕНИЕ ЭКОЛОГО- МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ РАСТЕНИЙ	21

МЕДИЦИНСКИЕ НАУКИ

Koszćuk S.A. ZMIANY W GENACH CZYNNIKÓW ZJADLIWOŚCI DROBNOUSTROJÓW W MONO - I MIXT-INFЕКCJACH.....	33
Zavgorodniy S. M., Kubrak M. A., Danilyuk M. B., Rylov A. I. THE QUALITY OF LIFE OF PATIENTS WITH THYROID PATHOLOGY AFTER SIMULTANEOUS AND ISOLATED OPERATIONS	37
Натрус Л. В., Мироненко О.И., Панова Т. I., Лабудзинський Д. О. ОСОБЛИВОСТІ СПОЛУЧНОТКАНИННОГО СИНТЕЗУ NF-κB-ЗАЛЕЖНИХ ПРОТЕЇНІВ У СТАДІЮ РЕМОДЕЛЮВАННЯ ОПІКОВОЇ РАНИ ШКІРИ ЩУРІВ	40
Троянова Е. Н., Аль-Гальбан Л. Н., Поселюгина О. Б. НЕСАХАРНЫЙ ДИАБЕТ. КЛИНИЧЕСКИЙ РАЗБОР	47
Khambir T.S. FEATURES OF THE COURSE AND TREATMENT OF KNEE OSTEOARTHRISIS IN PATIENTS WITH LOW BONE MINERAL DENSITY	50

БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

Nuriyeva Irada Aqaverdi qizi.,
 Doctor of Philosophy in Biology,
 Associate Professor, Senior Scientific
 Center of Applied Zoology, Institute of Zoology of ANAS
Topchiyeva Shafiga Anverovna,
 Doctor of Biological Sciences, Chief Researcher,
 Center for Applied Zoology, Institute of Zoology, ANAS
Akhmedov Barat Abdul oglu
 Doctor of Philosophy in Biology, Associate Professor,
 Head of the Center for Applied Zoology, Institute of Zoology of ANAS
Safarova Ilhama Mudafia qizi,
 Doctor of Philosophy in Biology, Senior Scientific,
 Center of Applied Zoology, Institute of Zoology of ANAS
Nadirova Gulbaniz Inqilab qizi
 Doctor of Philosophy in Biology, Researcher,
 Center for Applied Zoology, Institute of Zoology ANAS
Salakhova Samira Zulfı qizi.,
 SOCAR Department of Ecology,
 Laboratory for Integrated Studies

HARMFUL ENTOMOFAUNA AND QUALITY COMPOSITION OF CHESTNUT (CASTÁNEA SATÍVA) IN AZERBAIJAN

Нуриева Ирада Агаверди кызы,
 доктор философии по биологии, доцент,
 старший научный сотрудник
 Центра Прикладной Зоологии Института Зоологии НАНА
Топчиева Шафига Аниваровна,
 доктор биологических наук, главный научный сотрудник
 Центра Прикладной Зоологии Института Зоологии НАНА
Ахмедов Барат Абдул оглы,
 доктор философии по биологии, доцент, заведующий
 Центра Прикладной Зоологии, Института Зоологии НАНА
Сафарова Ильхама Мудадфия кызы,
 доктор философии по биологии, старший научный сотрудник
 Центра Прикладной Зоологии Института Зоологии НАНА
Надирова Гюльбаниз Ингилаб кызы
 доктор философии по биологии, научный сотрудник
 Центра Прикладной Зоологии Института Зоологии НАНА
Салахова Самира Зульфı кызы,
 доктор философии по биологии,
 Департамент Экологии, лаборатория Комплексных исследований

ВРЕДНАЯ ЭНТОМОФАУНА И КАЧЕСТВЕННЫЙ СОСТАВ КАШТАНА (CASTÁNEA SATÍVA) В АЗЕРБАЙДЖАНЕ

Summary. The article is based on studies conducted in 2017-2019 in Ismayilli, Gabala and Zagatala regions. As a result of the studies, main chestnut pests (*Castánea satıva*) were identified. The main pests of chestnut (*Castánea satıva*) in Azerbaijan are: - *Curculio elephas* (Coleoptera, Curculionidae), chafer beetle larvae (Chafer beetle), chafer, leaf beetle, moth butterflies, thrips, aphids, scale insects, mothworms, mealybugs and some others.

In the studied chestnut samples, Li, Al, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Cd, Ag, Cd, Ba, Tl metal ions were determined. In the collected chestnut samples, the content of Al, Cr, Mn, Fe, Ba ions in the chestnut peel (665.9, 4.58, 624.1, 467.3, 216.1 ppb) is significantly higher in their number than in chestnut fruits (121.1, -1.188, 158.9, 134.7, 24.14 ppb) The content of nickel ions in chestnut fruits (10.28 ppb) is two times higher than in the chestnut shell (5.069 ppb). The content of Co and Cu ions in chestnut fruits exceeds their number in the chestnut peel. Analyzing the results of the obtained experimental studies, it can be stated that infection of chestnut fruits with pests affects both the qualitative and elementary composition and the taste properties of chestnut fruits.

Аннотация. Статья написана на основе исследований, проведенных в 2017-2019 годах на территории Исмаиллинского, Габалинского и Закатальского районов. В результате исследований выявлены основные

вредители каштана (*Castanea sativa*). Основными вредителями каштана (*Castanea sativa*) в Азербайджане являются: – *Curculio elephas* (Coleoptera, Curculionidae), личинки майского жука (майский хрущ), хрущи, листоеды, бабочки пяденицы, трипсы, тли, щитовки, ложнощитовки, мучнистые червецы и некоторые другие.

В исследуемых образцах каштана определены ионы металлов Li, Al, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Cd, Ag, Ba, Tl. В собранных образцах каштана содержание ионов Al, Cr, Mn, Fe, Ba в кожуре каштана (665.9, 4.58, 624.1, 467.3, 216.1 ppb) значительно превышает по количеству их в плодах каштана (121.1, 1.188, 158.9, 134.7, 24.14 ppb). Содержание ионов никеля в плодах каштана (10.28 ppb) в два раза выше, чем в скорлупе каштана (5.069 ppb). Содержание ионов Co и Cu в плодах каштана превышает по количеству их в кожуре каштана. Анализируя результаты полученных экспериментальных исследований можно констатировать, что заражение плодов каштана насекомыми-вредителями влияет как на качественный и элементарный состав, так и на вкусовые свойства плодов каштана.

Key words. *Castanea sativa*, insects – pests, entomofauna, heavy metals, mass spectrometry

Ключевые слова: *Castanea sativa*, насекомые- вредители, энтомофауна, тяжелые металлы, масс-спектрометрия

ВВЕДЕНИЕ

Каштан (*Castanea sativa*) распространен на Кавказе, в Закавказье, Закарпатской области Украины. Каштан растет на обширной территории Азербайджана только в лесах гор Большого Кавказа. Габала, Шеки-Загаталаский районы республики известны своими каштановыми садами. В 2017 году тысячи деревьев были посажены

Каштан содержит до 60% крахмала, 15% сахара, 6% белка и 2% жира. В незрелых плодах содержится 1500 мг% витамина С и 0,18 мг% витамина В₁.

Каштан содержит 7,9% сульфогидратов, 5,8% белка и 3,0% жира. 60-65% сульфогидратов содержится в крахмале и 15-18% в сахаре. 30-40 мг% витамина С также содержится в свежих каштановых фруктах. Особенно высоко их содержание в незрелых плодах (1500 мг%). Плоды каштана и кожура являются хорошими источниками сырья для аскорбиновой кислоты. Плоды этого растения также богаты витаминами В, В₁ (0,26 мг%), В₂ (0,22 мг%), А и С. Плоды содержат 0,2-0,4 мг% никеля, 0,1 мг% меди, 1 мг% кальция и другие примеси. Содержание железа составляет 0,82-0,95 мг, что в 2-3 раза превышает содержание яблок, груш и слив. Кроме того, плоды каштана отличаются по своей калорийности от других сельскохозяйственных растений.

Каштан, очень устойчивая к разного вида болезням и вредителям, но и это дерево не может полностью им противостоять, особенно в годы массового поражения рядом находящихся садовых культур. Несмотря на то, что каштан относится к числу наиболее устойчивых пород, существует целый ряд вредителей, сокращающих срок жизни растения и ухудшающих его декоративные качества.

Всего известно примерно 30 видах различных насекомых и клещей, паразитирующих на каштане, большинство из которых можно встретить в регионах нашей страны. Вредители могут поражать все части растения: листья, корни, кору и древесину. К тому же почти все вредители каштанов нередко встречаются и на других растениях.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Исследования были проведены в 2017-2019 годах на каштане в дворовых участках и садах Исмаиллинского (40° 52' 71" N, 48° 04' 17" E), Габалинского (40° 54' 21" N, 47° 57' 28" E) и Закатальского (41° 28' 30" N, 46° 29' 5" E) районов. Сбор сведений о вредителях получали в результате систематических обследований плодовых культур, используя общепринятые методы: маршрутные обследования, визуальный учёт, стряхивание, кошение сачком, использование ловчих поясов, а также лабораторный анализ проб различных биологических единиц с растений –цветков, листьев и плодов [1,2].

Маршрутные обследования проводились в целях определения общего характера заселения деревьев каштана вредителями и выявления очагов видов, которым свойственно локальное распространение. Для них установлены следующие сроки: период распускания почек (фенофаза зеленого конуса); фенофаза обособления бутонов - при этом и предыдущем обследовании выявляют листогрызущих гусениц; сразу после цветения - уточняют заселение дерева листогрызущими и листоминирующими видами чешуекрылых; через месяц после цветения — выявляли наличие плодоярков. Осенью после листопада- определяли заселение сада комплексом вредителей по зимующим стадиям; учитывали наличие и численность яйцекладок, зимующих гусениц. При маршрутном обследовании осматривают произвольно выбранные деревья по диагонали участка, расположенные примерно на одинаковом расстоянии одно от другого [3].

Определение ионов металлов проводили методом масс-спектрометрии на масс-спектрометре с индуктивно связанной плазмой - Agilent 7500 ICP-MS (Метод EPA 6020 В "INDUCTIVELY COUPLED PLASMA - MASS SPECTROMETRY"). Предварительно исследуемые опытные образцы проб обрабатывали в печи DG-EN-10 при температуре 1800 С в течение 10 минут, далее при температуре 2000С в продолжении 20 минут. Полученные образцы проб в количестве 0,2-0,25 г обрабатывали 10 мл HNO₃ (65%) suprapur, 1 мл 1% HCl, 1 мл 30% H₂O₂.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Особую обеспокоенность специалистов вызывает долгоносик каштановый или плодожил каштановый – *Curculio elephas* (Coleoptera, Curculionidae). Взрослые особи - желтоватый серый или красноватый серого цвета, длиной 6-10.5 миллиметров. Надкрылья продольно полосатые. Хоботок самки такой же длины, что и тело, у самцов примерно наполовину короче. Голова коричневого цвета. Ноги отсутствуют. В начале августа, взрослые жуки появляются на поверхности. Массовый вылет жуков продолжается от середины августа до середины сентября. Через 7-10 дней после оплодотворения самки откладывают яйца. Самка откладывает от 20 до 50 яиц. Яйца 0,5 x 0,3 мм. белые, овальные. Самки откладывают одно яйцо на молодых плодах каштана. Личинки появляются из яиц через 5-8 дней. В одном плоде может развиваться 1-2 личинка. Развитие личинок продолжается 30-40 дней. Личинки белого цвета, 7-12 миллиметров длиной и безногие. Проходят 4 стадии развития. Беловатые личинки в четвёртой возрастной стадии длиной от 12 до 15 мм. Спелые плоды осенью опадают, личинки последнего возраста прогрызают в околоплоднике отверстие диаметром около 5 мм, покидают плоды, попадают на землю и зарываются. Личинки зимуют в коконе на глубине от 15 до 60 сантиметров, и примерно в июне следующего года окукливаются. Куколка свободная, вначале её окраска беловатая, но позже она приобретает тёмную окраску.

Большинство личинок окукливаются после первой зимы, в 25 до 40% случаях окукливание занимает от двух до четырёх лет. Поэтому просчитать динамику популяции затруднительно.

Вредители корней каштана – личинки майского жука (майский хрущ), а взрослые особи жука объедают листья деревьев. Личинки жука причиняют еще больше вреда. Обладая достаточно мощной челюстью, насекомые могут перегрызать достаточно толстые корни. Они подгрызают корни растений, что может привести к угнетению молодых деревьев и даже к их гибели. Созревание личинок происходит в земле на глубине 50-60 см в течение 4-х лет. Летные годы хруща четко повторяются в соответствии с его генерацией через 3-5 лет. Жуки объедают листья деревьев,

значительно ослабляя насаждения. Снижается их рост, урожайность, морозостойкость и устойчивость к болезням.

Большую опасность представляют также вредители, которые питаются листьями каштана. Это хрущи, листоеды, бабочки пяденицы, *Hyphantria cunea* Drury, 1773 (Lepidoptera, Erebidae), *Euproctis chrysorrhoea* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera, Erebidae), *Lymantria dispar* Linnaeus, 1758 и некоторые другие. Большинство из них скелетируют листья, не трогая жилок. Пораженные деревья входят в зиму ослабленными, что нередко приводит к их гибели [4].

Отдельную группу составляют сосущие вредители каштана. К ним относятся трипсы, тли, щитовки, ложнощитовки, мучнистые червецы и др.

Forficula auricularia (Dermaptera, Forficulidae) встречается на каштане, питается различными частями растений, поедает мякоть плодов. Она часто скрывается в основание плода и оставляет на нём экскременты.

С увеличением количества пестицидов и широким их применением и зачастую нецелесообразным применением, оказывается неблагоприятное воздействие на окружающую среду, некоторые вредители приобретают резистентность к препаратам, а многие полезные насекомые погибают. Против вредителей каштана эффективно двух-трёхкратное применение системных инсектицидов : Актара, Кинмикс, Калипсо, Карате.

Системные инсектициды, это препараты способные накапливаться в тканях растения. Действующие вещества данных пестицидов способны влиять на ряд физиологических и биохимических процессов в растении, что позволяет изменить состав клеточного сока и сделать данные культуры непригодными для поедания вредителями. Количество металлов, попадает таким путем в растение, является значительной. Отдельные пестициды содержат в своем составе ртуть, цинк, медь, железо.

Для определения ионов металлов методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой были взяты обработанные образцы каштана в количестве $m=0.2318g$, образцы скорлупы каштана массой $m=0.2506g$

Таблица 1.

ДАННЫЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ С ИНДУКТИВНО-СВЯЗАННОЙ ПЛАЗМОЙ В ИССЛЕДУЕМЫХ ПЛОДАХ КАШТАНА

Образцы	Ионы металлов в ppb															
	Li/ 7	Al /27	V/ 51	Cr /53	Mn /55	Fe /56	Co /59	Ni /60	Cu /63	Zn /66	As /75	Ag/ 107	Cd/ 111	Ba/ 137	Tl/ 205	Pb/ 208
каштан	- 4.9 39	12 1.1	- 3.5 48	- 1.1 88	15 8.9	13 4.7	- 3.9 97	10. 28	21. 63	22. 24	- 2.1 36	- 20. 74	2.2 12	24. 14	5.5 01	7.2 72
Скорлупа каштана	- 4.7 49	66 5.9	- 2.5 84	4.5 8	62 4.1	46 7.3	- 2.7 67	5.0 69	19. 63	27. 6	- 2.0 84	- 24. 9	2.2 53	216 .1	6.0 58	7.9 33

Нами, в результате экспериментальных исследований в зараженных насекомыми-вредителями плодах каштана определены содержание следующих ионов металлов: Li (-4.939), Al (121.1), V (-3.548), Cr (-1.188), Mn (158.9), Fe (134.7), Co (-3.997), Ni (10.28), Cu (21.63), Zn (22.24), As (-2.136), Ag (-20.74) Cd (2.212), Ba (24.14), Tl (5.501), Pb (7.272), ppb. Однако, в образцах скорлупы каштана, определенные концентрации ионов металлов соответствовали: Li (-4.749), Al (665.9), V (-2.584), Cr (4.58), Mn (624.1), Fe (467.3), Co (-2.767), Ni (5.069), Cu (19.63), Zn

(27.6), As (-2.084), Ag (-24.9), Cd (2.253), Ba (216.1), Tl (6.058), Pb (7.933) ppb.

Как видно из рисунка 1 содержание ионов лития в скорлупе каштана и в плодах незначительно отличаются. Однако содержание ионов Al, Cr, Mn, Fe, Ba в скорлупе каштана (665.9, 4.58, 624.1, 467.3, 216.1 ppb) значительно превышают по количеству их в плодах каштана (121.1, -1.188, 158.9, 134.7, 24.14 ppb). Содержание ионов никеля в плодах каштана (10.28 ppb) в два раза выше, чем в скорлупе каштана (5.069 ppb). Содержание ионов Co и Cu в плодах каштана превышает по количеству их в скорлупе каштана.

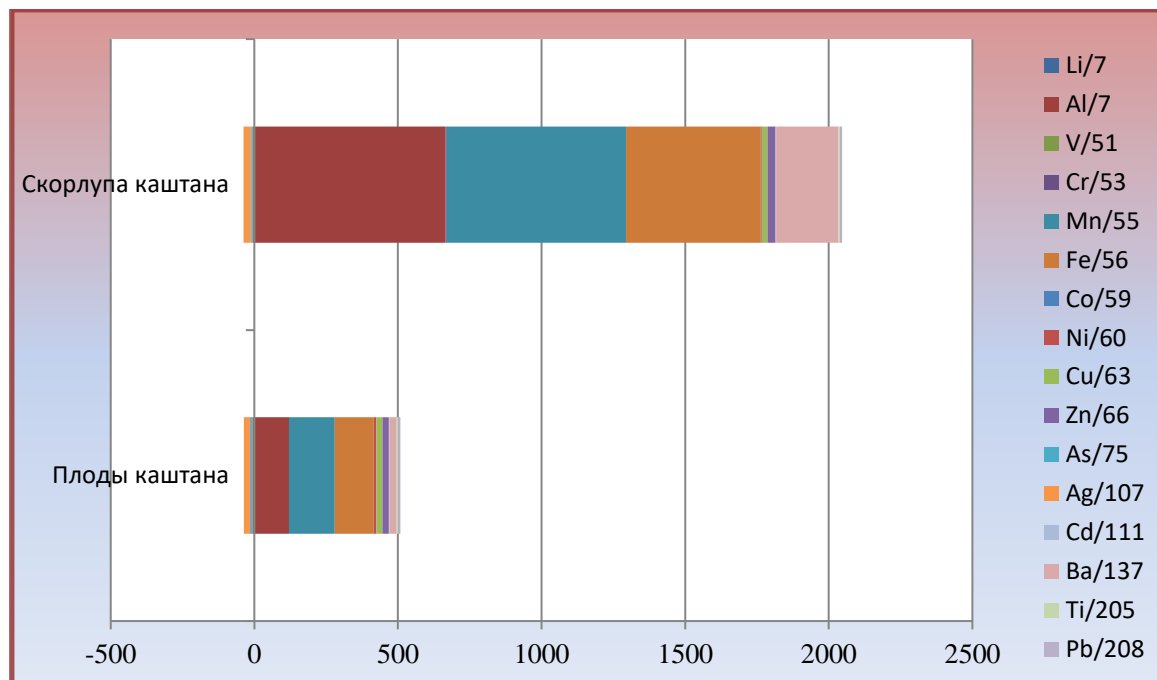


Рис.1 Данные содержания ионов металлов в плодах каштана методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой
1-плоды каштана, 2-скорлупа каштана

Анализируя результаты полученных экспериментальных исследований можно констатировать, что в плодах каштана и скорлупе определены ионы следующих металлов Li, Al, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Ag, Cd, Ba, Tl, Pb. Мы предполагаем, что заражение плодов каштана насекомыми-вредителями влияет как на качественный и элементарный состав, так и на вкусовые свойства плодов каштана.

Выводы

1. Основными вредителями каштана (*Castanea sativa*) в Азербайджане являются: – *Curculio elephas* (Coleoptera, Curculionidae), личинки майского жука (майский хрущ), хрущи, листоеды, бабочки пяденицы, трипсы, тли, щитовки, ложнощитовки, мучнистые червецы и некоторые другие.

2. В результате экспериментальных исследований, в зараженных насекомыми-вредителями плодах каштана, определены содержание следующих ионов металлов: Li (-4.939), Al (121.1), V (-3.548), Cr (-1.188), Mn (158.9),

Fe (134.7), Co (-3.997), Ni (10.28), Cu (21.63), Zn (22.24), As (-2.136), Ag (-20.74) Cd (2.212), Ba (24.14), Tl (5.501), Pb (7.272), ppb.

3. В образцах скорлупы каштана, выявленные концентрации ионов металлов соответствовали: Li (-4.749), Al (665.9), V (-2.584), Cr (4.58), Mn (624.1), Fe (467.3), Co (-2.767), Ni (5.069), Cu (19.63), Zn (27.6), As (-2.084), Ag (-24.9), Cd (2.253), Ba (216.1), Tl (6.058), Pb (7.933) ppb.

4. Выявленные ионы металлов Al, Cr, Mn, Fe, Ba в скорлупе каштана (665.9, 4.58, 624.1, 467.3, 216.1 ppb) значительно превышают по количеству их в плодах каштана (121.1, -1.188, 158.9, 134.7, 24.14 ppb). Содержание ионов никеля в плодах каштана (10.28 ppb) в два раза выше, чем в скорлупе каштана (5.069 ppb). Содержание ионов Co и Cu в плодах каштана превышает по количеству их в скорлупе каштана.

ЛИТЕРАТУРА

1. Олейник, К.Н. Оптимизация мониторинга мелких членистоногих садовых агроценозов / К.Н. Олейник // Агро XXI. - 1998. - № 10. - С. 16-17.
2. Гричанов, И.Я., Овсянникова, Е.И. Феромоны для фитосанитарного мониторинга

вредных чешуекрылых /СПб: Всерос. ин-т защиты растений, 2005. - 244 с.

3. Васильев, В.П. Вредители плодовых культур / В.П. Васильев, И.З. Лившиц. - М.: Колос, 1984. - 399 с

4. <http://plantprotection.ru/raznoe/vrediteli-kashtana>

Herasimovich A.D.

Magister of Biol. sci., junior researcher

Institute of Microbiology Belarus National Academy of Sciences,

Novik G.I.

Candidate of Biol. Sci., head of laboratory

Institute of Microbiology Belarus National Academy of Sciences,

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PHAGE RESISTANCE OF LACTIC ACID BACTERIA *LACTOCOCCUS LACTIS*

Герасимович Александра Демьяновна

Магистр биологических наук, младший научный сотрудник

Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси

Новик Галина Ивановна

Кандидат биологических наук, заведующий лабораторией

Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА ФАГОУСТОЙЧИВОСТИ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ *LACTOCOCCUS LACTIS*

Summary. 12 strains of lactic acid bacteria were isolated from natural sources. Cultures were identified using classical microbiological and molecular-genetic (sequencing, based on analysis of nucleotide sequences of 16SrRNA genes) methods. Five cultures identified as *Lactococcus lactis* were selected, and the phage resistance of these strains was studied. It was found that all these strains are sensitive to the *Lactococcus lactis* specific bacteriophages. The *Lactococcus lactis* БИМ В-1366 strain is characterized by the highest phage resistance among isolated bacteriophage-sensitive lactococci, whereas *Lactococcus lactis* БИМ В-1365 is sensitive to the widest range of studied lactophages and can be used as an indicator culture for the detection of bacteriophages in the environment.

Аннотация. Из природных источников выделено 12 штаммов молочнокислых бактерий. Культуры идентифицированы с помощью классических микробиологических и молекулярно-генетических (секвенирование и анализ нуклеотидных последовательностей генов 16SrRNA) методов. Отобрано 5 культур, идентифицированных как *Lactococcus lactis*, изучена фагоустойчивость данных штаммов. Установлено, что все штаммы данного вида обладают чувствительностью к бактериофагам, активным в отношении бактерий *Lactococcus lactis*. Культура *Lactococcus lactis* БИМ В-1366 характеризуется наибольшей фагоустойчивостью среди выделенных чувствительных к бактериофагам культур лактококков. Штамм *Lactococcus lactis* БИМ В-1365 обладает чувствительностью к наиболее широкому спектру исследуемых лактофагов и может быть использован в качестве индикаторной культуры для обнаружения бактериофагов в окружающей среде.

Key words: *Lactic acid bacteria, Lactococcus lactis, molecular-genetic identification, bacteriophages, phage typing, phage resistance.*

Ключевые слова: *Молочнокислые бактерии, Lactococcus lactis, молекулярно-генетическая идентификация, бактериофаги, фаготипирование, фагоустойчивость.*

Введение. Молочнокислые бактерии представляют собой одну из наиболее распространенных в природе групп микроорганизмов, которые сбраживают углеводы с образованием молочной кислоты, и благодаря этому широко используются в процессе ферментации таких продуктов, как мясо, овощи, фрукты и молоко, а также при хлебопечении и в виноделии [1].

Штаммы бактерий *Lactococcus lactis* являются основным компонентом заквасок, используемых в

молочной промышленности, участвуя в процессах формирования аромата, цвета и консистенции ферментированных продуктов. Кроме того, в результате молочнокислого брожения происходит снижение pH, что тормозит развитие патогенных микроорганизмов и способствует длительному хранению конечного продукта. Однако бактериальные закваски, применяемые на молокоперерабатывающих предприятиях, являются благоприятной средой для развития вирулентных бактериофагов. В результате фаговой

инфекции происходит торможение или полное прекращение процесса ферментации молочного сырья, что приводит к снижению качества кисломолочных продуктов [2].

В настоящее время, с целью контроля фаговой инфекции на предприятиях молочной промышленности, выделено и охарактеризовано большое количество вирулентных и умеренных лактофагов, обитающих в окружающей среде [3,4,5,6]. Тем не менее, высокая генетическая изменчивость бактериофагов, их способность при репродукции «захватывать» часть генома клетки-хозяина и наличие определенного мутагенного фона приводят к накоплению на производстве высоковирулентных штаммов фагов с широким спектром литического действия. Вследствие этого, заквасочные культуры, характеризовавшиеся устойчивостью к определенному набору фагов с течением времени становятся чувствительными к данным вирусам. В связи с этим, ведется непрерывная работа по обновлению и расширению коллекции молочнокислых бактерий, устойчивых к бактериофаговой инфекции. При создании таких коллекций необходимо, чтобы отобранные штаммы были чувствительны к наименьшему числу фагов из разных литических групп и принадлежали к различным группам штаммов, чувствительным к одним и тем же бактериофагам [7]. Для получения и оценки фагоустойчивости культур требуется использование набора фагов разных литических групп с определенными свойствами. С целью обнаружения таких лактофагов создаются коллекции индикаторных культур лактококков, чувствительных к широкому спектру бактериофагов. В целом, выделение и идентификация фагочувствительных культур бактерий *Lactococcus lactis* способствует обнаружению новых штаммов бактериофагов на предприятиях молочной промышленности, а также в окружающей среде, что позволяет изучать механизмы взаимодействия и устойчивости бактерий к фаговой инфекции и, как следствие, совершенствовать методы борьбы с ними.

В связи с этим **целью исследования** явилось выделение молочнокислых бактерий из различных природных источников, определение видовой принадлежности полученных культур классическими микробиологическими и молекулярно-генетическими методами, а также изучение фагоустойчивости бактерий, идентифицированных как *Lactococcus lactis*.

Объектами исследования являлись 12 штаммов молочнокислых бактерий, выделенных из пищевых продуктов домашнего производства. Бактериальные культуры выращивали при 30 °С в течение 24 ч в жидкой и агаризованной среде МРС (Conda).

Материалы и методы. Для выделения бактерий 5 г исследуемого материала, измельчали и смешивали со стерильным физиологическим раствором, после чего делали ряд десятикратных разведений. Бактериальную суспензию (100 мкл) из

разведений $10^{-3} - 10^{-7}$ высевали на агаризованную питательную среду МРС и культивировали при 30°С в течение 24 – 48 ч. Изолированные колонии рассеивали до получения монокультур (не менее трех пассажей). Чистоту культуры контролировали визуально и микроскопически.

Морфологию клеток изучали методом световой микроскопии препаратов, окрашенных по методу Грама [8], используя микроскоп Nikon Eclipse (Nikon), при увеличении 1×1000 . Продукцию каталазы, исследовали по общепринятой методике [8]. Для определения продукции оксидазы и пирролидонилариламидазы использовали наборы OXItest и PYRAtest (Erba Lachema) согласно прилагаемой инструкции. Способность к ферментации различных углеводов и спиртов исследовали с помощью наборов Anaero-test и Encoccus-test (Erba Lachema) в соответствии с инструкцией производителя.

При фаготипировании бактерий 0,5 мл исследуемой бактериальной культуры, находящейся в логарифмической стадии роста добавляли к 3 мл 0,6% мягкого агара, аккуратно перемешивали и выливали в чашку с плотной питательной средой. Чашки подсушивали и наносили по 5 мкл исследуемого бактериофага, предварительно сделав прокол верхнего слоя агара. Культуры инкубировали в термостате при 30°С в течение суток. Бактериофаги добавляли в критическом тест-разведении, т. е. в наибольшем разведении, при котором наблюдался сплошной лизис бактерии-хозяина [9]. В исследовании использовали 13 штаммов бактериофагов из фонда Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов: *Lactococcus phage* БИМ BV-33, BV-36, BV-37, BV-40, BV-41, BV-42, BV-43 (бактерия-хозяин *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* БИМ В-424), BV-34, BV-35, BV-38, BV-39 (бактерия-хозяин *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* БИМ В-425), BV-77 (бактерия-хозяин *Lactococcus lactis* БИМ В-1024), BV-78, (бактерия-хозяин *Lactococcus lactis* БИМ В-1029); а также 5 штаммов бактериофагов, выделенных нами из природных источников – Lc-1 (БИМ BV-95), Lc-2, Lc-3, Lc-4 (БИМ BV-96), Lc-5 (бактерия-хозяин *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* БИМ В-493).

Хромосомную ДНК культур выделяли с помощью коммерческого набора Bacteria DNA Preparation Kit (Jena Bioscience) согласно прилагаемой инструкции. Для амплификации нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК использовали универсальные зубактериальные праймеры 8f (5'-agagtttgatcctggctcag-3') и 1492r (5'-ggttacctgttagcactt-3'). Температурно-временной профиль составлял 95°С – 5 мин (1 цикл); 95°С – 20 сек, 55°С – 20 сек, 72°С – 90 сек (30 циклов); 72°С – 5 мин (1 цикл). Продукты ПЦР анализировали методом электрофореза в 1 % агарозном геле с использованием 1X ТАЕ-буфера при напряженности электрического поля – 5 В/см. Визуализацию ДНК осуществляли с помощью окрашивания раствором бромистого этидия (0,05

мкг/мл). В качестве стандартов для определения размера продуктов ПЦР применяли маркер молекулярной массы фрагментов Gene Ruler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific). Для очистки амплифицированных фрагментов гена 16S рПНК использовали коммерческий набор PCR Purification Kit (Jena Bioscience).

Реакцию секвенирования ПЦР-фрагментов гена 16S рПНК проводили на автоматическом секвенаторе AE3000 с использованием набора реагентов для секвенирования DNA Cycle Sequencing Kit (Jena Bioscience) согласно прилагаемой инструкции. Разделение и анализ продуктов секвенирования осуществляли с помощью анализатора Li-COR 4300 DNA Analyzer (США). Компьютерную обработку результатов секвенирования и редактирование последовательностей осуществляли с помощью программы eSeq. Сравнительный анализ гомологии секвенированной нуклеотидной последовательности гена 16S рПНК и референтных последовательностей проводили on-line с использованием баз данных GenBank и Ribosomal Database Project (RDP).

При оценке степени чувствительности бактерий *Lactococcus lactis* к фаговой инфекции была изучена эффективность бляшкообразования (ЕОР) и определен процент адсорбированных частиц бактериальных вирусов. Исследуемые бактерии, находящиеся в логарифмической стадии роста заражали соответствующим бактериофагом и определяли количество бляшкообразующих единиц (БОЕ/мл) методом агаровых слоев (метод Грация) [10,11]. Контролем служили титры фагов, лизировавших бактерию-хозяина. Показатель ЕОР рассчитывали путем отношения количества бляшкообразующих единиц на газоне исследуемой культуры к количеству БОЕ фага на газоне бактерии-хозяина [12]. Фаговую адсорбцию определяли путем смешивания экспоненциально растущих культур бактерий с суспензиями фагов при множественности инфекции 0,01-0,001. После 10 мин инкубации при 30 °С образцы центрифугировали и определяли титр фагов супернатанта на газоне бактерии-хозяина методом агаровых слоев. Процент адсорбции определяли следующим образом:

$$\left(1 - \left(\frac{\text{Титр фагов после адсорбции}}{\text{Титр лизата без клеток}}\right)\right) \times 100 [13].$$

Эксперименты проводили в трехкратной повторности. Статистический анализ результатов

осуществляли, используя пакет программ Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение.

Физиолого-биохимические свойства. Из образцов молока и кисломолочных продуктов домашнего производства, а также квашеных овощей выделено 12 штаммов, предположительно относящихся к группе молочнокислых бактерий: из квашеной капусты выделено 2 изолята (КБ, К95); из соленых огурцов – изолят О2; из творога домашнего – 3 изолята (ТТ1, ТТ2, Т2-2); из молока – 2 изолята (ММ3, МБ); из сливок – изолят СП; из молочной сыворотки – изолят ЕИ1; из сыра адыгейского – 2 изолята (СА1, СА2). Установлено, что одиннадцать культур являлись грамположительными, каталазо- и оксидазоотрицательными кокками, клетки которых располагаются одиночно, попарно, либо в коротких цепочках, что характерно для представителей группы молочнокислых бактерий. Изолят О2 представлял собой грамположительные каталазо- и оксидазоотрицательные палочки, располагающиеся одиночно или в группах, что свидетельствует о наиболее вероятной принадлежности бактерий к роду *Lactobacillus*. На поверхности твердой среды бактерии образовывали мелкие (1-2 мм), круглые, выпуклые, блестящие колонии с ровным краем, гладкой поверхностью, белого или кремово-белого цвета.

Исследование диапазона температур роста выделенных культур показало, что оптимум роста бактерий составляет 30°C – 37 °С. При этом, семь культур способны расти при 10 °С, девять культур – при 40 °С. При культивировании бактерий при 45 °С наблюдался рост штаммов МБ, КБ и К95. Установлено, что семь изолятов способны расти в кислой среде при рН 4,5, а 3 штамма в щелочной среде – при рН 9,6. Способность бактерий к росту в присутствии 4% NaCl выявлена у всех анализируемых культур, кроме изолята ММ3; тогда, как изоляты МБ, КБ и К95 способны расти при 6,5% NaCl (табл 1).

На основании отсутствия способности расти при 45 °С и добавления в среду 6,5% NaCl к родам *Lactococcus*, *Pediococcus* и *Leuconostoc* отнесено 8 исследуемых изолятов (СП, ТТ1, ТТ2, ЕИ1, Т2-2, СА1, СА2, ММ3). Штаммы МБ, КБ и К95 характеризовались наличием пирролидонилариламидазной активности, а также были способны расти при 45 °С и в присутствии 6,5% NaCl, что позволило отнести данные бактерии к роду *Enterococcus*.

РОСТ ИЗОЛЯТОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ ПРИ РАЗНЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ, ЗНАЧЕНИЯХ pH И КОНЦЕНТРАЦИЯХ NaCl

Изолят	Температура, °C					Значение pH среды		Концентрация NaCl, %	
	10 °C	30 °C	37 °C	40 °C	45 °C	pH 4,5	pH 9,6	4% NaCl	6,5% NaCl
СП	+	+	+	+/-	-	+	-	+	-
МБ	-	+	+	+	+	-	+	+	+
КБ	-	+	+	+	+	-	+	+	+
К95	-	+	+	+	+	-	+	+	+
ТТ1	+	+	+	+	-	-	-	+	-
ТТ2	-	+	+	+/-	-	+	-	+	-
О2	-	+	+	+	-	+	-	+	-
ЕИ1	+	+	+	+	-	+	-	+	-
Т2-2	+	+	+	-	-	+/-	-	+	-
СА1	+	+	+	+	-	+	-	+	-
СА2	+	+	+	-	-	+	-	+	-
ММ3	+	+	+/-	-	-	-	-	-	-

Условные обозначения: «+» – наличие роста; «-» – отсутствие роста; «+/-» – слабый рост

При исследовании способности выделенных культур к ферментации углеводов и спиртов установлено, что все изоляты сбраживали глюкозу, сахарозу, трегалозу, лактозу, маннозу, галактозу, фруктозу, салицин и мальтозу. Максимальным спектром ферментативной активности обладал изолят О2. Способность к сбраживанию аргинина и маннозы и неспособность ферментировать сорбитол, раффинозу и мелибиозу является типичным свойством для представителей рода *Lactococcus*, в то время как отсутствие способности сбраживать аргинин характерно для представителей рода *Leuconostoc*. Полученные данные позволили отнести культуры СА1, СА2, ТТ1, ТТ2, ЕИ1 и Т2-2 к роду *Lactococcus*, а изоляты СП и ММ3 - к роду *Leuconostoc* (табл 2). Необходимо отметить, что особенностью бактерий *Enterococcus* является существование групп видов

в пределах данного рода. Члены таких групп проявляют сходные фенотипические характеристики, что затрудняет осуществление видовой идентификации [14]. На основании физиолого-биохимических признаков изоляты МБ, КБ и К95 отнесены к группе видов *Enterococcus faecium*, которая включает в себя такие виды, как *Enterococcus durans*, *Enterococcus canis*, *Enterococcus hiraе*, *Enterococcus mundtii*, *Enterococcus ratti* и *Enterococcus villorum*. Наиболее вероятным является принадлежность данных изолятов к видам *Enterococcus durans*, *Enterococcus hiraе* или *Enterococcus faecium*. В связи с этим, на следующих этапах наших исследований для установления точной видовой принадлежности штаммов использовали фаготипирование и молекулярно-генетические методы идентификации.

**СПЕКТР УГЛЕВОДОВ И СПИРТОВ, ФЕРМЕНТИРУЕМЫХ ИЗОЛЯТАМИ
МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ**

Углевод/спирт	Изоляты											
	СП	МБ	КБ	O2	ТТ1	ТТ2	ЕИ1	T2-2	K95	CA1	CA2	ММ3
Глюкоза	+*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Лактоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Маннитол	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Раффиноза	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	+
Арабиноза	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+
Фруктоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Мальтоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Мелибиоза	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Сахароза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Трегалоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ксилоза	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
Рамноза	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
Мелецитоза	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+/-
Сорбитол	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
Целлобиоза	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Аргинин	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Сорбоза	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Манноза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Галактоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Салицин	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

*Условные обозначения: «+» – положительная реакция; «-» – отрицательная реакция; «+/-» – слабо-положительная реакция

Фаготипирование. Бактериофаги используются в целом ряде различных методик определения и дифференциации бактериальных штаммов, поскольку рецепторы клеточных стенок, которые могут значительно различаться по химической структуре у разных видов и штаммов являются ключевыми факторами, определяющими специфическое взаимодействие фагов с бактериями-хозяевами [15, 16]. Фаготипирование является одним из первых методов практического применения бактериальных вирусов, где набор фагов используется для того, чтобы по их способности лизировать исследуемые культуры и образовывать на поверхности бактериального газона негативные колонии, различать роды и виды (а также штаммы одного вида) бактерий. Благодаря простоте применения данный метод в настоящее время остается в числе самых широко используемых способов дифференциации многих бактерий [17]. Результаты фаготипирования выделенных культур показали, что изоляты СП, МБ, КБ, K95, CA2 и ММ3 являются устойчивыми к воздействию всех используемых лактофагов. Культуры CA1, T2-2, ТТ1 и ТТ2 были чувствительны к бактериофагам *Lactococcus lactis subsp. lactis* БИМ В-425. Штамм ЕИ1 проявлял чувствительность к фагам, активным в отношении штаммов бактерий *Lactococcus lactis subsp. lactis* БИМ В-425, *Lactococcus lactis subsp. lactis* БИМ В-493 и *Lactococcus lactis subsp. cremoris* БИМ В-424. Полученные данные позволили отнести 5 культур

(CA1, T2-2, ТТ1, ТТ2, ЕИ1) к виду *Lactococcus lactis*.

На основании изучения морфологических, культуральных и физиолого-биохимических свойств выделенных культур молочнокислых бактерий в соответствии с определителем Bergey, а также в результате фаготипирования бактерий, 3 изолята отнесены к роду *Enterococcus* (МБ, КБ и K95 – *Enterococcus sp.*), изолят O2 – к роду *Lactobacillus* (*Lactobacillus plantarum*), 6 изолятов – к роду *Lactococcus* (CA2 – *Lactococcus sp.*; CA1, ЕИ1, T2-2, ТТ1, ТТ2, – *Lactococcus lactis*), 2 изолята – к роду *Leuconostoc* (ММ3 – *Leuconostoc citreum*, СП – *Leuconostoc mesenteroides*).

Молекулярно-генетическая идентификация. Идентификация бактериальных культур только на основании морфологических и физиолого-биохимических признаков в настоящее время является недостаточной, так как многие виды молочнокислых бактерий обладают высоким уровнем фенотипической изменчивости под воздействием различных факторов [18]. Кроме того, штаммы одного и того же вида, выделенные из различных источников могут обладать различными биохимическими характеристиками. В связи с этим, для подтверждения родовой и видовой принадлежности изолятов, проведен анализ нуклеотидной последовательности генов 16S рРНК 12 исследуемых культур. В результате амплификации с универсальными эубактериальными праймерами 8f и 1492g на матрице геномной ДНК штаммов получены ПЦР-

продукты размером ~1500 п.н., что соответствует полной нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК. С помощью секвенирования определены нуклеотидные последовательности амплифицированных фрагментов генов 16S рРНК бактерий, проведен их сравнительный анализ с референтными нуклеотидными последовательностями из баз данных GenBank и Ribosomal Database Project (RDP). Установлен высокий (99–99,9%) уровень гомологии нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК с референтными последовательностями штаммов соответствующих видов. Исследуемые культуры отнесены к царству *Bacteria*, отделу *Firmicutes*, классу *Bacilli*, порядку *Lactobacillales*; семействам *Lactobacillaceae*, *Streptococcaceae*, *Enterococcaceae*

и *Leuconostocaceae*; родам *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, а также *Leuconostoc*. По результатам проведенного анализа секвенсов переменных участков генов, кодирующих 16S рРНК, подтверждена принадлежность 6 штаммов к видам, идентифицированным на основании морфологических и физиолого-биохимических методов. Культура *Lactobacillus plantarum* (O2) реидентифицирована как *Lactobacillus paraplantarum*, а *Leuconostoc citreum* (MM3) – как *Lactococcus raffinolactis*. Штамм *Lactococcus* sp. (CA2) отнесен к виду *Lactococcus chungangensis*, а штамм *Enterococcus* sp. (K95) – к виду *Enterococcus durans*. Полученные данные представлены в таблице 3.

Таблица 3

РЕЗУЛЬТАТЫ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КУЛЬТУР

Изолят	Сходство с референтными последовательностями (по GenBank)	Сходство с референтными последовательностями (по Ribosomal Database Project (RDP))	Результаты секвенирования	Регистрационный номер в коллекции (БИМ)
СП	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (99,01%)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (99,1%)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	БИМ В-1399
МБ	<i>Enterococcus faecium</i> (99,52%)	<i>Enterococcus durans</i> (99,7%) <i>Enterococcus hirae</i> (99,7%) <i>Enterococcus ratti</i> (99,7%)	<i>Enterococcus</i> sp.	БИМ В-1397
КБ	<i>Enterococcus durans</i> (99,67%)	<i>Enterococcus durans</i> (99,3%) <i>Enterococcus hirae</i> (99,3%) <i>Enterococcus ratti</i> (99,3%)	<i>Enterococcus</i> sp.	БИМ В-1396
K95	<i>Enterococcus faecium</i> (99,58%) <i>Enterococcus durans</i> (99,58%)	<i>Enterococcus durans</i> (99,3%)	<i>Enterococcus durans</i>	БИМ В-1398
ТТ1	<i>Lactococcus lactis</i> (99,36 %)	<i>Lactococcus lactis</i> (99,5 %)	<i>Lactococcus lactis</i>	БИМ В-1364
ТТ2	<i>Lactococcus lactis</i> (99,72 %)	<i>Lactococcus lactis</i> (99,7 %)	<i>Lactococcus lactis</i>	БИМ В-795
O2	<i>Lactobacillus plantarum</i> (99,44%) <i>Lactobacillus paraplantarum</i> (99,44%)	<i>Lactobacillus paraplantarum</i> (99,4%)	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	БИМ В-1400
ЕИ1	<i>Lactococcus lactis</i> (99,76 %)	<i>Lactococcus lactis</i> (99,7 %)	<i>Lactococcus lactis</i>	БИМ В-1365
Т2-2	<i>Lactococcus lactis</i> (99,76 %)	<i>Lactococcus lactis</i> (99,6%)	<i>Lactococcus lactis</i>	БИМ В-1366
СА1	<i>Lactococcus lactis</i> (99,6 %)	<i>Lactococcus lactis</i> (99,7%)	<i>Lactococcus lactis</i>	БИМ В-794
СА2	<i>Lactococcus chungangensis</i> (99,84%)	<i>Lactococcus chungangensis</i> (99,8%)	<i>Lactococcus chungangensis</i>	БИМ В-1369
MM3	<i>Lactococcus raffinolactis</i> (99,87%)	<i>Lactococcus raffinolactis</i> (99,9%)	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	БИМ В-1368

Согласно литературным данным, метод анализа нуклеотидной последовательности генов 16S рРНК в большинстве случаев используется для идентификации рода и группы видов энтерококков, так как сходство последовательностей гена 16S рРНК между видами может достигать 99,8% (для *Enterococcus faecium* и *Enterococcus durans* – 99,7%) [14]. Поскольку нуклеотидные последовательности

штаммов МБ и КБ максимально сходны с последовательностью гена 16S представителей нескольких видов бактерий *Enterococcus*, целесообразно использование дополнительных молекулярно-генетических методов (таких как ДНК-ДНК гибридизация, анализ цельноклеточных белковых профилей, полученных с помощью SDS-PAGE, групп-специфическая ПЦР и др.) для

установления точной видовой принадлежности изолятов МБ и КБ [14]. Штаммы выделенных молочнокислых бактерий депонированы по форме «Гарантийное хранение» в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов.

Фагоустойчивость. На следующем этапе работы исследовали фагоустойчивость 5 штаммов бактерий, отнесенных к виду *Lactococcus lactis*. При фаготипировании установлено, что все выделенные штаммы *L. lactis* чувствительны к бактериофаговой инфекции. Отобраны 10 бактериофагов, способных лизировать культуры СА1, Т2-2, ТТ1, ТТ2 и ЕИ1 и изучена эффективность бляшкообразования (ЕОР) данных вирусов на газоне бактериальных культур. В результате исследований установлено, что штамм Т2-2 характеризуется наибольшей фагоустойчивостью среди выделенных фагочувствительных культур *L. lactis*. Способность лизировать данную культуру обнаружена лишь у 3 из 18 испытуемых бактериальных вирусов. Штаммы СА1, ТТ1 и ТТ2 характеризовались чувствительностью к 4 из 18 фагов, однако эффективность бляшкообразования бактериофагов,

лизирующих культуру ТТ2 была значительно снижена и составляла 0,001-0,003, хотя вирусы были способны образовывать характерные прозрачные негативные колонии. Наибольшей чувствительностью к лактофагам обладал штамм ЕИ1. Способность лизировать данные бактерии отмечена у 10 из 18 фагов, используемых в данном исследовании. Бактериофаги, лизирующие культуру ЕИ1 можно разделить на 3 группы: с высоким (0,9-0,95 для фагов BV-34, BV-35 и BV-39), средним (0,04-0,06 для фагов BV-33, BV-38 и BV-40) и низким (0,002-0,008 для фагов BV-36, BV-41, Lc-1 и Lc-4) значением ЕОР (табл. 4). В целом, вирусы бактерий *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* БИМ В-425 обладали более широким спектром литической активности, по отношению к испытуемым бактериальным культурам в сравнении с фагами *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* БИМ В-424 и фагами *Lactococcus lactis* БИМ В-493, *Lactococcus lactis* БИМ В-1024 и *Lactococcus lactis* БИМ В-1029. Наиболее высокой активностью в отношении исследуемых культур обладал бактериофаг *Lactococcus phage* БИМ BV-35 (показатель ЕОР составлял 0,22-1,05).

Таблица 4

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ШТАММОВ *LACTOCOCCUS LACTIS* К БАКТЕРИОФАГАМ

Штамм бактериофага (БИМ)	Эффективность бляшкообразования (ЕОР)					
	контроль	Культура бактерий				
		ТТ1	ТТ2	Т2-2	ЕИ1	СА1
BV-33	1.00 ± 0.00	0	0	0	0.05 ± 0.22	0
BV-34	1.00 ± 0.00	0.65 ± 0.08	0.001 ± 0.00	0.04 ± 0.37	0.89 ± 0.3	0.69 ± 0.08
BV-35	1.00 ± 0.00	0.78 ± 0.05	0.032 ± 0.05	0.22 ± 0.24	0.95 ± 0.23	1.05 ± 0.11
BV-36	1.00 ± 0.00	0	0	0	0.002 ± 0.18	0
BV-38	1.00 ± 0.00	0.02 ± 0.04	0.001 ± 0.25	0	0.041 ± 0.09	0.15 ± 0.03
BV-39	1.00 ± 0.00	0.83 ± 0.12	0.001 ± 0.08	0.08 ± 0.09	0.9 ± 0.15	0.98 ± 0.17
BV-40	1.00 ± 0.00	0	0	0	0.062 ± 0.11	0
BV-41	1.00 ± 0.00	0	0	0	0.003 ± 0.04	0
BV-95	1.00 ± 0.00	0	0	0	(6,51 ± 0,16) × 10 ⁻³	0
BV-96	1.00 ± 0.00	0	0	0	(8,33 ± 0,01) × 10 ⁻⁴	0

Для более полного понимания механизмов устойчивости бактерий к фаговой инфекции исследовали процент адсорбции на бактериальных клетках тех вирусных частиц, чья эффективность образования негативных колоний была минимальной. Результаты исследований показали, что фаги BV-34, BV-38 и BV-39, лизирующие культуру ТТ2, а также фаги BV-36, BV-41, Lc-1 и Lc-4, лизирующие бактерии ЕИ1 характеризуются низким уровнем адсорбции по отношению к контрольным значениям. Процент

адсорбированных частиц составлял 34-59%, что на 33-64% ниже по сравнению с контролем. Таким образом, низкие значения ЕОР данных фагов связаны с низкой адсорбцией на бактериальных клетках, что может быть обусловлено ограниченным количеством рецепторов фага либо их доступностью для фаговых частиц на поверхности клетки.

Закключение. Из природных источников выделено 12 штаммов молочнокислых бактерий. Культуры идентифицированы с помощью

классических микробиологических методов, а также секвенирования на основе анализа нуклеотидных последовательностей генов 16SrRNA. В результате секвенирования 1 изолят отнесен к роду *Leuconostoc*, 1 изолят – к роду *Lactobacillus*, 3 изолята – к роду *Enterococcus* и 7 изолятов – к роду *Lactococcus*. С целью исследования устойчивости бактерий к лактофагам, отобраны 5 культур, идентифицированных как *Lactococcus lactis*. Результаты исследований показали, что все выделенные штаммы *L. lactis* обладают чувствительностью к бактериофаговой инфекции. Культура T2-2 является полностью устойчивой к фагам *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* БИМ В-424, а также к фагам *Lactococcus lactis* БИМ В-493, *Lactococcus lactis* БИМ В-1024 и *Lactococcus lactis* БИМ В-1029. Установлено, что снижение эффективности образования негативных колоний отдельных фагов связано с низким уровнем адсорбции вирусных частиц на бактериальных клетках. Штамм бактерий ЕИ1 обладает чувствительностью к наиболее широкому спектру исследуемых лактофагов и может быть использован в качестве индикаторной культуры для обнаружения бактериофагов в окружающей среде. Полученные результаты будут способствовать дальнейшей изоляции лактофагов из природных источников и расширению коллекции бактериальных вирусов, а также всестороннему изучению их физиологических и генетических свойств, необходимых для контроля фаговой инфекции на производствах молочной промышленности Республики Беларусь.

Список литературы:

1. Светлакова, Е.В. Использование молочнокислых бактерий в биотехнологических процессах / Е.В. Светлакова, Н.А. Ожередова, М.Н. Вережкина, А.Н. Кононов // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 3. – С. 559.
2. Atamer, Z. Review: elimination of bacteriophages in whey and whey products / Z. Atamer, M. Samtlebe, H. Neve, K.J. Heller, J. Hinrichs // Front Microbiol. – 2013. – Vol. 4. – P. 191.
3. Deveau, H. Biodiversity and classification of lactococcal phages. / H. Deveau, S.J. Labrie, M.C. Chopin, S. Moineau // Appl Environ Microbiol. – 2006. – Vol. 72, № 6. – P. 4338–4346.
4. Szczepańska, A.K. Biodiversity of *Lactococcus lactis* bacteriophages in Polish dairy environment / A.K. Szczepańska, M.S. Hejnowicz, P. Kołakowski, J. Bardowski // Acta Biochim Pol. – gv 2007. – Vol. 54, № 1. – P. 151-158.
5. Oliveira, J. Biodiversity of bacteriophages infecting *Lactococcus lactis* starter cultures / O. Joana, J. Mahony, L. Hanemaaijer, T. R.H.M. Kouwen, D. van Sinderen // Journal of Dairy Science – 2018. – Vol. 101, Iss. 1. – P. 96 – 105.
6. Spinelli, S. Cryo-electron microscopy structure of Lactococcal siphophage 1358 virion // S.

Spinelli, S. Bebeacua, I. Orlov, D. Tremblay, B. P. Klaholz, S. Moineau, C. Cambillau // J Virol. – 2014. – Vol. 88, № 16. – P. 8900–8910.

7. Одегов, Н.И. Изучение разнообразия ассоциаций фагов гомологичных молочнокислым бактериям / Н.И. Одегов, Р.В. Дорофеев, А.Н. Иркитова, И.А. Функ, Т.Н. Орлова, А.В. Мацюра // Биол. вестник Б. Хмельницкого Мелитопольского гос. Пед. университета. – 2017. – Т. 7. – С. 197-206.

8. Нетрусов, А.И. .А. Егорова, Л.М. Захарчук. Практикум по микробиологии / Москва: Академия. 2005 – 608 с.

9. Paul-Satyaseela, M. Comparison of Capsular Typing of *Staphylococcus aureus* with Bacteriophage Typing: A Study in Gulbarga, India / M. Paul-Satyaseela, C.T. Shivannavar, S.M. Gaddad // Indian J Microbiol. – 2011. – Vol. 51, № 3. – P. 359-362.

10. Lavelle, K. Biodiversity of *Streptococcus thermophilus* Phages in Global Dairy Fermentations / K. Lavelle, I. Martinez, H. Neve, G. A. Lugli, C. M. A. P. Franz, M. Ventura, F. dal Bello, D. van Sinderen, J. Mahony // Viruses. – 2018. – Vol. 10, № 10. – P. 577.

11. Lillehaug, D. An improved plaque assay for poor plaque-producing temperate lactococcal bacteriophages / D. Lillehaug // J. Appl. Microbiol. – 1997. – Vol. 83. – P. 85-90.

12. Briggiler, M. M. Characterization of two virulent phages of *Lactobacillus plantarum* / M.M. Briggiler, J.E. Garneau, D. Tremblay, A. Quiberoni, S. Moineau // Appl Environ Microbiol. – 2012. – Vol. 78 № 24. – P. 8719-8734.

13. Roces, C. Isolation of *Lactococcus lactis* mutants simultaneously resistant to the cell wall-active bacteriocin Lcn972, lysozyme, nisin, and bacteriophage c2 / C. Roces, P. Courtin, S. Kulakauskas, A. Rodríguez, M.P. Chapot-Chartier, B. Martínez // Appl Environ Microbiol. – 2012. – Vol. 78, № 12. – P. 4157–4163.

14. Bergey's manual of Systematic Bacteriology: in 5 vol. / eds.: P. De Vos [et al.]. – Springer Dordrecht Heidelberg London New York, 2009. – Vol.3. – 1422 p.

15. Chapot-Chartier, M.P. Cell wall structure and function in lactic acid bacteria / M.P. Chapot-Chartier, S. Kulakauskas // Microb Cell Fact. – 2014. – Vol. 13, Suppl 1:S9.

16. Летаров, А.В. Адсорбция бактериофагов на клетках бактерий / А.В. Летаров, Е.Е. Куликов // Успехи биологической химии – 2017. – Т. 57. – С. 153-208.

17. Каттер, Э. Бактериофаги: биология и практическое применение / Э. Каттер, А. Сулаквелидзе; науч. ред. А.В. Летаров. – М.: Научный мир, 2012. – 640 с.

18. Шурхно, Р.А. Скрининг природных штаммов молочнокислых бактерий и их таксономическая идентификация / Шурхно Р.А., Вологин С.Г., Гибадуллина Ф.С., Тагиров М.Ш // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 2, Ч. 1. – С. 578.

Kazlouski I.S.

Master of Biol. Sci., researcher,
Institute of Microbiology, Belarus National Academy of Sciences

Belskaya I.V.

Master of Biol. Sci., junior researcher,
The Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology

Bulatovskiy A.B.

Master of Biol. Sci., junior researcher,
Institute of Microbiology, Belarus National Academy of Sciences

Zinchenko A.I.

Sc.D., professor, head of laboratory,
Institute of Microbiology, Belarus National Academy of Sciences

ESCHERICHIA COLI-BASED CELL-FREE SYNTHESIS OF THERMOTOGA MARITIME DIGUANYLATE CYCLASE AND TWO CHIMERIC PROTEINS

Казловский И.С.

магистр биологических наук, научный сотрудник,
Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси

Бельская И.В.

магистр биологических наук, младший научный сотрудник,
Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии

Булатовский А.Б.

магистр биологических наук, младший научный сотрудник,
Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси

Зинченко А.И.

доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией,
Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси

СИНТЕЗ ДИГУАНИЛАТЦИКЛАЗЫ THERMOTOGA MARITIME И ДВУХ ХИМЕРНЫХ БЕЛКОВ, ИСПОЛЬЗУЯ СИСТЕМУ БЕСКЛЕТОЧНОГО СИНТЕЗА БЕЛКА

Summary. One of the novel promising trends of molecular biotechnology is cell-free synthesis of proteins. The procedure is based on reconstruction *in vitro* of all stages of protein biosynthesis in a whole cell, including transcription, aminoacylation of tRNA and translation of mRNA by ribosomes. Feasibility of producing diguanylate cyclase (DGC) of *Thermotoga maritime* and two chimeric proteins: human annexin-A5 fused with adenosine deaminase (A5-ADase) of *Escherichia coli*, and modified *Taq* DNA polymerase fused with DNA-affine domain of bacteria *Sulfolobus solfataricus* (Diamond-DNA polymerase), by cell-free biosynthesis procedure as an alternative to classical submerged fermentation method was evaluated in the present investigation. Chimeric RNA polymerase of T7 bacteriophage, S30-cell extract of *Escherichia coli* and multicopy plasmid vector pET42mut were engaged for protein synthesis. The completed research resulted in the first successful biosynthesis of these proteins in cell-free system. Under partially optimized process conditions, 1 ml experimental samples of DGC, A5-ADase and Diamond-DNA polymerase with enzyme activities 45 U/ml, 5 U/ml and 250 U/ml, respectively, were produced.

Аннотация. Одним из новых перспективных направлений молекулярной биотехнологии является бесклеточный синтез белка (БСБ). Процедура БСБ основана на реконструкции *in vitro* всех этапов биосинтеза белка в клетке, включая транскрипцию, аминокислотирование тРНК и трансляцию мРНК рибосомами. В настоящем исследовании в качестве варианта, альтернативного каноническому глубинному культивированию в ферментере, была изучена возможность синтеза в бактериальной системе БСБ дигуанилатциклазы (ДГЦ) бактерии *Thermotoga maritime* и двух химерных белков: человеческого аннексина-А5, слитого с аденозиндеаминазой *Escherichia coli* (А5-АДаза), и модифицированной *Taq*-ДНК-полимеразы, слитой с ДНК-аффинным доменом бактерии *Sulfolobus solfataricus* (Диамант-ДНК-полимераза). Для синтеза этих белков использовали S30-клеточный экстракт *E. coli*, химерную РНК-полимеразу бактериофага Т7 и высококопийный плазмидный вектор pET42mut. В результате выполнения работы нами впервые продемонстрирована возможность синтеза данных белков в системе БСБ. При этом в частично оптимизированных условиях проведения процесса получено по 1 мл экспериментальных образцов ДГЦ, А5-АДазы и Диамант-ДНК-полимеразы с активностью 45 Ед/мл, 5 Ед/мл и 250 Ед/мл ферментного препарата, соответственно.

Key words: *chimeric protein, diguanylate cyclase, annexin-A5, adenosine deaminase, Diamond-DNA polymerase, Escherichia coli, cell-free protein synthesis system, multicopy plasmid*

Ключевые слова: химерный белок, дигуанилатциклаза, аннексин-А5, аденозиндезаминаза, Диамант-ДНК-полимераза, *Escherichia coli*, бесклеточный синтез белка, высококопийная плаزمид

Введение.

В настоящее время для получения лекарственных препаратов пептидной или белковой природы (интерферонов, антигенов, антител, гормонов) широко применяется биотехнология на основе генетической инженерии (выделение и клонирование генов, получение кДНК, введение генов в чужеродные про- или эукариотические клетки, экспрессия гетерологичных белков). Несмотря на значительные достижения, этот подход имеет существенные ограничения: 1) не все гены экспрессируются в «чужом молекулярном окружении» из-за несоответствия элементов регуляции реципиентных клеток и донорских генов; 2) пока не удалось достичь экспрессии полицистронных мРНК; 3) не происходит посттрансляционная модификация и формирование нативной структуры протеинов высших эукариот в бактериальных клетках.

В качестве альтернативы канонической генно-инженерной технологии получения хозяйственно важных белков ряд исследовательских групп начали использовать для протеинового синтеза бесклеточные системы [1–3].

Реакционная смесь для бесклеточного синтеза белка (БСБ) – открытая система без физических барьеров, таких как клеточная мембрана. Выход конечного продукта зависит от концентрации каждого компонента, которую можно варьировать в широких пределах, в отличие от ситуации *in vivo*, то есть варианта с использованием целых клеток. При этом конечная концентрация белка достигает более 2 мг/мл реакционной смеси [4].

Система БСБ предусматривает транскрипцию гена и трансляцию мРНК *in vitro* – в лизате клеток, в который вносят рекомбинантную ДНК, аминокислоты, нуклеотиды, кофакторы и АТФ-регенерирующую систему. Эндогенная генетическая информация (ДНК и мРНК клетки-хозяина) при этом удаляется.

По сравнению с системами, основанными на целых клетках, системы БСБ обладают рядом преимуществ. Среди них можно выделить:

- продукцию исключительно целевого белка, что кардинально облегчает процедуру его выделения и очистки;
- возможность синтеза токсичных для клеток белков;
- возможность синтеза белков, которые содержат неприродные аминокислоты;
- возможность решать проблему агрегации целевого белка путем ввода в реакционную смесь агентов, позволяющих удерживать синтезирующийся полипептид в растворе.

В настоящее время БСБ стал экономичной и легко масштабируемой технологией для получения препаративных количеств различных белковых продуктов.

Аннексин-А5 представляет собой белок с повышенным сродством к фосфатидилсерину – фосфолипиду, выстилающему поверхность раковых клеток. Поскольку на поверхности большинства здоровых клеток фосфатидилсерин отсутствует, его широко используют в качестве мишени для избирательной доставки в опухоли визуализирующих красителей [5]. Таким образом, аннексин-А5 – привлекательный белок для использования в качестве селективного транспортера в опухоль тех или иных лекарственных соединений. Есть основания полагать, что химерный белок, состоящий из аннексина-А5 и аденозиндезаминазы (А5-Адазы), будет за счет аннексина-А5 связываться с раковыми клетками и устранять аденозин, защищая раковые клетки от противоопухолевого иммунитета хозяина [6].

Циклический дигуанозинмонофосфат (цикло-диГМФ), согласно литературным данным, продуцируется только бактериями и обладает выраженными стимулирующими свойствами в отношении иммунной системы позвоночных. В настоящее время цикло-диГМФ получают, главным образом, с помощью трудоемкого химического синтеза. В то же время ферментативный синтез с использованием дигуанилатциклазы *Thermotoga maritima* (ДГЦ) представляет собой одностадийный процесс конденсации двух молекул гуанозин-5'-трифосфата [7].

Диамант-ДНК-полимераза представляет собой химерную ДНК-полимеразу с улучшенными свойствами за счет присоединения к *Taq*-ДНК-полимеразе ДНК-связывающего домена (SSO7D) бактерии *Sulfolobus solfataricus* [8].

Целью настоящей работы служило получение в системе БСБ рекомбинантных ДГЦ, А5-Адазы и Диамант-ДНК-полимеразы, синтез которых традиционным способом, предусматривающим использование целых бактериальных клеток, затруднен.

Материалы и методы исследования. Источником генов ДГЦ (*TM1788*), А5-Адазы (*anxA5-add*) и Диамант-ДНК-полимеразы (*SSO_RS12375-taq*) служили ДНК *T. maritima*, низкокопийные плазмиды pET42-A5-add [9] и pET18b-Staq [8], соответственно. Целевые фрагменты ДНК амплифицировали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием синтетических праймеров. Подбор праймеров проводили с использованием программного обеспечения UGENE 1.22 (UniPro, Россия) на основе нуклеотидных последовательностей целевых генов. На 5'-окончания праймеров были добавлены последовательности, комплементарные плазмиде pET42mut [10]. Амплификацию осуществляли по следующей программе: этап предденатурации (30 с

при 98 °С) – 30 циклов амплификации (10 с при 98 °С; 15 с при 55 °С; 1 мин при 72 °С) – финальная элонгация 75 с при 72 °С. На втором этапе линейаризовали плазмиду pET42mut методом, описанным ранее [10].

На следующем этапе собирали линейаризованный вектор и целевые гены методом продолжительной перекрывающейся ПЦР (ПП-ПЦР) по следующей программе: этап предденатурации (30 с при 98 °С) – 16 циклов амплификации (10 с при 98 °С; 15 с при 50 °С; 4 мин при 72 °С) – финальная элонгация 5 мин при 72 °С. На этом этапе в качестве матрицы и затравки были использованы фрагменты, полученные на первых двух этапах, в эквимоллярных количествах.

Синтезированным в ходе ПП-ПЦР продуктом трансформировали компетентные клетки *E. coli* XL (Novagen, США) с последующим посевом на плотную селективную питательную среду с добавлением канамицина (100 мкг/мл).

Для определения наличия плазмид, содержащих целевые «вставки ДНК», использовали стандартный метод ПЦР-скрининга.

Клетки, содержащие целевые плазмиды, культивировали в жидкой среде LB с последующим

выделением плазмидной ДНК методом щелочного лизиса.

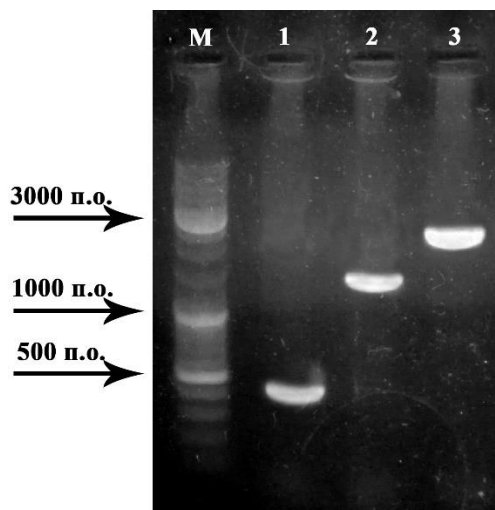
Для синтеза белков использовали следующую реакционную смесь (1.0 мл): 0.25 мл клеточного экстракта S30, 0.65 мл премикса, 5 000 ед. активности РНК-полимеразы бактериофага T7, 500 нг плазмидной ДНК, полученные на предыдущем этапе работы, и инкубировали при 30 °С в течение 5–6 ч.

Активность ДГЦ, А5-АДазы и Диамант-ДНК-полимеразы определяли согласно методов, описанных в работах [11], [9] и [8].

Результаты и обсуждение.

Первый этап работы включал в себя амплификацию генов *TM1788*, *anxA5-add* и *SSO_RS12375-taq*, кодирующих аминокислотные последовательности ДГЦ *T. maritime* и последовательности химерных белков А5-АДазы и Диамант-ДНК-полимеразы, соответственно.

Постановка горизонтального ДНК-электрофореза в агарозном геле после выделения и амплификации генов позволила убедиться в получении нуклеотидных последовательностей требуемых размеров: *TM1788* – 750 п.н., *anxA5-add* – 2000 п.н. и *SSO_RS12375-taq* – 2800 п.н. (рис. 1).



М – маркер молекулярных масс фрагментов ДНК

Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации генов *TM1788* (1), *anxA5-add* (2) и *SSO_RS12375-taq* (3)

На следующем этапе проводили линейаризацию вектора pET42mut с помощью ПЦР. Праймеры для линейаризации вектора подбирали таким образом, чтобы при встраивании в плазмиду на 3'-окончание целевого гена добавлялась последовательность нуклеотидов, обеспечивающая наличие дополнительного октагистидинового олигопептида на С-конце целевого белка.

Затем проводили постановку ПП-ПЦР которая, в отличие от стандартной ПЦР, требует наличия в векторе и вставке перекрывающихся комплементарных участков, добавляемых на стадии клонирования целевых генов. Таким образом, интересные гены *TM1788*, *anxA5-add* и *SSO_RS12375-taq* были встроены в плазмиду pET42mut. Полинуклеотидным материалом,

полученным в результате постановки ПП-ПЦР, трансформировали компетентные клетки *E. coli* XL. Из выросших трансформантов выделили плазмиды, которые в дальнейшем подвергли секвенированию для проверки наличия правильных нуклеотидных последовательностей. В результате были созданы высококопийные плазмиды pET42mut-dgc, pET42mut-A5A и pET42mut-STaq.

На следующем этапе работы проводили оценку эффективности синтеза ДГЦ, А5-АДазы и Диамант-ДНК-полимеразы в системе БСБ на основе S30 экстракта из *E. coli*. Конечная концентрация компонентов реакции составляла: 100 мМ HEPES-КОН (рН 8.0), 8 мМ ацетат магния, 90 мМ ацетат калия, 20 мМ фосфоенолпируват калия, набор аминокислот (каждая в концентрации

1.3 мМ), 0.15 мг/мл фолиевой кислоты, каждый из четырех рибонуклеозидтрифосфатов в концентрации 1 мМ, 0.05% азид натрия, 2% полиэтиленгликоль-8000, 0.04 мг/мл пируваткиназы, 5.5 мкг/мл Sso7d-РНК-полимеразы фага T7 [12], 0.3 мг/мл плазмидной ДНК, содержащей гены, кодирующие интересные белки, 0.5 мг/мл суммарной тРНК и экстракт S30, полученный из лизата клеток *E. coli* (30% от общего объема реакционной смеси). Инкубацию проводили в течение 6 ч при 30 °С с умеренным

перемешиванием. Для контроля синтеза ферментов, каждый час отбирали по 1 мкл для анализа ферментативной активности синтезируемых белков. В качестве отрицательного контроля использовали реакционную смесь с внесением вместо плазмидной ДНК соответствующего количества буферного раствора. Результаты синтеза Диамант-ДНК-полимеразы представлены на рис. 2; а рис. 3 отражает синтез ДГЦ и А5-АДазы.

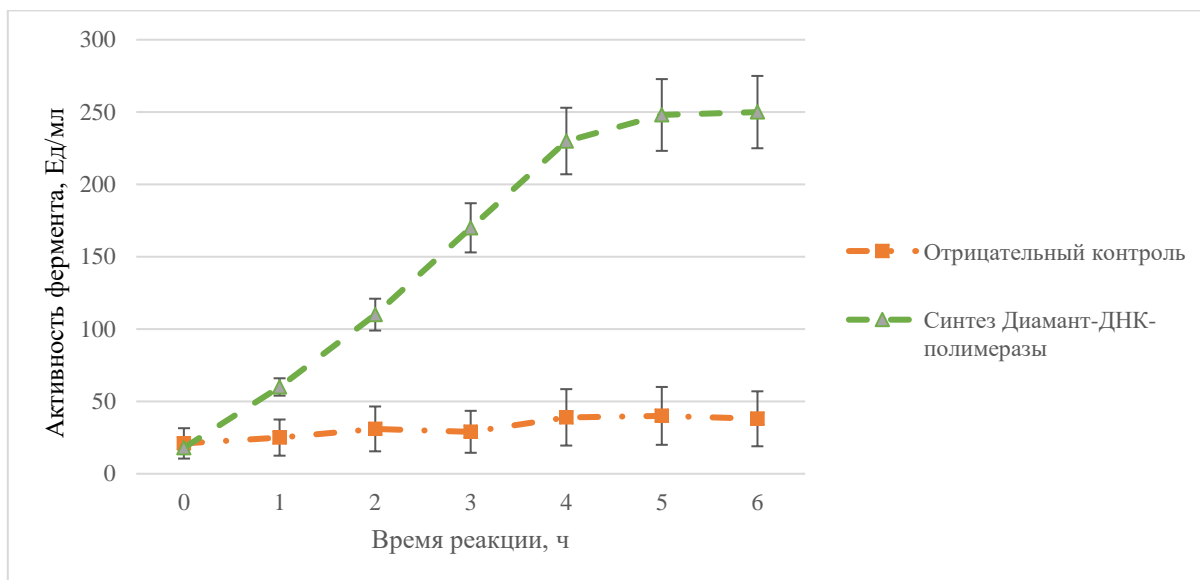


Рис. 2. Синтез Диамант-ДНК-полимеразы в системе БСБ

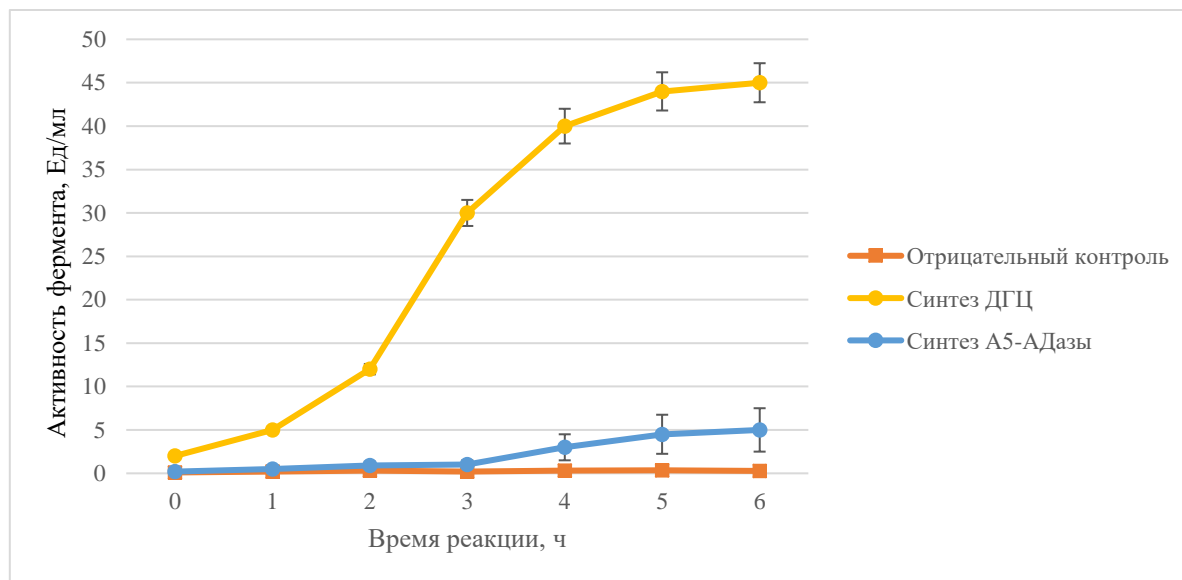


Рис. 3. Синтез ДГЦ и А5-АДазы в системе БСБ

Концентрации ДГЦ, А5-АДазы и Диамант-ДНК-полимеразы в результирующих препаратах, полученных при использовании системы БСБ, составили 45 Ед/мл, 5 Ед/мл и 250 Ед/мл реакционных смесей, соответственно. В качестве сравнения следует отметить, что при получении данных белков в цельноклеточных системах экспрессии, их максимальная концентрация в культуральной жидкости составляла

соответственно 0.0036 Ед/мл [11], 0.1325 Ед/мл [9] и 240 Ед/мл [8]. Как можно заметить, экспрессия Диамант-ДНК-полимеразы близка к цельноклеточной, что может свидетельствовать о не полностью оптимизированном процессе синтеза этого фермента в системе БСБ.

Заключение.

Впервые система БСБ использована для получения бактериального фермента ДГЦ

T. maritima, и двух химерных белков (аннексина-A5 человека, слитого с АДазой *E. coli*, и ДНК-полимеразы бактерии *T. aquaticus*, слитой с ДНК-аффинным доменом бактерии *S. solfataricus*). После частичной оптимизации условий проведения процесса БСБ получено по 1 мл экспериментальных образцов ДГЦ, А5-АДазы и Диамант-ДНК-полимеразы с активностью 45 Ед/мл, 5 Ед/мл и 250 Ед/мл ферментного препарата, соответственно. По нашему мнению, синтез этих белков в системе БСБ может выступать в качестве варианта, альтернативного глубинному культивированию штаммов-продуцентов в ферментере.

Литература:

1. Gao W., Cho E., Liu Y., Lu Y. Advances and challenges in cell-free incorporation of unnatural amino acids into proteins. *Front. Pharmacol.* 2019. Vol. 10. Art. 611. doi:10.3389/fphar.2019.00611
2. Gregorio N.E., Levine M.Z., Oza J.P. A user's guide to cell-free protein synthesis. *Meth. Protoc.* 2019. Vol. 2. Art. 24. doi:10.3390/mps2010024
3. Yue K., Zhu Y., Kai L. Cell-free protein synthesis: chassis toward the minimal cell. *Cells.* 2019. Vol. 8, № 4. Art. 315. doi:10.3390/cells8040315
4. Smith M.T., Varner C.T., Bush D.B., Bundy B.C. The incorporation of the A2 protein to produce novel Q β virus-like particles using cell-free protein synthesis. *Biotechnol. Progr.* 2012. Vol. 28, N 2. P. 549–555.
5. Riedl S., Rinner B., Asslaber M., Schaidner H., Walzer S., Novak A., Lohner K., Zwegl D. In search of a novel target - phosphatidylserine exposed by non-apoptotic tumor cells and metastases of malignancies with poor treatment efficacy. *Biochim. Biophys. Acta.* 2011. Vol. 1808. P. 2638–2645.
6. Зинченко А.И. Аденозин как потенциальная мишень для биотерапии рака. *Весті НАН Беларусі. Сер. біял. навук.* 2016. № 4. С. 118–128.
7. Rao F., Pasunooti S., Ng Y., Zhuo W., Lim L., Liu A.W., Liang Z.X. Enzymatic synthesis of c-di-GMP using a thermophilic diguanylate cyclase. *Anal. Biochem.* 2009. Vol. 389. P. 138–142.
8. Korovashkina A.S., Kvach S.V., Eroshevskaya L.A., Zinchenko A.I. Production of thermostable DNA polymerase suitable for whole-blood polymerase chain reaction. *Biochemistry and Biotechnology: Research and Development* / Eds: S.D. Varfolomeev, G.E. Zaikov, L.P. Krylova. New York, Nova Science Publishers, Inc. 2012. P. 1–5.
9. Булатовский А.Б., Квач С.В., Ерошевская Л.А., Зинченко А.И. Создание штамма-продуцента химерного белка, состоящего из человеческого аннексина и бактериальной аденозиндезаминазы. *Докл. Нац. акад. наук Беларусі.* 2017. Т. 61, № 4. С. 89–95.
10. Казловский И.С., Рымко А.Н., Зинченко А.И. Модификация экспрессионной рЕТ-системы для использования в бесклеточном синтезе белка. *Сб. науч. трудов Института микробиологии НАН Беларусі «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты».* Т. 10. Минск, «Беларуская навука». 2018. С. 69–78.
11. Korovashkina A.S., Rymko A.N., Kvach S.V., Zinchenko A.I. Enzymatic synthesis of c-di-GMP using inclusion bodies of *Thermotoga maritima* full-length diguanylate cyclase. *J. Biotechnol.* 2012. Vol. 164, № 2. P. 276–280.
12. Казловский И.С., Зинченко А.И. Создание штамма-продуцента химерного белка, состоящего из РНК-полимеразы и ДНК-аффинного домена. *Докл. Нац. акад. наук Беларусі.* 2018. Т. 62, № 5. С. 601–607.

Чайка Н.И.*Доктор сельскохозяйственных наук,
доктор философии**Харьковский национальный аграрный
университет им. В.В. Докучаева***Непран И.В.***Кандидат сельскохозяйственных наук, доцент**Харьковский национальный аграрный
университет им. В.В. Докучаева*

ВЛИЯНИЕ ОБРАБОТКИ СЕМЯН ТЕТРАМИНОДИФЕНИЛОКСИДОМ НА ИЗМЕНЕНИЕ ЭКОЛОГО-МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ РАСТЕНИЙ

Chaika N.I.*Doctor of Agricultural Sciences,**Doctor of Philosophy**Kharkiv National Agrarian University named
after V.V.Dokuchayev***Nepran I.V.***Associate Professor, Candidate of Agricultural Sciences**Kharkiv National Agrarian University named
after V.V.Dokuchayev*

THE INFLUENCE OF SEEDS TREATMENT WITH TETRAMINODIPHENYLOXIDE ON THE CHANGE OF THE ECOLOGICAL AND MORPHOLOGICAL SIGNS OF THE PLANTS

Аннотация. Представлены результаты исследований, где было изучено влияние обработки семян тетраминодифенилоксидом на изменение морфологических процессов растений. Обработка тетраминодифенилоксидом в исследуемых концентрациях, негативно сказывалась на первоначальных этапах вегетации, но при этом никаких мутаций не вызывало, что не скажешь за более поздние этапы роста, а именно способствованию стимулированию развития растений основных показателей роста, что дало возможность повысить урожай культур.

Annotation. The results of the investigations in which the influence of seeds treatment with tetraminodiphenyloxide on the change of morphological processes of the plants has been studied are presented. The treatment with tetraminodiphenyloxide in the investigated concentrations had negative consequences at the initial stages of vegetative activity, but didn't cause any mutations which cannot be said about the later stages of growth, namely to promote the stimulation of the plants development of the main growth indicators, which made it possible to increase the yield of crops.

Ключевые слова: морфологические признаки растений, тетраминодифенилоксид, стимулятор роста растений, гумат+7, янтарная кислота.

Keywords: morphological features of plants, tetraminodiphenyloxide, plant growth simulator, humate +7, succinic acid.

Постановка проблемы. В системе мероприятий, направленных на получение высоких устойчивых урожаев сельскохозяйственных культур, важнейшее место принадлежит повышению эффективности использования земли, плодородия почвы, расширенное его восстановление. Внедрение научно-обоснованных систем земледелия, их интенсификация, повышение культуры земледелия, на современном этапе не возможно без выполнения норм по ограничению антропогенного вмешательства в экологические условия почвы и соблюдения мероприятий по охране земель. Длительное применение комплекса средств химизации в полеводстве увеличивает нагрузку препаратов на единицу площади, что чревато накоплением их остаточного количества, которое оказывает

отрицательные воздействия на окружающую среду, а также на качество сельскохозяйственной продукции [1]. Интенсификация современного сельскохозяйственного производства невозможна без комплексного подхода к подбору удобрений, средств защиты и стимуляторов роста растений. В качестве стимуляторов роста в сельском хозяйстве используют как индивидуальные соединения, так и композиции, содержащие в своем составе стимулирующие вещества как растительного происхождения, которые созданы на основе гормонов роста: абсцизинов, ауксинов, цитокининов, гибберелинов и др., так и получаемые в результате химических процессов. В последнее время получил распространение и вполне эффективно используется стимулятор

корнеобразования и роста растений эпин, созданный на основе эписбассинолида [2].

Особое внимание следует уделить факту, что гармональные препараты содержат вещества, являющиеся гармонами роста не только для растений, но и для насекомых, а также высших животных, включая человека. Проведенные исследования по вопросам токсикологии и экологии показали, что химические соединения, используемых в сельскохозяйственном производстве препаратов, могут длительный период сохраняться в почве, вызывая не только токсичное, но и эмбриогенное, мутагенное, канцерогенное и тератогенное влияние на растения, животных и человека [3].

Цель статьи. Работая над расширением ассортимента высокоэффективных стимуляторов роста растений, мы поставили задачу изучить действие обработки семян растений тетраминодифенилоксидом. Данные о применении его в сельскохозяйственном производстве отсутствуют. Поэтому целью наших исследований было изучение влияния обработки семян тетраминодифенилоксидом на изменение морфологических процессов растений.

Материалы и методы исследований. Исследования проводили в лабораторных условиях Харьковского НАУ им. В.В. Докучаева и полевых условиях агрофирмы «Агротис» в Марьинском районе Донецкой области. Почвенный покров участка представлен черноземом обыкновенным. В качестве объектов исследований использовали посевы ячменя посевного (*Hordeum sativum* L.) разновидность паллидум, озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.). В качестве стимуляторов использовали термостойкий ароматический полибензимидазол, 3,3',4,4'-тетраминодифенилоксид, получаемый с помощью реакций поликонденсации, применяемый для получения протонпроводящей мембраны [4]. Янтарную кислоту (бесцветные кристаллы, растворимые в воде и спирте). Гумат+7 – сочетание гуминовых кислот и семи дополнительных микроэлементов, усиливающих действие гуматов.

Материалами исследования были растения (среднее значение по десяти особям) семена ячменя посевного форма 1 и 2 и озимой пшеницы

обработанных тетраминодифенилоксидом в концентрациях 0,01%; 0,1% и 0,5%. Для сравнения семена этих видов растений обрабатывали такой же концентрацией янтарной кислоты. Контролем служили семена соответствующих видов необработанные. Экспозиция при обработке семян составляла 12 часов. [5,6]. Повторность трехкратная. Для обработки семян в полевых опытах использовали 0,5 % для семян ячменя, а для озимой пшеницы в фазу прорастания 0,01 % тетраминодифенилоксида и 0,01% гумата +7. Отбор образцов производили в фазу отрастания, цветения, полной спелости у озимой пшеницы, в фазу кущения, колошения полной спелости у ячменя. Опыты проводили на делянках с площадью 20 м² на посевах озимой пшеницы и 2 м² на делянках ячменя. Повторность опыта четырехкратная. Размещение по повторностям – систематическое [7]. В период вегетации растений проводили замеры морфологических показателей стебля, листа, корня. Определяли продуктивность сухой массы надземной и подземной части растения, а также длину колоса, число семян с одного колоса, массу семян с одного колоса, массу 1000 семян.

Изложение основного материала. Обработку посевов озимой пшеницы производили в начале первой декады апреля при температуре воздуха 14°C, температуре почвы на глубине 0 – 10 см – 18°C, влажность почвы в этом горизонте соответствовала 15%, pH-7. В среднем одно растение достигало 14 см высоты, среднее число листьев равно 26 штук со средней длиной 8,5 см и шириной 0,46 см. Средняя площадь одной листовой пластинки составляла 2,54 см², а средняя листовая поверхность одного растения – 66,0 см². На момент обработки средний вес сухой надземной массы растения равен 0,771 г, что составляло 25,44 г/м². Средняя величина массы корней одного растения сформирована в горизонте 0-50 см, в воздушно-сухом состоянии равнялась 0,369 г. Для расчета эколого-биологической характеристики корневой системы применялись постоянные коэффициенты [8]. Общая масса корней, сформированная растением, разделялась на фракции (табл. 1).

Таблица 1

СОСТОЯНИЕ КОРНЕВОЙ СИСТЕМЫ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ НА МОМЕНТ ОБРАБОТКИ ХИМИЧЕСКИМИ ВЕЩЕСТВАМИ.

Показатели	Фракции				Общий показатель
	>5	5-1	1-0,5	<0,5	
P	–	0,024	0,015	0,33	0,369
%	–	6,5	4,1	89,4	100
S	–	0,483	0,942	58,15	59,575
L	–	0,51	4,1	745,5	750,11
N	–	0,00003	0,00001	0,00036	0,0004

Примечание: фракции – мм; P – масса корней; % – процентное выражение массы корней; S – площадь поверхности корней, см²; L – длина корней, см²; N – насыщенность почвы корнями, %.

Как видно из таблицы преобладает масса тонких корней, она составляет 93,5% всей массы и

более 7 м длины корней. Отношение массы стебель-корень равно 2:1.

Растения в необработанных реактивами посевах реагировали на факторы окружающей среды, а получив дополнительный фактор от опрыскивания тетраминодифенилоксидом и гуматом +7, до конца вегетации прореагировали изменением морфологических особенностей. За исследуемый период мы вели наблюдения и замеры по двенадцати морфологическим особенностям. Если показатели выделенных особенностей у необработанных посевов принять за 100%, то выявленную изменчивость у обработанных растениях можно выразить в процентном отношении (табл. 2).

Согласно таблице, растения в обработанных реagensами посевах в фазу выхода в трубку прореагировали уменьшением высоты растения, длины и ширины листовой пластинки. Так данные замеров высоты у растений

обработанных тетраминодифенилоксидом фиксировали изменчивость к норме 89,5 %, по длине листа 92,8 %, по ширине листовой пластинки — 89,2%. В варианте с гуматом+7 эти показатели ниже нормы. По показателю высоты растения уступают 18 % аналогичному показателю в варианте тетраминодифенилоксид и 10,3 % по показателю длины листа, но на 7,5 % превышают по ширине листа, что приводит к превышению на 2% по показателю площади листовой поверхности. Растения в варианте тетраминодифенилоксид по количеству колосьев на одном погонном метре превышают контроль на 66,2 %, на 60,6 % в варианте гумат+7%. Зато уступают 0,9% норме и 1,3% в варианте гумат+7 по массе 1000 семян и 14,1 % и 25,8 % по средней длине колоса соответствующих вариантов.

Таблица 2

ХАРАКТЕРИСТИКА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ ПРИ ОБРАБОТКЕ ПОСЕВОВ РЕАГЕНТАМИ

Морфологические особенности	Варианты				
	обработка тетраминодифенилоксидом		Обработка гумат+7		контроль
	данные замеров	изменчивость, % к норме	данные замеров	изменчивость, % к норме	данные замеров
Высота растения, см	71	89,5	71,5	90,1	79,3
Количество листьев на генеративном стебле, шт.	4	100	4	100	4
Длина листа, см	14,3	92,8	12,7	82,5	15,4
Ширина листа, см	0,83	89,2	0,9	96,7	0,93
Площадь листовой поверхности растения, см ²	7,67	78,8	7,86	80,8	9,73
Средняя длина колоса, см	4,27	85,9	5,56	111,9	4,97
Максимальная длина колоса, см	7,5	88,2	9,5	111,7	8,5
Минимальная длина колоса, см	2	100	2	100	2
Общая длина колосьев на 1 м пагоном, шт.	505	142,8	417,5	118,1	353,5
Количество колосьев на 1 м пагоном, шт.	118	166,2	75	105,6	71
Вес зерна с одного колоса, г	0,71	64,5	1,1	100	1,1
Масса 1000 семян, г	36,3	99,1	36,7	100,3	36,6

Растения в варианте с тетраминодифенилоксидом по фитомассе травостоя в фазу колошения уступали аналогичным

показателям в вариантах контроль и гумат+7 (табл. 3).

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ФИТОМАССЫ ТРАВСТОЯ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ ПО ВЕРТИКАЛЬНЫМ ГОРИЗОНТАМ В ФАЗУ КОЛОШЕНИЯ, Г

Варианты	Верти-кальный горизонт	Фракции					В % по горизонту
		Плоды, соцветия	Стебли	Листья	Опад.	Сумма по гориз.	
1	2	3	4	5	6	7	8
Контроль	0-5	-	0,052	0,016	0,006	0,074	6,1
	5-10	-	0,043	0,008	-	0,051	4,2
	10-15	-	0,051	0,01	-	0,061	5,1
	15-20	-	0,045	0,009	-	0,054	4,5
	20-25	-	0,052	0,008	-	0,060	4,9
	25-30	-	0,045	0,004	-	0,049	4,1
	30-35	-	0,040	0,002	-	0,042	3,5
	35-40	-	0,041	0,006	-	0,047	3,9
	40-45	-	0,042	0,003	-	0,045	3,8
	45-50	-	0,032	0,006	-	0,038	3,1
	50-55	-	0,025	0,003	-	0,028	2,3
	55-60	0,056	0,016	0,002	-	0,074	6,1
	60-65	0,151	0,009	-	-	0,160	13,2
	65-70	0,229	0,005	-	-	0,234	19,4
	70-75	0,191	-	-	-	0,191	15,8
	сумма по фракциям	0,627	0,498	0,077	0,006	1,208	100
сумма по фр. в %	51,9	41,3	6,3	0,5	100		
Гумат+7	0-5	-	0,084	0,005	0,01	0,099	6,1
	5-10	-	0,082	0,007	-	0,089	5,4
	10-15	-	0,077	0,004	-	0,081	4,9
	15-20	-	0,082	0,002	-	0,084	5,1
	20-25	-	0,072	0,001	-	0,073	4,5
	25-30	-	0,058	0,002	-	0,060	3,6
	30-35	-	0,042	0,002	-	0,044	2,6
	35-40	0,222	0,042	0,006	-	0,270	16,4
	40-45	-	0,042	-	-	0,042	2,5
	45-50	-	0,031	-	-	0,031	1,9
	50-55	-	0,023	-	-	0,023	1,4
	55-60	-	0,016	0,006	-	0,022	1,3
	60-65	-	0,015	0,008	-	0,023	1,4
	65-70	0,191	0,006	0,003	-	0,200	12,1
	70-75	0,495	-	-	-	0,495	30,1
	75-80	0,012	-	-	-	0,012	0,7
сумма по фракциям	0,92	0,672	0,046	0,01	1,648	100	
сумма по фр. в %	55,8	40,8	2,8	0,6	100		
Тетраминодифенилоксид	0-5	-	0,052	0,022	0,004	0,078	6,7
	5-10	-	0,045	0,008	-	0,053	4,6
	10-15	-	0,047	0,01	-	0,057	4,9
	15-20	-	0,047	0,008	-	0,055	4,7
	20-25	-	0,041	0,006	-	0,047	4,1
	25-30	-	0,054	0,007	-	0,061	5,3
	30-35	-	0,046	0,007	-	0,053	4,6
	35-40	-	0,035	0,007	-	0,042	3,6
	40-45	-	0,026	0,012	-	0,038	3,3
	45-50	0,169	0,017	0,011	-	0,197	17,1
	50-55	0,201	0,008	0,009	-	0,218	18,9
	55-60	0,256	-	-	-	0,256	22,2
	Сумма по фракциям	0,626	0,418	0,107	0,004	1,155	100
	Сумма по фр в %	54,2	36,2	9,3	0,3	100	

В таблице представлены средние показатели обработанные тетраминодифенилоксидом сухой массы одного растения. Растения достигали массы 1,155 г, что на 0,053 г ниже чем в

контроле и на 0,493 г ниже чем в варианте с гуматом+7, а превышение этого показателя почти на 1% в нижних горизонтах (от 0 – 5 до 15) в вариантах с реагентами, подтверждает задержку роста, как реакция растений на реагенты. На эту причину указывают исследования периодичности роста у растения ячменя. Согласно закону Ю. Сакса, скорость роста у растений увеличивается сначала медленно, а затем темпы роста возрастают, достигают максимального значения вновь снижаются [9].

Влияние обработки семян ячменя обеих форм тетраминодифенилоксидом и янтарной кислотой, по разному проявлялись на изменение морфологических особенностей растений на протяжении всего периода вегетации. Показатели морфологических особенностей растений ячменя F₁ в фазу кущения в варианте тетраминодифенилоксид были ниже нормы на 1,9% по длине листовой пластинки и на 1,2% по площади листовой пластинки (табл. 4). Средняя длина листовой пластинки в этом варианте была 8,93 см, тогда как в контроле — 9,1 см. Средняя площадь листовой пластинки составила 4,2 см², в контроле – 4,25 см². Растения в варианте янтарная кислота в этой фазе превосходили норму на 1,1% по длине листовой пластинки и на 8% по площади листовой пластинки так как ширина листа была на 12,8% выше нормы. Средняя ширина листа в этом варианте была 0,7 см, в контроле – 0,62 см. Средняя длина листа — 9,2 см. В фазу выхода в трубку у растений в варианте янтарная кислота активность

роста несколько снизилась. Все показатели морфологических особенностей были ниже нормы. Ситуация несколько стабилизировалась в фазе колошения, однако в целом показатели морфологических особенностей уступали аналогичным с контроля. Изменчивость к норме по высоте растений в фазу выхода в трубку составляла 88,6%, в фазу колошения – 94,2%.

По площади листовой поверхности показатель вырос от 77,6% до 99,8%. Только в фазе созревания показатели морфологических особенностей колоса превышали норму на 5,1% по количеству зерен в колосе. Таким образом на протяжении всей вегетации роста растения в его развитии можно выделить фазу активного роста, адаптации и нормализации, что указывает на необходимость проведения дополнительных внекорневых опрыскиваний растений янтарной кислотой. В варианте с обработкой семян тетраминодифенилоксидом в фазу выхода в трубку рост растений стабилизировался. Показатель высоты растения приблизился к норме и становил 80,7%, показатель длины листа на 3,0% был ниже аналогичного показателя с варианта янтарная кислота, а показатель ширины листовой пластинки превышал норму на 19,3% и на 31,8% аналогичный показатель с варианта янтарная кислота. В фазу колошения все растения по показателям морфологических особенностей превосходили норму и были выше аналогичных показателей с вариантами янтарная кислота (табл. 4).

Таблица 4

ХАРАКТЕРИСТИКА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ЯЧМЕНЯ F₁ ПОСЛЕ ОБРАБОТКИ СЕМЯН РЕАГЕНТАМИ

Морфологические особенности	Варианты				
	Обработка тетраминодифенилоксидом		Обработка янтарной кислотой		Контроль
	Данные замеров	Изменчивость, % к норме	Данные замеров	Изменчивость, % к норме	Данные замеров
Фаза кущения					
Высота растения, см	17,6	117,3	19	126,6	15
Общая длина листьев, см	89,3	109,3	55,2	67,5	81,7
Длина листа, см	8,93	98,1	9,2	101,1	9,1
Ширина листа, см	0,62	100	0,7	112,9	0,62
Площадь листовой пластины, см ²	4,2	98,8	4,59	108	4,25
Площадь листовой поверхности, см ²	21,21	110,4	27,59	144,3	19,12
Фаза выхода в трубку					
Высота растения, см	37	80,7	40,6	88,6	45,8
Общая длина листьев, см	242	39	417,5	67,3	620,5
Длина листа, см	19,14	86,2	19,88	89,5	22,2
Ширина листа, см	1,05	119,3	0,77	87,5	0,88
Площадь листовой пластины, см ²	14,61	104,4	10,49	74,9	13,99
Площадь листовой поверхности, см ²	155,88	39,7	304,28	77,6	391,79
Фаза колошения					
Высота растения, см	91	102,8	83,4	94,2	88,5

Толщина стебля, см	0,6	109,1	0,5	90,9	0,55
Общая длина листьев генеративного побега, см	96	65,7	171	117,1	146
Длина листа, см	19,2	104,9	17,1	93,4	18,3
Ширина листа, см	1,1	91,6	1,2	100	1,2
Площадь листовой пластинки, см	13,83	99,1	13,37	95,7	13,96
Площадь листовой поверхности, см	69,16	103,2	66,85	99,8	66
Фаза созревания					
Количество колосьев на 1 м погонном	88	107,3	72	57,8	82
Общая длина колосьев 1м погонном	414	107,2	317	82,1	386
Длина колоса, см	4,7	100	4,4	93,6	4,7
Максимальная длина колоса, см	7	100	6,5	92,8	7
Минимальная длина колоса, см	2	133,3	15	100	1,5
Количество зерен в колосе, шт	36,6	99,4	38,7	105,1	36,8
Вес зерен с колоса, г	2,05	100,9	1,95	96,1	2,03
Масса 1000 зерен, г	55	105,7	50	96,1	52

Эта тенденция преобладания продолжалась и в фазе созревания. Вес зерна с колоса становил 2,05 г, что выше чем в контроле (2,03 г) и в варианте янтарная кислота (1,95 г). Показатель массы 1000 зерен на 5,7% был выше нормы и на 9,6 % выше чем с варианта янтарная кислота. Если растения в варианте с янтарной кислотой в фазе кущения не получили дополнительного стимулятора и были вынуждены в последующей фазе адаптироваться к условиям окружающей среды, то в варианте с тетраминодифенилоксидом на период вегетации растений характеризовался фазой адаптации, нормализации активной фазы, что вызвало превышение к норме показателей изменчивости генеративных и вегетативных органов. Такая комбинация прохождения фаз растением указывает на обработку семян высокой концентрацией тетраминодифенилоксидом для данного вида растений, но дальнейшее развитие растений и наблюдения за распределением фитомассы травостоя указывают на возможность применения тетраминодифенилоксида как стимулятора роста при изучении эффективных сочетаний обработок, а также использование его в качестве мутагена в селекционных опытах.

Для растений F₁ характерной особенностью распределения фитомассы по горизонтали в установленных вариантах опыта было подтверждение выделенных нами фаз в процессе вегетации. По формированию фитомассы в фазу кущения выделялись растения в варианте янтарная кислота с показателем 0,091 г сухой массы одного растения, что выше чем в контроле – 0,077 г (табл. 5). В фазу выхода в трубку и колошения образцы растений с контроля превосходили по формированию фитомассы на 0,840г и 0,071 г образцы с варианта янтарная кислота, и на 0,904 г и 0,464 г соответственно фазам с варианта тетрамино- дифенилоксид. Преобладание показателей фитомассы в контроле над вариантами указывает на реакцию растений связанную с дополнительным влиянием реагентов в период вегетации. На это указывают и наблюдения за подземной частью растений ячменя. В варианте янтарная кислота наблюдалась тенденция увеличения массы подземной части растений в фазу кущения в 1,4 раза по сравнению с контролем и 1,2 раза с вариантом тетраминодифенилоксид (табл. 6).

**РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ФИТОМАССЫ ТРАВСТОЯ ЯЧМЕНЯ F₁ ПО
ВЕРТИКАЛЬНОМУ ГОРИЗОНТУ, Г.**

Варианты	Вертикальный горизонт	Фракции					В процен- тах по горизонтали
		плоды соцветия	стебли	листья	опад	сумма по горизонту	
Контроль	Фаза кушения						
	0-5	-	0,018	0,013	-	0,031	40,2
	5-10	-	0,016	0,012	-	0,028	36,5
	10-15	-	0,007	0,011	-	0,018	23,3
	сумма по фракциям	-	0,041	0,036	-	0,077	100
	сумма по фракциям в процентах	-	53,2	46,8	-	100	-
	Фаза выхода в трубку						
	сумма по фракциям	-	1,512	0,872	0,006	2,30	-
	сумма по фракциям в процентах	-	63,6	36,5	0,2	100	-
	Фаза колошения						
	сумма по фракциям	1,196	1,268	0,371	0,009	2,844	-
	сумма по фракциям в процентах	42,1	44,6	13,1	0,2	100	-
Янтарная кислота	Фаза кушения						
	0-5	-	0,02	0,015	-	0,035	38,5
	5-10	-	0,018	0,014	-	0,032	35,2
	10-15	-	0,008	0,006	-	0,014	15,4
	15-20	-	0,006	0,004	-	0,01	10,9
	сумма по фракциям	-	0,052	0,039	-	0,091	100
	сумма по фракциям в процентах	-	57,1	42,9	-	100	-
	Фаза выхода в трубку						
	0-5	-	0,461	0,015	0,005	0,481	31,1
	5-10	-	0,265	0,051	-	0,316	20,4
	10-15	-	0,147	0,059	-	0,206	13,3
	15-20	-	0,088	0,067	-	0,155	10
	20-25	-	0,022	0,11	-	0,132	8,5
	25-30	-	0,01	0,095	-	0,105	6,8
	30-35	-	-	0,081	-	0,081	5,2
	35-40	-	-	0,042	-	0,042	2,7
	40-45	-	-	0,027	-	0,027	1,7
	45-50	-	-	0,005	-	0,005	0,3
	сумма по фракциям	-	0,993	0,552	0,005	1,55	100
	сумма по фракциям в процентах	-	64,1	35,6	0,3	100	-
	Фаза колошения						
	0-5	-	0,04	-	0,007	0,047	1,6
	5-10	-	0,039	0,032	0,011	0,082	2,8
	10-15	-	0,044	0,028	-	0,072	2,5
	15-20	-	0,048	0,004	-	0,052	1,8
	20-25	-	0,097	-	-	0,097	3,3
	25-30	-	0,093	0,026	-	0,119	4,1
	30-35	-	0,093	0,028	-	0,121	4,2
	35-40	-	0,08	0,019	-	0,099	3,4
	40-45	-	0,074	0,009	-	0,083	2,9
	45-50	-	0,07	0,035	-	0,105	3,7
	50-55	-	0,057	0,024	-	0,081	2,8
	55-60	0,478	0,052	0,017	-	0,547	18,8
	60-65	-	0,047	0,01	-	0,057	1,9
	65-70	-	0,04	0,003	-	0,043	1,6
	70-75	-	0,02	0,019	-	0,039	1,3
75-80	0,186	0,017	0,015	-	0,218	7,5	

	80-85	1,037	-	-	-	1,037	35,8
	Сумма по фракциям	1,701	0,911	0,209	0,018	2899	100
	Сумма по фракциям в %	58,7	31,4	9,3	0,6	100	-
Тетрамино- дифенилоксид	Фаза кущения						
	0-5	-	0,017	0,012	-	0,029	38,6
	5-10	-	0,015	0,010	-	0,025	39,3
	10-15	-	0,007	0,010	-	0,017	22,6
	15-20	-	0,002	0,002	-	0,004	5,5
	Сумма по фракциям	-	0,041	0,034	-	0,075	100
	Сумма по фракциям в %	-	54,7	45,3	-	100	-
	Фаза выхода в трубку						
	0-5	-	0,425	0,033	0,005	0,463	31,2
	5-10	-	0,282	0,083	-	0,365	24,5
	10-15	-	0,133	0,084	-	0,217	14,6
	15-20	-	0,025	0,114	-	0,139	9,4
	20-25	-	0,006	0,104	-	0,11	7,4
	25-30	-	-	0,086	-	0,086	5,8
	30-35	-	-	0,061	-	0,061	4,1
	35-40	-	-	0,045	-	0,045	3,0
	Сумма по фракциям	-	0,871	0,61	0,005	1,486	100
	Сумма по фракциям в %	-	58,6	41,1	0,3	100	-
	Фаза колошения						
	0-5	-	0,091	-	0,007	0,098	4,1
	5-10	-	0,09	-	-	0,09	3,8
	10-15	-	0,08	0,005	-	0,085	3,6
	15-20	-	0,067	0,025	-	0,092	3,9
	20-25	-	0,088	0,023	-	0,111	4,6
	25-30	-	0,064	0,025	-	0,089	3,7
	30-35	-	0,072	0,008	-	0,08	3,4
	35-40	-	0,077	0,035	-	0,112	4,8
	40-45	-	0,064	0,037	-	0,101	4,2
	45-50	-	0,059	0,011	-	0,07	2,9
	50-55	-	0,044	0,02	-	0,064	2,7
	55-60	-	0,045	0,03	-	0,075	3,2
	60-65	-	0,031	0,008	-	0,039	1,6
	65-70	0,005	0,028	-	-	0,033	1,4
70-75	0,004	0,022	-	-	0,026	1,1	
75-80	0,332	0,018	0,005	-	0,355	14,9	
80-85	0,538	0,008	0,007	-	0,553	23,2	
85-90	0,282	-	0,005	-	0,287	12,1	
90-95	0,02	-	-	-	0,02	0,8	
Сумма по фракциям	1,181	0,948	0,244	0,007	2,38	100	
Сумма по фракциям в %	49,6	39,7	10,5	0,2	100	-	

**ХАРАКТЕРИСТИКА КОРНЕВОЙ СИСТЕМЫ ЯЧМЕНЯ F₁ В
ФАЗЕ КУЩЕНИЯ ПО ВАРИАНТАМ**

Показатели	Фракции				Общий показатель
	> 5	5-1	1-0,5	< 0,5	
Контроль					
P			0,003	0,014	0,017
%			17,6	82,4	100
S			0,188	2,466	2,654
L			0,817	31,61	32,427
N			0,000003	0,000015	0,000018
Янтарная кислота					
P			0,005	0,018	0,023
%			21,8	78,2	100
S			0,314	3,17	3,484
L			1,365	40,64	42,005
N			0,000005	0,000019	0,000024
Тетраминодифенилоксид					
P			0,003	0,016	0,019
%			15,8	84,2	100
S			0,188	2,819	3,007
L			0,817	36,14	36,957
N			0,000003	0,000017	0,00002

Примечание: фракции – мм, P – масса корня, г; % – процентное выражение массы корней, см; S – площадь поверхности корней, см²; L – длина корней, см²; N – насыщенность почвы корнями, %.

Из сравниваемых нами вариантов максимальной величины поверхности и длины корней обнаружены у растений с варианта янтарная кислота. Так общий показатель поверхности корней растений ячменя F₁ достигал 3,484 см². Корневая система имела общую протяженность 42,005 см, что на 9,578 см больше, чем у растения с контроля и на 5,048 см с варианта тетраминодифенилоксид. Однако, в фазе выхода в трубку ситуация с

корневыми системами в вариантах поменялась. Стабильное прохождение фаз развития растениями в контроле позволило обнаружить максимальные величины поверхности длинны корней в этом варианте. Общая поверхность тонких корней ячменя F₁ в контроле составила 66,4 см², в варианте янтарная кислота – 50,96 см², в варианте тетраминодифенилоксид – 47,55 см² (табл. 7).

Таблица 7

**ХАРАКТЕРИСТИКА КОРНЕВОЙ СИСТЕМЫ ЯЧМЕНЯ F₁ В ФАЗЕ ВЫХОДА
В ТРУБКУ ПО ВАРИАНТАМ**

Показатели	Фракции				Общий показатель
	> 5	5-1	1-0,5	< 0,5	
Контроль					
P		0,297	0,216	0,266	0,779
%		38,1	27,8	34,1	100
S		5,97	13,56	46,87	66,4
L		6,35	58,95	600,9	666,2
N		0,00044	0,00025	0,00029	0,00098
Янтарная кислота					
P		0,237	0,166	0,203	0,606
%		39,1	27,4	33,5	100
S		4,77	10,42	35,77	50,96
L		5,07	54,3	458,6	508,97
N		0,00035	0,00019	0,00022	0,00076
Тетраминодифенилоксид					
P		0,222	0,156	0,189	0,567
%		39,1	27,6	33,3	100
S		4,46	9,79	33,3	47,55
L		4,74	42,6	426,9	474,24
N		0,00033	0,00018	0,00021	0,00072

Примечание: фракции – мм; P – масса корня, г; % – процентное выражение массы корней, S – поверхность корней, см²; L – длина корней, см; N – насыщенность почвы корнями, %.

Тонкие корни растений с контроля имеют наибольшую длину. Если общая протяженность корневой системы равнялась 666,2 см, то на долю корешков самой тонкой фракции меньше 0,5 мм, что составляло почти 90,2%. Показатели общей протяженности корневой системы по другим вариантам были близкими и равнялись в варианте янтарная кислота 508,9 см и 474,2 см в варианте тетраминодифенилоксид, что подтверждает влияние реагентов на протяжении всей вегетации растения.

О том, что тетраминодифенилоксид можно использовать как стимулятор в посевах ячменя в эффективных концентрациях, указывают и наблюдения за посевами ячменя F₂. Показатели морфологических особенностей данной формы ячменя в фазу колошения и фазу созревания в варианте тетраминодифенилоксид по изменчивости превосходили норму на 23,3 % по высоте растения, на 14 % по толщине стебля, на 26,5 % по длине листа, на 62,1 % по площади листовой поверхности, на 8,9 % по длине колоса (табл. 8). Растения ячменя F₂ с варианта янтарная кислота, также превышали норму на 0,6 % по высоте, на 18,3 % по площади листовой поверхности, на 10,7 % по длине колоса. На стимулирующее рост растений ячменя F₂ действие тетраминодифенилоксида, указывают значения определения их фитомассы. Показатели фитомассы

растения ячменя F₂ в фазе колошения превышали на 4,038 г аналогичные показатели у растения с контроля и на 1,629 г с варианта янтарная кислота (табл. 9). Причем в составе фитомассы на долю листьев припадает 21,9 %, что на 5,4 % выше, чем в варианте с янтарной кислотой и на 8 % выше чем контроле.

Выводы и предложения. Таким образом, проведенные исследования влияния обработки семян тетраминодифенилоксидом на морфологические показатели растений сельскохозяйственных культур позволили сделать следующие выводы:

1. Обработка тетраминодифенилоксидом семян ячменя посевного в концентрации 0,1% и 0,01% не вызывает эффект торможения роста, а в концентрации 0,01% стимулирует прорастание семян.

2. Однократное опрыскивание посевов озимой пшеницы в фазу отрастания тетраминодифенилоксидом в концентрации 0,01 % вызывало изменчивость морфологических особенностей в сторону превышения нормы по показателю

количества колосьев на одном метре погонном, по всем остальным сравниваемым показателям изменчивости уступали норме и аналогичным показателям в варианте с янтарной кислотой.

Таблица 8

**ХАРАКТЕРИСТИКА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ЯЧМЕНЯ F₂
ПОСЛЕ ОБРАБОТКИ СЕМЯН РЕАГЕНТАМИ**

Морфологические особенности	Варианты				
	обработка тетраминодифенилоксидом		обработка янтарной кислотой		контроль
	данные замеров	изменчивость, % к норме	данные замеров	изменчивость, % к норме	данные замеров
Фаза колошения					
Высота растения, см	112,6	123,3	91,9	100,6	91,3
Толщина стебля, см	0,57	114	0,48	0,96	0,5
Длина листа, см	22,9	126,5	18,1	100	18,1
Ширина листа, см	0,95	111,7	0,9	105,8	0,85
Площадь листовой пластины, см ²	15,4	149,5	11,1	107,7	10,3
Площадь листовой поверхности, см ²	101,5	162,1	74,1	118,3	62,6
Фаза созревания					
Кол-во колосьев на 1 м пог., шт.	217	161,9	206	153,7	134
Общая длина колосьев 1 м пог., шт.	1673	176,2	1616	170,2	949
Длина колоса, см	7,71	108,9	7,84	110,7	7,08
Максимальная длина колоса, см	10	100	12	120	10
Минимальная длина колоса, см	3	150	3	150	2
Кол-во зерен в колосе, шт	23,5	102,2	25	100	23
Вес зерна с колоса, г	1,15	94,2	1,15	94,2	1,22
Вес 1000 зерен, г	45	101,1	44	98,8	44,5

**РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ФИТОМАССЫ ТРАВСТОЯ ЯЧМЕНЯ ПО ВЕРТИКАЛЬНОМУ ГОРИЗОНТУ
В ФАЗУ КОЛОШЕНИЯ, Г**

Варианты	Вертикальный горизонт	Фракции					В % по горизонту
		плоды, соцветия	стебли	листья	опад	сумма по горизонту	
Контроль	Сума по фракциях	0,916	2,881	0,619	0,008	4,424	100
	Сума по фракциях в %	20,7	65,1	13,9	0,3	100	
Янтарная кислота	0-5	-	0,551	0,114	0,012	0,677	9,9
	5-10	-	0,464	0,101	-	0,565	8,3
	10-15	-	0,425	0,089	-	0,514	7,5
	15-20	-	0,37	0,092	-	0,462	6,8
	20-25	-	0,375	0,082	-	0,457	6,7
	25-30	-	0,351	0,063	-	0,414	6,1
	30-35	-	0,334	0,063	-	0,397	5,8
	35-40	-	0,306	0,087	-	0,393	5,7
	40-45	-	0,36	0,063	-	0,423	6,2
	45-50	-	0,303	0,056	-	0,359	5,2
	50-55	-	0,219	0,123	-	0,342	5,1
	55-60	0,064	0,154	0,056	-	0,274	4,1
	60-65	0,065	0,16	0,042	-	0,267	3,8
	65-70	0,076	0,093	0,042	-	0,211	3,1
	70-75	0,165	0,074	0,02	-	0,259	3,7
	75-80	0,156	0,052	0,011	-	0,219	3,2
	80-85	0,162	0,032	0,005	-	0,199	2,9
	85-90	0,167	0,015	0,01	-	0,192	2,8
	90-95	0,198	0,002	0,009	-	0,209	3,1
		Сума по фракциях	1,053	4,64	1,128	0,012	6,833
	Сума по фракциях в %	15,4	67,9	16,5	0,2	100	-
Тетраминодифенилоксид	0-5	-	0,572	0,156	0,049	0,777	9,2
	5-10	-	0,534	0,135	-	0,669	7,9
	10-15	-	0,453	0,112	-	0,565	6,7
	15-20	-	0,493	0,127	-	0,620	7,3
	20-25	-	0,466	0,117	-	0,583	6,9
	25-30	-	0,355	0,115	-	0,470	5,5
	30-35	-	0,372	0,125	-	0,497	5,8
	35-40	-	0,354	0,150	-	0,504	5,9
	40-45	-	0,324	0,136	-	0,460	5,4
	45-50	-	0,277	0,106	-	0,383	4,5
	50-55	-	0,257	0,106	-	0,363	4,3
	55-60	-	0,144	0,106	-	0,250	2,9
	60-65	0,082	0,157	0,086	-	0,325	3,8
	65-70	0,091	0,117	0,066	-	0,274	3,2
	70-75	0,092	0,088	0,056	-	0,236	2,8
	75-80	0,091	0,052	0,035	-	0,178	2,1
	80-85	0,198	0,052	0,035	-	0,285	3,4
	85-90	0,199	0,036	0,024	-	0,259	3,1
	90-95	0,211	0,038	0,024	-	0,273	3,3
	95-100	0,216	0,031	0,013	-	0,260	3,2
100-105	0,091	0,027	0,017	-	0,135	1,6	
105-110	0,043	0,014	0,013	-	0,070	0,8	
110-115	0,026	-	-	-	0,026	0,4	
	Сума по фракциях	1,34	5,213	1,86	0,049	8,462	100
	Сума по фракциях в %	15,8	61,6	21,9	0,7	100	-

3. Обработка семян ячменя посевного тетраминодифенилоксидом в концентрации 0,5 % перед посевом, вызывает изменение морфологических особенностей растения на протяжении всего периода вегетации, причем показатели фиксировали превышение к норме весь период, исключая послевсходовый.

4. Изменение морфологических особенностей корневых систем растений под воздействием тетраминодифенилоксида выражено в увеличении доли фракции мелких корней, общей поверхности и длины.

Литература

1. Минеев В. Г., Павлов А. Н. Агрохимические основы повышения качества зерна/ В.Г. Минеев, А. Н. Павлов. – М.: Колос, 1981. – 288с.

2. Ренкова Л. В. Эпин и вегетативное размножение декоративных растений // Цветоводство. – № 3. – С. 16–12.

3. Петрухин И. В. Корма и кормовые добавки/ И.В. Петрухин. – М.: Росагропромиздат, 1989. – 20 с.

4. Лейкин А. Ю. Ароматические полибензимидазол для высокотемпературных

мембран/ А.Ю. Лейкин // автороферат диссертации на соискание канд. хим. н. – Москва, РХТУ им. Д. И. Менделеева, 2009. –122 с.

5. Догадина М. А., Митренко Д. А. Влияние биокремнийорганического стимулятора роста растений. Мивал-Агро на продуктивность зерновых культур // Вестник. Орел ГАУ. – 2015 – № 3 (08). – С.24 –28.

6. Карманенко Н. М. Сортовая реакция зерновых культур на низкие температуры, условия закисления и ионы аммония // Сельскохозяйственная биология. – 2014. – №5. – С. 66–77.

7. Доспехов В. М. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследования). – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.

8. Узбек И. Х. Метод вивчення корневих систем // Вісник аграрної науки. – 2002. – №10. – С. 27–30.

9. Панфилова О.Ф., Пильщиков Н. В., Фаттахова Н. Н. Практикум по физиологии и биохимии растений. – М.: РГАУ – МСХА им. К.А. Тимирязева. 2012.– 50 с.

МЕДИЦИНСКИЕ НАУКИ

Koszcůk S.A

GUO "Białoruska akademia medyczna kształcenia podyplomowego"
Republika Białoruś, Mińsk

ZMIANY W GENACH CZYNNIKÓW ZJADLIWOŚCI DROBNOUSTROJÓW W MONO - I MIXT-INFEKCJACH

Ważne zmiany w poglądach dotyczą infekcji, pojęcie którego otrzymuje swój dalszy rozwój poprzez badania rozwijających się na podstawie długotrwałego utrzymywania się chorobotwórczych mikroorganizmów wymazane, nietypowe, wolno płynących, przewlekłych procesów patologicznych lub bezobjawowe formy, częstotliwość których okazało się niewspółmiernie większej niż częstość ostrych form zakażenia. Zgromadzone w ostatnim czasie dane o powszechności wielu patogenów z całą oczywistością udowadniają, że każdy proces zakaźny, w istocie jest tylko oddzielny komponent rozwijającego się w organizmie procesu mieszanego zakażenia, którego uczestnikami są przedstawiciele różnych grup taksonomicznych mikroorganizmów.

Wyniki badań genetycznych pozwoliły odkryć, że rozwój infekcji często może być ze względu na nietypowe, wadliwe patogenów, co prowadzi do powstawania patologii, znacznie różni się w swej manifestacji od obrazu klinicznego, typowy dla tego mikroorganizmu. Procesy te często są niedostępne dla diagnostyki rutynowymi metodami, co spowodowało konieczność rozwoju techniki molekularne – biologicznego wskazania czynników chorobotwórczych, z kolei patrząc pojęcia o molekularnych mechanizmach patogenezы infekcji [2, 3].

Obecnie w zadania mikrobiologów i genetyków wchodzi identyfikacja czynników zjadliwości bakterii różnych gatunków, ocena ich znaczenia w realizacji określonych faz infekcji i zapewnieniu ochrony mikroorganizmów przed infekcjami. Należy odróżnić uwarunkowania (czynniki) patogenicy, niezależne dla wyrażenia patogenicy rodzaju, i tzw. markerów zjadliwości, wygodne do identyfikacji patogennych szczepów, ale nie koniecznie określające właściwość. Ważnym wydaje się również i objaśnienia chemicznej natury czynników zjadliwości i nauka ich genetycznej kontroli, co leży u podstaw tworzenia nowych produktów diagnostycznych i operacji szczepów, które mogą być wykorzystane w charakterze środków zapobiegawczych, a także do późniejszego tworzenia biwalentną i poliwalentną szczepionek metodami inżynierii genetycznej [1, 2].

Mykoplazmy i Ureaplasma – najmniejsze (0,15-0,30 μm) wśród prokariota mikroorganizmy zdolne do samodzielnego metabolizmu i reprodukcji [2, 5]. Według współczesnej klasyfikacji chorobotwórcze dla człowieka mykoplazmy i ureaplasma zalicza się do klasy Mollicutes, kolei Mycoplasmatales, rodziny Mycoplasmataceae, który zawiera mikroorganizmy dwóch rodzajów: Mycoplasma i przez ureaplasma. Do

rodzaju Mycoplasma należą rodzaje M. pneumoniae, M. genitalium, które są patogenne dla człowieka i M. hominis, M. fermentans – warunkowo chorobotwórcze. Do rodzaju przez ureaplasma odnoszą się widok U. urealyticum – warunkowo-patogeny patogen, który na podstawie wyników filogenetyczny analizy dzieli się na dwa biowar U. urealyticum i U. parvum. Każdy z produktów zawiera kilka serotypów: U. urealyticum – 10 serotypów (2, 4, 5, 7-13), U. parvum – 4 serotype (1, 3, 6, 14) [1, 2, 4].

Przejawem chorobotwórczych działania mykoplazmy i ureaplasma na organizm człowieka wiąże się z ich biologicznymi właściwościami: małe wymiary komórki i genomu, brak ściany komórkowej, podobną strukturę błony komórkowej z błonami komórek organizmu gospodarza, zmienność genomu i wsp. [4, 5].

Genom mykoplazmy i ureaplasmas jest reprezentowany przez okrągłą dwuniciową cząsteczkę DNA. Rozmiar genomu wynosi 580–1600 tys. N.p. i jest najmniejszy wśród prokariotycznych mikroorganizmów zdolnych do samoreplikacji. Zakłada się, że ilość informacji genetycznej dostępnej dla mykoplazm i ureaplasmas jest na dolnej granicy dla stworzeń zdolnych do samoreprodukcji. Pomimo ograniczonej zdolności informacyjnej genomu mikoplazmy i ureaplasmas, te mikroorganizmy mają zdolność do wspierania metabolicznych procesy na wysokim poziomie wystarczającym do zapewnienia ich wzrostu i reprodukcji. Mykoplazmy narządów płciowych i ureaplasmas mają również duży zestaw mechanizmów ochronnych, które pomagają im uciec z systemów obronnych gospodarza i przetrwać w wyjątkowo niesprzyjających warunkach, w tym w komórkach eukariotycznych [2, 5].

Patogeniczność patogenu, który jest główną właściwością każdego czynnika zakaźnego, można zdefiniować jako potencjalną zdolność mikroorganizmu do spowodowania rozwoju procesu zakaźnego. Patogeniczność jest genetycznie zdeterminowaną cechą, która determinuje powstawanie czynników wirulencji, w zależności od obecności określonych genów w genomie mikroorganizmu [2, 7].

Z kolei czynniki wirulencji są fenotypową ekspresją patogennego genotypu i mogą objawiać się bezpośrednimi czynnikami toksycznymi i pośrednimi (potencjalnymi) czynnikami chorobotwórczymi [6, 8].

Bezpośrednie toksyczne czynniki chorobotwórcze obejmują tworzenie inwazyjnych, agresywnych, egzotoksyn, endotoksyn, enzymów toksynowych, alergenów i innych substancji, które niekorzystnie wpływają na komórki makroorganizmu. Czynniki pośrednie

(potencjalne) obejmują czynniki chorobotwórcze, które zapewniają adhezję, kolonizację i przetrwanie mikroorganizmu w obrębie makroorganizmu [3, 4].

Cząsteczki determinujące immunopatogenezę procesu zakaźnego to cząsteczki o wysokiej immunogenności. Należy zauważyć, że skład tej grupy w dużej mierze zależy od statusu genetycznego mikroorganizmu. Niektóre cząsteczki, które mogą uczestniczyć w immunopatogenezie zakażeń układu moczowo-płciowego mykoplazmy i moczowodów są kodowane przez bardzo zmienne geny, a odpowiednie produkty mogą być wysoce immunogenne lub nie. Różne mutacje w genach cząsteczek immunopatogenezy Potrafi także określić, w jaki sposób mikroorganizm wchodzi w interakcje z układem odpornościowym gospodarza, co jest niezwykle ważne dla przewidywania przebiegu zakażenia i określenia charakteru terapii [4, 6].

M. hominis zawiera układ genetyczny, który umożliwia in vivo zmianę repertuaru antygenowego związanego z błoną, co jest jednym z mechanizmów unikania działania układu odpornościowego. Jedną z takich cząsteczek jest produkt genu P120'. Przegrupowania w genie P120', które występują pod wpływem pewnych czynników zewnętrznych i / lub wewnętrznych, prowadzą do zmian w strukturze produktu tego genu, co zapewnia zmianę w powierzchniowym składzie antygenowym patogenu [2, 7, 8].

MBA *U. urealyticum* - główny antygen wiążący, który jest rozpoznawany przez układ odpornościowy gospodarza po zakażeniu patogenem, zawiera miejsca specyficzne dla serowarów i epitopy reaktywne krzyżowo. MBA jest kodowany przez gen, którego 2/3 zawiera identyczne 18-nukleotydowe sekwencje powtarzające się w tandemie. Zmiany w tych powtarzających się regionach prowadzą do zmian wielkości polipeptydu MV, co wpływa na jego zdolność do interakcji z układem odpornościowym [2, 6, 7, 8].

Aby zbadać rearanżacje aparatu genetycznego patogenów podczas infekcji mono- i mieszanej oraz ustalić możliwy związek między charakterem infekcji mykoplazmami narządów płciowych i ureaplasmas a zmianami strukturalnymi w systemach patogenności tych mikroorganizmów, obecnością mutacji, zbadaliśmy 10 próbek materiału biologicznego zawierającego *M. hominis*, *U. urealyticum* w postaci monoinfekcji, 25 próbek materiału biologicznego zawierającego *M. hominis*, *U. urealyticum* z infekcją mieszaną. Podczas eksperymentu wykorzystano również 2 szczepy referencyjne: *M. hominis* - szczep H 34 i *Ureaplasma urealyticum* - szczep VIII. Do analizy wybrano geny, których produkty są jednym z czynników patogenności tych patogenów, a mianowicie gen P120' *M. hominis*, gen MV *U. urealyticum* [2, 7].

Badanie przeprowadzono przy użyciu kompleksu metod, w tym PCR, analizy sekwencji nukleotydów poprzez sekwencjonowanie PCR (analiza sekwencji). Na początkowym etapie obecność czynników zakaźnych w materiale biologicznym określono za

pomocą wysokiej jakości PCR. W każdej próbie materiału biologicznego obecność genów ureB została jakościowo określona metodą PCR *U.urealyticum*, 16sRNA *M.hominis* za pomocą zestawów diagnostycznych Amplisens (NIIEMZ RF) [1, 2].

Ponadto, aby zidentyfikować procesy reorganizacji w genach, które kontrolują powstawanie czynników chorobotwórczych patogenów, zastosowaliśmy analizę sekwencji sekwencji nukleotydowej genów P120' *M. hominis*, MB *U. urealyticum*.

Do amplifikacji określonych fragmentów P120' *M. hominis*, genu MB genu *U. urealyticum*, zastosowano startery:

M.h.P120'f 5'-
GAGGAATTTCAACTGGTGTCC -3' (forward)

M.h.P120'r 5'- CTGTTGTAATAGCATTAAAG
-3' (reverse),

konkretna długość fragmentu 510 p.o.

U.u.MBf 5'-
GTATTTGCAATCTTTATATGTTTTTCG
-3' (forward)

U.u.MBr 5'-
ACCTGGTTGTGTAGTTTCAAAGTTCAC
-3' (reverse),

konkretna długość fragmentu 602 p.o.

Analiza sekwencji obejmowała kilka etapów. W pierwszym etapie zamplifikowane fragmenty DNA specyficznych genów P120' *M. hominis* i MB *U. Urealyticum* oczyszczono za pomocą kolumn Centricon-100, a następnie zsekwencjonowano PCR ze specyficznymi starterami. Sekwencjonowane fragmenty oczyszczono za pomocą zestawu BigDye X Terminator Purification Kit, a następnie elektroforezy stosując analizator genetyczny ABI Prism 310.

Dane sekwencji nukleotydowej próbek zbadano przy użyciu wyszukiwarki nukleotydów BLAST.(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html) w celu ustalenia, czy określona sekwencja należy do określonego genu. Następnie uzyskane dane przeanalizowano, a sekwencje nukleotydowe DNA patogenów podczas infekcji mono- i mieszanej porównano z sekwencją nukleotydową szczepów referencyjnych. Wyniki analizy sekwencji dla szczepów referencyjnych i próbek testowych analizowano przy użyciu systemu BLAST.

Wszystkie analizowane próbki materiału genetycznego zidentyfikowano jako należące do genu P120' *M. hominis* - 36 próbek (10 próbek z materiału biologicznego z monoinfekcją, 25 próbek z mieszaną infekcją, 1 szczep referencyjny H 34 *M. hominis*) i genu MB *U. urealyticum* - 36 próbek (10 próbek z materiału biologicznego z monoinfekcją, 25 próbek z infekcją mieszaną, 1 szczep referencyjny VIII *U. urealyticum*).

Wstępna analiza obecności lub braku mutacji w genach P120' *M. hominis*, MB *U. Urealyticum* poprzez analizę sekwencjonowania ujawniła, że w przypadkach monoinfekcji mutacje stwierdzono w genie P120' *M. hominis* w 10% przypadków oraz w genie MV *U. urealyticum* - w 20% przypadków. W analizie obecności braku mutacji w przypadku mieszanej

infekcji zmiany w genie *M. hominis* P120 wykryto w MV zmiany w strukturze DNA wykryto w 44% 40% analizowanych próbek, w genie *U. urealyticum* przypadków (Tabela 1).

Tabela 1

WYNIKI WSTĘPNEJ OCENY ANALIZY SEKWENCJI W GENACH P120 ' M. HOMINIS, MV U. UREALYTICUM

Charakter infekcji	Obecność lub brak mutacji (nie / tak), liczba próbek			
	P120' gen <i>M. hominis</i>		MB gen <i>U. urealyticum</i> .	
	nie	tak	nie	tak
Mono infekcji	9 (90,0%±28,3%)	1 (10,1%±6,7%)	8 (80,0%±23,4%)	2 (20,0%±11,3%)
Mieszane infekcji	15 (60,0%±34,6%)	10 (40,0%±21,4%)	14 (56,0%±25,2%)	11 (44,0%±15,9%)

Wstępne wyniki analizy obecności-braku zmian w strukturze DNA można uznać za potwierdzenie wzmocnienia procesów reorganizacji w aparacie genetycznym patogenów *M. hominis* i *U. urealyticum* powiązane infekcje dróg moczowo-płciowych, w porównaniu z wariantem monoinfekcji tymi patogenami.

W celu głębszego badania mutacji, które wystąpiły, przeprowadzono szczegółową analizę

sekwencji nukleotydowej uzyskanej przez sekwencjonowanie PCR. Próbkę DNA patogenów izolowanych z materiału biologicznego podczas infekcji mono- i mieszanych porównano ze szczepami referencyjnymi (szczep H 34 *M. hominis*, szczep VIII *U. urealyticum*) patogenów. Wyniki badania przedstawiono w tabelach 2, 3.

Tabela 2

ANALIZA SEKWENCJI PRÓBEK M. HOMINIS ZAWIERAJĄCYCH MUTACJE W PORÓWNANIU ZE SZCZEPEM REFERENCYJNYM H 34 M. HOMINIS

Próbka <i>M.hominis</i>	Podstawienie nukleotydów w P120' gen								
	234	297	300	379	394	396	405	500	552
H 34	C	T	A	A	G	C	C	G	A
18	T	C	—	—	A	—	T	—	G
1, 6, 10, 12	—	—	—	C	—	—	—	T	—
4-mono, 4,7,9	—	—	—	—	A	—	T	—	—
13,25	—	C	C	—	—	T	—	—	G

W wyniku analizy zmian w sekwencji nukleotydowej genu P120 *M. hominis* podczas infekcji mono- i mieszanej stwierdzono, że na 10 analizowanych próbek DNA patogenów podczas monoinfekcji wykryto mutacje w 1 przypadku, a liczba wykrytych substytucji nukleotydów wynosiła 2 : w pozycji 394 zastąpienie to G → A, a w pozycji 405 zastąpienie to C → T. Podczas analizy 25 próbek DNA patogenów podczas mieszanej infekcji mutacje

wykryto w 10 przypadkach. W 1 próbce liczba podstawień wynosiła 5: w pozycji 234, podstawienie C → T, 297 - T → C, 394 - G → A, 405 - C → T, 552 - A → G. Wykryto cztery podstawienia nukleotydów w 2 próbkach w pozycji 297, zastąpienie T → C, 300 - A → C, 396 - C → T, 552 - A → G. Każda z 7 próbek miała 2 podstawienia nukleotydów: 4 próbki w pozycji 379 A → C i w pozycji 500 G → T, a 3 próbki w pozycji 394 zastąpiły G → A i w pozycji 405 zastąpić C → T.

Tabela 3

ANALIZA PRÓBKU U. UREALYTICUM, ZAWIERAJĄCE MUTACJE W PORÓWNANIU Z ODNIESIENIEM SZCZEPY UREAPLASMA UREALYTICUM

Próbka <i>U. Urealyticum</i>	Podstawienie nukleotydów w MB gen				
	105	134	138	153	187
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	T	A	T	C	C
5-mono, 2,18	—	G	—	—	—
1,3,9,11	C	—	C	A	A
1-mono,10,13, 15,22, 24	—	G	C	—	—

Podczas badania podstawień nukleotydowych w sekwencji genu *U. urealyticum* MV podczas infekcji mono- i mieszanej stwierdzono, że na 10 analizowanych próbek DNA patogenów podczas monoinfekcji wykryto mutacje w 2. W próbce 1-mono wykryto 2 substytucje: 134 - A → G, 138 - T → C, w

próbce 5-mono 1 zidentyfikowano zmianę w pozycji 134 A → G. Podczas analizy 25 próbek patogenów DNA podczas mieszanej infekcji, mutacje wykryto w 11. W 2 próbkach, 1 podstawienie nukleotydów zainstalowano w pozycji 134 A → G. Zastosowano 2 podstawienia nukleotydów b Ci zidentyfikowane w 5

próbek: 134 – A → G, 138 – T → C. 4 próbki DNA zawierały 4 podstawienia: 105 - T → C, 138 – T → C, 153 – C → A, 187 – C → A.

Zatem w złożonej analizie wyników badań genetycznych molekularnych stwierdzono, że w próbkach DNA patogenów podczas monoinfekcji liczba próbek z mutacjami wynosiła 10-20%, zaś liczba wykrytych podstawień nukleotydowych wynosiła 1-2 mutacje w analizowanym genie (P120 „*M. hominis*”, MB genu *U. Urealyticum*).

W wyniku badania zmian w sekwencji nukleotydowej w genach, które kontrolują powstawanie czynników patogenności, patogenów, podczas mieszanej infekcji, mutacje wykryto w 40–44% próbek poddanych analizie. Stwierdzono również, że w przypadku towarzyszących infekcji występuje nie tylko wzrost częstotliwości rearanżacji, ale także wzrost liczby podstawień nukleotydów w obrębie tego samego genu, na przykład podczas mieszanej infekcji, w 12-16% próbek odnotowano 3 lub więcej substytucji (tabela 4).

Tabela 4

WYNIKI KOMPLEKSOWEGO MOLEKULARNEGO BADANIA GENETYCZNEGO PRÓBEK *M. HOMINIS*, *U. UREALYTICUM* DLA MUTACJI

Charakter infekcji	Wzbudnica	Ogólna liczba próbek	Liczba próbek, w których wykryto mutacje	Liczba Próbką z 1-2 mutacji	Liczba Próbką z 3 i więcej mutacją
Mono zakażenie	<i>M.h.</i>	10 (100%)	1 (10%)	1 (10%)	0 (0%)
	<i>U. u.</i>	10 (100%)	2 (20%)	2 (20%)	0 (0%)
Mixt zakażenie	<i>M.h.</i>	25 (100%)	10 (40%)	7 (28%)	3 (12%)
	<i>U. u.</i>	25 (100%)	11 (44%)	7 (28%)	4 (16%)

Zastosowanie metody analizy sekwencji pozwoliło nam wiarygodnie ustalić obecność przegrupowań w genach kontrolujących powstawanie czynników chorobotwórczych *M. hominis*, *U. urealyticum*, których transformacja prowadzi do zmiany właściwości czynnika zakaźnego. Jednak mechanizm, który aktywuje łańcuch zdarzeń genetycznych, które ostatecznie stają się przyczyną zmiany poziomu patogenności, pozostaje niejasny. Ponadto podczas badania wykazano, że obecność powiązanych infekcji prowadzi do nasilenia procesów reorganizacji genomu patogenów, co można uznać za potwierdzenie wzajemnego aktywnego działania patogenów na siebie w ramach skojarzeń.

Obecność przegrupowań w genach patogenów potwierdza, że podczas krążenia w organizmie gospodarza czynnik patologiczny ulega zmianom adaptacyjnym, których celem jest uniknięcie eliminacji. Procesy transformacji zachodzące w genomie patogenów podczas uporczywości są spowodowane zarówno interakcją czynnika patologicznego z komórkami organizmu gospodarza, jak i wzajemnym wpływem w obrębie stowarzyszenia, w obecności mieszanych infekcji. Mechanizm powstawania przewlekłych i uporczywych infekcji jest nierozzerwalnie związany, a mianowicie ze zdolnością patogenów do zmiany czynników chorobotwórczych, w wyniku czego organizm gospodarza nie może rozpoznać i wyeliminować czynnika zakaźnego.

Obecność wykrytych związków między mikroorganizmami może wskazywać, po pierwsze, procesy komunikacji międzykomórkowej, a po drugie, o pewnych powiązaniach kooperacyjnych. Takie relacje, charakterystyczne dla populacji organizmów (i w pewnym sensie, przez analogię z pierwotniakiem, bakterię można również uznać za „organizm komórkowy”), wymagają specjalnych szczegółowych

badań z wykorzystaniem różnych metod diagnostycznych.

Dalsze badania w zakresie reorganizacji genomu *M. hominis* i *U. urealyticum* mogą znacznie pomóc w ustaleniu mechanizmów, które przyczyniają się do powstawania trwałej infekcji, a także w identyfikacji czynników wywołujących kaskadę zmian genetycznych w genomie patogenów.

Lista literatury:

1. Badigina N.A., Kostyuk S.A. Oznaczanie względnego stężenia mykoureaplasmas w reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym // *Medical News*. – 2006. – № 10. – C.106–110.
2. Koszćuk S.A. Kliniczna diagnostyka laboratoryjna powiązanych zakażeń układu moczowo-płciowego: monografia / S.A. Koszćuk. - Mińsk: BelMAPO, 2012. – 306 c.
3. Koszćuk, S.A. Molekularne podstawy uporczywości chlamydii / S.A. Koszćuk, O.S. Poluyan // *Vesci NAS Belarus. Ser. kochanie navuk*. – 2012. - №1. – C.109-115.
4. Borchsenius C.N., Chernova O.A., Chernov V.M., Voinsky M.S. *Mykoplazmy. Biologia molekularna i komórkowa, interakcja z układem odpornościowym ssaków, patogenność, diagnoza*. St. Petersburg: Science, 2002.
5. Hjorth, S.V., Bjornelius, E., Lidbrink, P., Falk, L., Dohn, B., Berthelsen, L., i in. Typowanie *Mycoplasma genitalium* na podstawie sekwencji ujawnia przenoszenie płciowe // *J Clin Microbiol* – 2006 – Vol. 44 – P. 2078–2083.
6. Liang Ma, Jørgen S. Jensen i in. *Mycoplasma genitalium: skuteczna strategia generowania zmienności genetycznej z minimalnego genomu* // *Mol. Microbiol.* - 2007 obj. 66 N 1 – P. 220-236.

7. Razin, S., Yogev D., Naot Y. *Biologia molekularna i patogeniczność mykoplazmy* // *Microbiology and Molecular Biology Reviews* - 1998. - Vol.62 N 4- P.1094-1156.

8. Santoyo, G. i Romero, D. *Konwersja genów i skoordynowana ewolucja genomów bakteryjnych* // *FEMS Microbiol Rev* – 2005 – Vol. 29 – P. 169–183.

Zavgorodniy S. M.

Doctor of medicine, professor

Zaporizhzhia state medical University, Ukraine

Kubrak M. A.

Assistant

Zaporizhzhia state medical University, Ukraine

Danilyuk M. B.

PhD, assistant

Zaporizhzhia state medical University, Ukraine

Rylov A. I.

PhD, associate professor

Zaporizhzhia state medical University, Ukraine

THE QUALITY OF LIFE OF PATIENTS WITH THYROID PATHOLOGY AFTER SIMULTANEOUS AND ISOLATED OPERATIONS

Summary. Relevance. In connection with the wide spread of simultaneous surgical interventions, there is an insignificant number of works, indicating the deterioration of perioperative condition and subsequent rehabilitation of patients after such operations. The quality of life of patients after simultaneous and isolated surgical interventions is an important aspect of a comparative assessment.

Purpose of research. To conduct a comparative assessment of the quality of life of patients after simultaneous and isolated operations by means of a survey using a standardized questionnaire "SF – 36".

Materials and methods. The main group included 35 patients with combined pathology of the thyroid gland (TG) and cholelithiasis (GL) / gallbladder polyposis who underwent simultaneous operations. The comparison group included 35 patients with thyroid disease who underwent isolated interventions. Six months following the surgery, the patients of both groups were interviewed using a standardized questionnaire "SF-36 Health Status Survey".

Results. The level of physical health of patients of the main group was estimated as 49.4 ± 4.1 points. In patients of the comparison group, who survived isolated operations on TG, the physical health index was 47.9 ± 3.8 points, $U = 461.0$; $p = 0.076$. Mental health index in patients of the main group was at the level of 46.9 ± 3.5 points; comparison group - 45.4 ± 3.9 points, $U = 587.0$; $p = 0.769$.

Conclusions.

1. The level of physical health of patients after simultaneous surgical interventions in postoperative period, statistically does not differ from the same indicator in patients who underwent isolated operations: $U = 461.0$; $p = 0.076$.

2. The indicator of mental health in patients of the main group does not differ statistically from its level in the comparison group: $U = 587.0$; $p = 0.769$.

3. Simultaneous surgical interventions in patients with thyroid pathology do not worsen the quality of life of patients compared with isolated operations.

Relevance

The pathology of TG has been ranked first among endocrine diseases with an incidence of 9.9 – 11.3 cases per 100 thousand population for many years [5], [6], [9], [12]. At the same time, in 20 – 30 % of patients there is a combined surgical pathology of other organs [8], [10], [11].

Due to the fact that simultaneous surgical interventions have been widely performed, isolated works on the topic start to appear, in which the deterioration of the perioperative state and subsequent rehabilitation of patients after such operations are being described [1], [2].

Given the fact that simultaneous interventions tend to gain popularity increasingly popular among surgeons, it is important to assess the quality of life of patients after such operations and compare these results

with the data received after isolated surgical interventions.

Purpose of research

To conduct a comparative assessment of the quality of life of patients after simultaneous and isolated operations by means of a survey using a standardized questionnaire "SF – 36".

Materials and methods

The main group included 35 patients with combined pathology of TG and CL / gallbladder polyposis. The comparison group consisted of 35 patients with isolated pathology of the TG.

All patients were examined and operated on the basis of "Zaporizhzhia City clinical hospital of emergency and ambulance".

The gender structure of both groups was dominated by women - 32 (91.4 %), men was 3 (8.6 %), $U = 620.0$; $p = 1.0$.

The main age of patients in the main group was 58.8 ± 9.9 years; in the comparison group - 56.5 ± 10.9 years, $U = 536.0$; $p = 0.372$.

The main pathology was similar for the main and the comparison groups: $U = 581.0$; $p = 0.641$, Fig. 1.

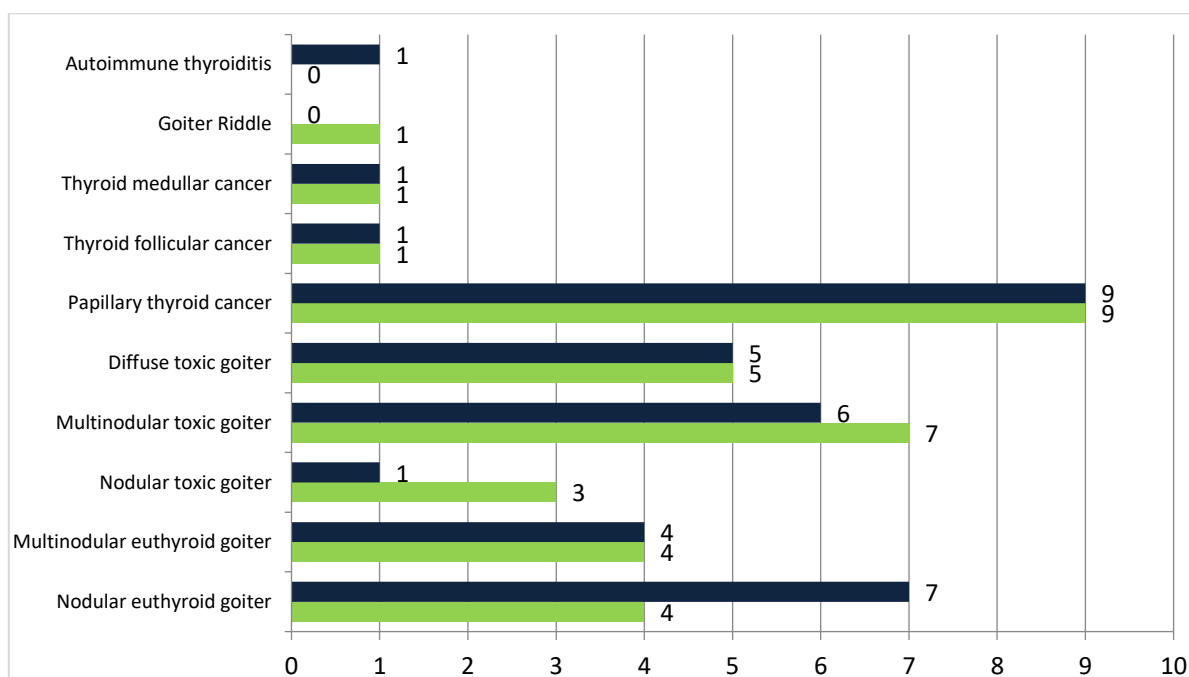


Figure 1. - Structure of the main pathology in patients of the main and comparison groups, $U = 581.0$; $p = 0.641$

All patients of the main group – 35 (100 %) comparison group - 35 (100 %) underwent isolated or simultaneous operations. Patients of the thyroid interventions, tab. 1.

Table 1

THE STRUCTURE OF SURGICAL INTERVENTIONS IN PATIENTS OF THE MAIN AND COMPARISON GROUPS

Operation	Main group, n = 35		Comparison group, n = 35		Total, n = 70	
	Num.	%	Num.	%	Num.	%
Hemithyroidectomy	0	0	9	25,7	9	12,9
Thyroidectomy	0	0	15	42,9	15	21,4
Thyroidectomy with lymphodissection	0	0	11	31,4	11	15,7
Hemithyroidectomy + laparoscopic cholecystectomy	9	25,7	0	0	9	12,9
Thyroidectomy + laparoscopic cholecystectomy	15	42,9	0	0	15	21,4
Thyroidectomy with lymphodissection + laparoscopic cholecystectomy	11	31,4	0	0	11	15,7

All operations were performed as planned, under general anesthesia with tracheal intubation and artificial lung ventilation.

The average length of stay of the patients of the main group in the hospital was 9.6 ± 1.6 days; comparison group - 8.5 ± 1.2 days, $U = 393.5$; $p = 0.0073$.

6 months following the surgical intervention the patients of the main and comparison groups participated in a survey based on a standardized questionnaire "SF-36 Health Status Survey" (Ware J. E. et al., 1993).

Statistical processing of the results was carried out with the help of application software packages STATISTICA 13.0, TIBCO Software inc. (License JPZ804I382130ARCN10-J) and MICROSOFT EXCEL 2013 (License 00331-10000-00001-AA404) using nonparametric analysis methods: Mann-Whitney (U) test for related groups.

Indicators of quality of life of patients on the scales of the questionnaire "SF-36", 6 months after simultaneous and isolated surgery, demonstrate statistically similar values, tab. 2.

Table 2

INDICATORS OF QUALITY OF LIFE OF PATIENTS OF THE MAIN AND COMPARISON GROUPS ON SCALES OF THE QUESTIONNAIRE "SF-36»

Indicator of scale	Main group, n = 35	Comparison group, n = 35	Statistic
Physical functioning (PF)	81,3 ± 7,2	80,7 ± 8,1	U = 564,0 p = 0,127
Role functioning (physical) (RF)	63,2 ± 11,3	64,1 ± 12,3	U = 581,0 p = 0,314
Bodily pain (BP)	87,2 ± 7,8	87,7 ± 9,4	U = 474,0 p = 0,701
General health (GH)	68,3 ± 6,1	66,2 ± 6,7	U = 467,0 p = 0,498
Vitality (VT)	69,5 ± 9,8	67,7 ± 10,1	U = 521,0 p = 0,597
Social functioning (SF)	79,4 ± 6,7	78,1 ± 6,8	U = 546,0 p = 0,781
Role functioning (emotional) (RE)	76,9 ± 5,9	77,1 ± 5,2	U = 414,0 p = 0,476
Psychological health (MH)	51,1 ± 4,5	52,0 ± 4,8	U = 621,0 p = 0,864

The level of physical health of patients of the main group was 49.4 ± 4.1 points. In patients of the comparison group, after isolated operations on TG, the physical health index was 47.9 ± 3.8 points, $U = 461.0$; $p = 0.076$.

Mental health index in patients of the main group was at the level of 46.9 ± 3.5 points; comparison group - 45.4 ± 3.9 points, $U = 587.0$; $p = 0.769$.

Discussion

Many authors note that the evaluation of long-term results in patients after surgery is one of the main indicators of the effectiveness of the chosen method of treatment of a pathology [4], [7]. The quality of life of the patient after surgery is the criterion that objectively indicates the advantages or disadvantages of surgery. Many different methods have been developed for its evaluation, but it is the survey that takes the leading place among them [1].

Using the questionnaire "SF-36 Health Status Survey" (Ware J. E. et al. 1993) allows to assess fully both physical and mental health of the patient at any stage of his treatment [3].

The the survey of literature shows that the issue of simultaneous operations in patients with combined diseases of the endocrine and other organs remains very relevant and debatable due to the lack of amount of accumulated experience in this area. Assessment of the quality of life of patients who survived these kinds of surgeries is presented only in rare works, and results obtained are quite contradictory.

Conclusions

1. The level of physical health of patients after simultaneous surgical interventions in the postoperative period, statistically does not differ from the same indicator in patients who underwent isolated operations: $U = 461.0$; $p = 0.076$.

2. The indicator of mental health in patients of the main group does not differ statistically from its level in the comparison group: $U = 587.0$; $p = 0.769$.

3. Simultaneous surgical interventions in patients with thyroid pathology do not worsen the quality of life of patients compared with isolated operations.

Conflict of interest: none.

References

1. Doroshina T. B. Ways to improve the quality of life of surgical patients with thyroid cancer / T. B. Doroshina, M. R. Ascetics, Zhmyleva O. A. // Vestnik of surgery named. I. I. Grekova. – 2015. - № 4. – Volume 174. – P. 50 – 52. DOI: <https://doi.org/10.24884/0042-4625-2015-174-4-50-52>.
2. Quality of life in patients with concomitant diseases of abdominal cavity organs and retroperitoneal space after simultaneous videoendoscopic and traditional operations / A. I. Murodov, Z. A., Kadyrov, A. Y. Adilov [and other] // Medical Bulletin of Barcodescan. – 2017. - № 3 (69). – Volume 12. – P. 48 – 51. Access mode: https://mvsb-smu.ru/files/journals/3_2017.pdf.
3. Assessment of the quality of life of patients operated on for nodular lesions of the thyroid gland / V. V. Fisherman, A. V. Levashov, E. I. Rossoshansky [et al.] // Kurskiy scientifically-practical Herald "Persons and his health". – 2011. - № 1. – P. 72 – 75.
4. Sadriev O. N. Simultaneous operations in surgical diseases of the adrenal glands / O. N. Sadriev, A.D. Gaibov // Surgery News. – 2014. - № 6. – Volume 22. – P. 678 - 86. DOI: <http://dx.doi.org/10.18484/2305-0047.2014.6.678>.
5. Simultaneous operations in patients with gallstone disease and surgical pathology of endocrine organs / M. P. Pavlovsky, V. I. Kolomyitsev, M. A. Syroid [and other] // Clinical endocrinology and endocrine surgery. – 2010. - № 1 (30). – P. 16. - 19. DOI: [https://doi.org/10.24026/1818-1384.1\(30\).2010.96345](https://doi.org/10.24026/1818-1384.1(30).2010.96345).
6. Cherenko S. M. Simultaneous operations on the thyroid and parathyroid glands and their impact on

the development of postoperative hypocalcemia / S. M. Cherenko, S. A. Sheptuha // *Clinical endocrinology and endocrine surgery*. – 2015. - №1 (49). – P. 14 - 18. DOI: [https://doi.org/10.24026/1818-1384.1\(49\).2015.74440](https://doi.org/10.24026/1818-1384.1(49).2015.74440).

7. An evaluation of the effectiveness of combined cardiac and thyroid surgery of patients with a high perioperative risk / M. Trystuła, B. Kapelak, T. Kruczek [et al.] // *Acta Neuropsychologica*. – 2016. - Vol. 14, Issue 3. – P. 20 - 21. DOI: <https://doi.org/10.5604/17307503.1216043>.

8. Concurrent endocrine and other surgical procedures: an institutional experience / R. Morris, Tina W. F. Yen, K. Doffek [et al.] // *Journ. Surg. Research*. – 2017. – Vol. 211. – P. 107 – 113. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jss.2016.12.013>.

9. Does concomitant thyroidectomy increase risks of parathyroidectomy? / C. M. Kiernan, C. Schlegel, S. Kavalukas [et al.] // *The Journal of*

Surgical Research. – 2016. - № 203 (1). – P. 34–39. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jss.2016.03.059>.

10. Laparoscopic cholecystectomy and concomitant diseases / P. Caglia, A. Tracia, L. Amodeo [et al.] // *Ann. Ital. Chir.* – 2016. - Vol. 87. – P. 524 - 527. Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26898949>.

11. Surgical treatment of concomitant thyroid and parathyroid disorders: analysis of 4882 cases / M. D. Jovanovic, V. R. Zivaljevic, A. D. Diklic [et al.] // *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. – 2017. – Vol. 274, Issue 2. - P. 997 – 1004. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00405-016-4303-z>

12. Thyroid cancer incidence in simultaneous thyroidectomy with parathyroid surgery / S. Emirikçi, B. Özçınar, G. Öner [et al.] // *Ulusal Cerrahi Dergisi*. – 2015. - № 31 (4). – P. 214–217. DOI: <https://doi.org/10.5152/UCD.2015.2666>.

UDC 616-001.17-001.4:547.96:57.084

Натрус Л. В.

доктор медичних наук, професор,

Національний медичний університет імені О.О.Богомольця

Мироненко О.І.

Національний медичний університет імені О.О.Богомольця

Панова Т. І.

доктор медичних наук, професор,

Національний медичний університет імені О.О.Богомольця

Лабудзинський Д. О.

Інститут біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України

Л.В.Натрус¹, О.І.Мироненко¹, Т.І.Панова¹, Д.О.Лабудзинський²

¹ *Національний медичний університет імені О.О.Богомольця, Київ*

² *Інститут біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України, Київ*

ОСОБЛИВОСТІ СПОЛУЧНОТКАНИННОГО СИНТЕЗУ NF-KB-ЗАЛЕЖНИХ ПРОТЕЇНІВ У СТАДІО РЕМОДЕЛЮВАННЯ ОПІКОВОЇ РАНИ ШКІРИ ЩУРІВ

Natrus L.V.

doctor of medicine, professor,

Bogomolets National Medical University,

Myronenko O.I.

Bogomolets National Medical University,

Panova T.I.

doctor of medicine, professor,

Bogomolets National Medical University,

Labudzynski D.O.

Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine (NASU)

L.V. Natrus¹, O.I. Myronenko¹, T.I. Panova¹, D.O. Labudzynski²,

¹ *Bogomolets National Medical University, Kyiv*

² *Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine*

SPECIFICS OF CONNECTIVE TISSUE NF-KB-DEPENDENT PROTEIN SYNTHESIS IN REMODELING STAGE OF BURN WOUND HEALING IN RATS

Анотація. Проведені дослідження динаміки (3,7,14,21 доба) гоєння опікової рани (площа термічного ушкодження шкіри складала 18-20 % поверхні тіла), шкіри білих статевозрілих щурів-самців лінії Вістар масою 180-210 г. Було вивчено в тканині регенерату вміст фосфорильованої за Ser 311 субодиниці р65 ядерного фактору каппа В (NF-κB) субодиниці ІκB-α, фактору росту судинних ендотеліальних клітин

(VEGF) рецептору VEGF (Flt-1) мілопероксидази –MPO, індукцибельної NO-синтази – iNOS та нітрозильованих протеїнів які досліджувалися методом Вестерн-блот аналізу, та виконувався підрахунок формених елементів периферичної крові (ПК).

За отриманими даними можна вважати, що «повторне» залучення до осередку загоювання нейтрофілів з активацією фагоцитозу та їхньої мілопероксидазної функції, а також переважання в тканині ознаки M2-макрофагів у стадії ремоделювання забезпечує функцію елімінації продуктів розпаду колагену вторинного провізорного матриксу (грануляційної тканини) з наступним їх кліренсом шляхом модуляції та завершення лімфоангіогенезу. Таким чином, з 14 по 21 добу в нормі створюються умови для ремоделювання рани, ефективного фізіологічного завершення фагоцитозу, при якому прибираються надлишки фіброзної тканини для відновлення архітекτονіки дерми.

Висновок: Визначена нами динаміка стану регуляторної системи pNF-κB/IκB-α та NF-κB-залежних важливих тканинних протеїнів свідчить про переключення («switch») ролі транскрипційного фактору NF-κB для регуляції фізіологічного загоєння рани. Вірогідно NF-κB об'єднує функцію загального регуляторного протеїну, який за відповідних умов змінює свою роль з прозапального на захисний і визначає успішність репарації сполучної тканини.

Abstract. We provided dynamics studies (on 3,7,14,21 day) of burn wound healing process in the skin of white adult rats (Wistar line, weighted 180-210 g). The area of thermal damage of the skin covered 18-20% of the total body surface. In regenerate tissue, we studied content of phosphorylated on Ser 311 subunit p65 of nuclear factor kappa-B (NF-κB), subunit IκB-α, vascular endothelial growth factor (VEGF), receptor to VEGF (Flt-1), myeloperoxidase (MPO), inducible NO-synthase (iNOS) and nitrosylated proteins by the method of Western-blot analysis. Blood cells were also counted in peripheral blood.

We can suggest that secondary attraction of neutrophils (with activation of phagocytosis and MPO) and predominance of M2-macrophages in remodeling stage of wound healing provide the elimination of collagen degradation products in secondary transitional matrix (granulation tissue). This followed by modulation and completion of lymphatic angiogenesis. Thus, normal conditions are created for wound remodeling from 14 to 21 day by effective physiological completion of phagocytosis, in which excessive fibrous tissue is removed to restore the architectonics of the dermis.

Conclusion: dynamics of regulatory system of pNF-κB/IκB-α and NF-κB-dependent tissue proteins determine the switch role of transcriptional factor NF-κB in regulation of physiological wound healing process. Probably NF-κB combines the proinflammatory function as a common regulatory protein and protective role in successful tissue reparation.

Ключові слова: регуляторні протеїни, мілопероксидаза, лімфоангіогенез, ремоделювання тканини

Keywords: regulatory proteins, myeloperoxidase, lymphatic angiogenesis, tissue remodeling

Загоєння рани є складним, багатокомпонентним процесом, механізми регулювання якого постійно досліджуються для визначення напрямків найбільш ефективного терапевтичного впливу. Пошкодження тканини є ініціувальним фактором, що призводить до активації системи гемостазу за рахунок вивільнення тканинних факторів зсідання крові, продуктів розпаду клітин, а також до розвитку гострого запалення за рахунок ключової події – контакту імунних клітин-резидентів (дендритні клітини, тканинні макрофаги) з PAMPs та/або DAMPs [1]. Таким чином, перша стадія загоювання рани включає формування первинного провізорного (тимчасового) матриксу на основі кров'яного згустку та розвиток запальної реакції із закономірною послідовністю появи клітин-емігрантів у ділянці пошкодження [2, 3]. Наступна стадія проліферації розпочинається після елімінації флогенного чинника та видалення тканинного детриту фагоцитами із розщепленням первинного матриксу – з фібрину та фібронектину – за рахунок секреції активатору плазміногену та матриксних металопротеїназ переважно моноцитами/макрофагами [4, 5].

«Нашаровування» між собою стадій загоювання рани, участь великої кількості клітин, складність біохімічного різноманіття цитокінів,

медіаторів, ферментів потребує інтегрального підходу та пошуку універсальних механізмів регуляції цього процесу. На клітинному рівні саме ядерний транскрипційний фактор каппа-B (NF-κB) відіграє важливу роль у цільній ланці подій: синтезу прозапальних цитокінів, адгезивних молекул, хемотаксинів, вільних радикалів та інших медіаторів; клітинному поділі та проліферації; активації експресії генів циклінів та циклін-залежних кіназ; активації гіпоксієіндуцибельного фактору-1 (HIF-1) та, як наслідок, судинного ендотеліального фактору росту (VEGF); у регулюванні апоптозу, клітинних програм виживання та старіння [6, 7].

При класичному (канонічному) шляху індукції NF-κB, наприклад, під дією LPS або TNFα, через низку проміжних факторів відбувається активація IκB-кінази (IKK), що фосфорилує інгібіторну субодиницю IκB-α, яка зазнає убіквітинуювання та деградації шляхом протеасомного протеолізу, а NF-κB вивільнюється, фосфорилується (p65 субодиниця за залишком Ser311) та транслокується в ядро, де активує експресію низки генів, у тому числі – IκB-α та протеїну A20, який інгібує активність IKK. Таким чином існують механізми негативного зворотного зв'язку для запобігання надмірної активації NF-κB [8, 9].

Одним із визначальних факторів «успішності» загоєння є неоваскуляризація. Основними джерелами VEGF є тканинні макрофаги, моноцити, нейтрофіли та епітеліальні клітини [10, 14]. Лейкоцити можуть стимулювати неоангіогенез шляхом доставки проангіогенних попередників факторів росту (VEGF-A), а також шляхом синтезу металопротеїназ, які деградують компоненти екстрацелюлярного матриксу, сприяючи вивільненню та активації факторів росту [11, 12]. Активація нейтрофілів супроводжується посиленням їхньої фагоцитарної функції, продукуванням вільних радикалів за рахунок активації мієлопероксидази (MPO) та індукції NO-синтази (iNOS), лізосомальних ферментів, цитокінів та інших медіаторів, що відіграють велике значення у процесі загоєння рани. При цьому, збільшення рівня 3-нітротирозину в поліпептидах тканини є індикатором посиленого утворення NO та/або вільних радикалів та активації лейкоцитів відповідно [13].

Метою дослідження було вивчення особливостей синтезу NF-κB-залежних протеїнів в регенераті сполучної тканини шкіри у стадію ремоделювання тканини, при загоєнні опікової рани у шурів.

Матеріали та методи

Дослідження динаміки процесу загоєння опікової рани шкіри проводили на 3, 7, 14, 21 добу після моделювання опіку на шкірі білих статевозрілих шурів-самців лінії Wistar (n=24), вагою 180-210 г, без соматичної патології.

Усі маніпуляції з піддослідними тваринами проводили з дотриманням загальноприйнятих біоетичних норм гуманного поводження з лабораторними тваринами у відповідності до міжнародних та національних положень стосовно проведення експериментів із залученням тварин: «Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986); «Загальні етичні принципи проведення експериментів на тваринах» (Україна, 2001 р.), Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3447-IV (Україна, 2006), засідання Комісії з біоетики НМУ (протокол №94 від 16.03.2016).

Під дією ефірного наркозу моделювали опік шляхом прикладання двох гарячих мідних пластин у вигляді еліпсу, розміром 3,7x4,5 см і площею 0,0052 м² на оголену шкіру спини з експозицією 10 секунд. Загальна площа опіку шкіри складала 18-20 % поверхні тіла, що є цілком достатнім для формування опіку II ступеня – дермального поверхневого опіку. У вказані термін (на 3, 7, 14, 21 добу) шурам одноразово інтраперитоніально робили ін'єкцію летальної дози тіопенталу натрію і виводили з експерименту шляхом декапітації.

Підрахунок формених елементів периферичної крові шляхом візуальної оцінки мазку крові за

стандартною методикою та за допомогою гематологічного аналізатора MicroCC.

В тканині регенерату методом *Вестерн-блот аналізу* визначали вміст фосфорильованої за Ser 311 субодиниці p65 ядерного фактору каппа-B (NF-κB), ІκB-α, фактору росту судинних ендотеліальних клітин (VEGF) та рецептору VEGF (Flt-1), індукційної NO-синтази (iNOS), мієлопероксидази (MPO) та 3-нітропротеїнів. Для приготування зразків фрагменти шкіри (200-250 мг) подрібнювали у порцеляновому тиглі і розтирали за присутності рідкого азоту до гомогенного стану. Наважки тканин шкіри (100 мг) змішували з буфером екстракції протеїнів RIPA (20 mM трис-HCl, pH 7,5; 1% тритону X-100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% дезоксихолату натрію, 20 mM Tris-HCl, pH 7,6; 1% Triton-X100, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 0,2% DCH) у співвідношенні 1:10 (вага/об'єм) та коктейлем інгібіторів протеїназ і фосфатаз (PIC), інкубували на льоду протягом 20 хв та піддавали ультразвуковій дезінтеграції за допомогою приладу Sartorius (Labsonic® M, ФРН). Отримані гомогенати центрифугували при 16 тис. г протягом 20 хв. за 4 °C. Після центрифугування надосадову рідину збирали та переносили до пластикових пробірок Eppendorf. Концентрацію загального протеїну вимірювали спектрофотометрично за методом Stoscheck з модифікаціями, використовуючи спектрофотометр СФ-2000 (ОКБ «Спектр», РФ). Протеїнові екстракти змішували з буфером Леммлі (150 mM трис-HCl (pH 6.8), 1% SDS, 0,3% бромфеноловий синій, 20% гліцерил) та проварювали при 95°C протягом 5 хв. для подальшого зберігання.

Електрофоретичне розділення протеїнів зразків шляхом електрофорезу у поліакриламідному гелі (SDS-PAGE електрофорез) проводили у вертикальній камері BioRad (США), використовуючи електродний буфер (25 mM трис-HCl (pH 8,3); 0,192 M гліцину, 0,1% SDS). Кількість загального протеїну, що вносили до лунок гелю, становила 50 мкг. Концентрування зразків проводили при напрузі, що не перевищувала 50 В, розділення – 160 В. Для ідентифікації молекулярних мас протеїнів використовували суміш забарвлених протеїнових маркерів (PageRuler, кат. № 26616, Fermentas, Литва).

Перенесення протеїнів з гелю до нітроцелюлозних мембран (діаметр пор 0.45 мкм, GE Healthcare, Amersham, Велика Британія) проводили у трансфер-буфері (12,5 mM трис-HCl буфер (pH 8,3); 0,198 M гліцин та 20 % метанол) протягом 60 хв. при напрузі 30 В і постійному охолодженні. Після завершення трансферу протеїнів мембрани відмивали від залишків буферу у 50 mM фосфатному фізіологічному буфері, що містив 0,05 % Triton X-100 (PBST) (pH 7,4). Блокування місць неспецифічної сорбції антитіл проводили у 5%-му розчині знежиреного сухого молока (Carnation, США) у PBST протягом 120 хв. при кімнатній температурі. Після блокування

мембрани інкубували зі специфічними антитілами проти VEGF (Merck, ФРН, кат. № 05-1117, 1:2000 у PBST), фосфорильованої за Ser 311 субоднинці p65 NF-κB (Santa Cruz, США, 1:200 у PBST), ІκB-α (Santa Cruz, США, 1:500 у PBST) та Flt-1 (Santa Cruz, США, 1:500 у PBST), протягом 16 год. при 4 °C. Далі мембрани промивали на горизонтальному шейкері у 6 змінах PBST по 5 хв. кожна, після чого інкубували 90 хв. при кімнатній температурі з відповідними вторинними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому (anti-mouse IgG 1:5000, Abcam, США, кат. № ab197767 або anti-rabbit IgG (H+L)-HRP conjugate 1:2500, Bio-Rad Laboratories, Inc., США). Неспецифічно сорбовані вторинні антитіла відмивали у 6 змінах того ж буферу. Детекцію комплексів антиген-антитіло проводили за допомогою методу підсиленої хемілюмінесценції (ECL), використовуючи 0,25 М розчин люмінолу у ДМСО, 0,09 М розчин кумарової кислоти у ДМСО, 0,1 М трис (pH 8,5) та 0,0035 % H₂O₂. Візуалізацію специфічного забарвлення здійснювали на рентгенівських плівках Konica Minolta (Medical & Graphic, Inc, Японія). Отримані плівки сканували для проведення кількісного денситометричного аналізу з використанням програми TL-120 (TotalLab Ltd., США). Відносний вміст фосфоNF-κB p65, ІκB-α, VEGF, Flt-1, iNOS, MPO та 3-нітропротеїнів виражали в умовних одиницях оптичної густини (arbitrary units).

Статистичну обробку даних проводили за допомогою статистичного пакету IBM SPSS Statistics 23. Розраховували коефіцієнт Пірсона (R), з р-значенням, що відповідає 95%-ому довірчому інтервалу для коефіцієнта кореляції. Для перевірки розподілу на нормальність використано критерій Шапіро-Уїлка. Для порівняння показників на всіх термінах спостереження було використано критерій множинного порівняння – критерій Шеффе.

Результати дослідження

Обрані періоди для дослідження показників відповідали сучасним уявленням процесу загоєння ран, коли на 3 добу припадає завершення стадії запалення та розпочинається проліферація, на 7 добу – на тлі проліферації розпочинається стадія ремоделювання, на 14 добу – стадія проліферації добігає кінця, а процес відновлення архітекtonіки тканини набуває активності, на 21 добу – завершується активне ремоделювання тканини з формуванням щільного сполучнотканинного рубця [1, 2].

В наших попередніх роботах була наведена динаміка рівню фосфорильованої за Ser311 субоднинці p65 ядерного транскрипційного фактору каппа-В (pNF-κB), його інгібуювальної субоднинці ІκB-α, вмісту судинного ендотеліального фактору росту VEGF, його рецептору VEGFR-1 (Flt-1) в сполучнотканинному регенераті опікової рани у динаміці на 3, 7, 14, 21 добу [15]. Ми визначали суттєве та достовірне підвищення pNF-κB, VEGF та Flt-1 в період з 14 до

21 добу. При вивченні динаміки кількості клітин периферичної крові ми також виявили достовірне підвищення вмісту нейтрофілів та моноцитів саме в цей період [16].

Вивчення динаміки рівня індукбельної NO-синтази (iNOS) (Рис.1,А) у тканинному регенераті у процесі загоєння опікової рани показав максимальний рівень iNOS на 7 добу, із поступовим зменшенням вмісту протеїну, який на 21 добу був в 2,8 разів нижчим за показник 7 доби (p<0,05). Досліджено коливання вмісту 3-нітрозильованих протеїнів (3-nitrotyrosine peptides) (Рис.1, Б) у сполучнотканинному регенераті тканини виявило максимальний рівень нітрозильованих пептидів на 3 добу, із поступовим зниженням на 7 та 14 (p<0,05), і підвищенням майже до початкового максимального значення на 21 добу (p<0,05).

Дослідження динаміки рівня мієлопероксидази (MPO) (Рис.1,В) виявило зменшення на 14 добу (p<0,05); на 21 добу відзначалося зростання концентрації MPO в тканині майже у 6 разів відносно 14 доби (p<0,05).

Ми провели кореляційний аналіз за коефіцієнтом кореляції Пірсона динаміки визначених показників тканинного регенерату для виявлення можливих взаємозв'язків та дослідження ймовірних механізмів їхньої регуляції (рис.2).

При вивченні динаміки вмісту вказаних протеїнів протягом усього періоду загоєння рани було визначено що показники регуляторної системи pNF-κB/ІκB-α та вміст NF-κB-залежних протеїнів в сполучнотканинному регенераті рани має характерні особливості саме у стадію ремоделювання тканини з 14 до 21 доби спостереження. В цей термін вміст фосфорильованої форми ядерного фактору pNF-κB несподівано достовірно (p<0,05) підвищувався в 1,4 рази, вміст його гальмівної одиниці ІκB-α відповідно достовірно (p<0,05) знижувався також в 1,4 рази. Рівень в сполучнотканинному регенераті VEGF в цей термін спостереження достовірно (p<0,05) підвищувався в 1,6 рази, а рівень його рецептора Flt-1 підвищувався (p<0,05) в 10 разів. Продукція MPO в сполучнотканинному регенераті в стадії ремоделювання тканини також підвищувалася в 5,8 разів, що корелювало із відносною кількістю нейтрофілов ПК R=0,611, (p<0,01) та відносною кількістю моноцитів ПК R=0,667, (p<0,01). Також в цей термін спостереження підвищувався в 1,6 рази (p<0,05) рівень нітрозильованих протеїнів, але продукція iNOS зменшувалася в 2 рази (p<0,05). За даними візуального спостереження загоєння рани проходило успішно у всіх тварин в жодного із щурів не спостерігалось погіршення загального стану та вигляду рани, що дає підставу стверджувати про відсутність приєднання бактеріальної флори та інфекційного загоєння.

В попередніх роботах ми висловлювали думку відносно можливості існування різнорівневого регуляційного ланцюга, який виникає в

нормальних фізіологічних умовах і забезпечує ангиогенез: ядерний фактор pNF-κB через продукцію факторів росту мієлоїдних попередників в кістковому мозку регулює проліферацію нейтрофілних гранулоцитів та їх вихід із кісткового мозку до ПК. Нейтрофіли, шляхом хемотаксису, потрапляють до пошкодженої ділянки опікової рани експресують ендотеліальні ростові фактори та регулюють експресію рецепторів до вказаних лігандів в сполучнотканинному регенераті, що є базою регульованого ангиогенезу.

Одже, зниження експресії pNF-κB з 3 по 7 добу спостереження є закономірним, адже саме на цей період при неускладненому перебігу загоювання опікової рани припадає завершення власне запальної стадії (альтеративних та ексудативних явищ) в осередку ушкодження та прогресує стадія проліферації з формуванням грануляційної тканини. Як відомо, однією з ключових подій, що «переключає» прозапальні реакції на протизапальні під час проліферації, є поляризація макрофагів, тобто перехід M1-фенотипу в M2-фенотип [1, 14]. Однак, подальше дослідження динаміки вмісту pNF-κB у тканинному регенераті виявило його парадоксальне, на перший погляд, зростання з 7 на 14, а особливо – з 14 на 21 добу спостереження. При цьому, ознак приєднання інфекційного процесу та інших ускладнень перебігу загоювання рани не спостерігалось (Рис.3), що дає можливість припустити наявність у регуляторного протеїну NF-κB іншої ролі ніж відома «традиційна» прозапальна функція, але вона активується у стадію ремоделювання тканини з 14 по 21 добу.

Виявлено, що динаміка збільшення вмісту нейтрофілів у тканині під час ремоделювання має виражений позитивний кореляційний зв'язок з продукцією VEGF. Однак, активний неоангіогенез є характерним для стадії проліферації під час формування грануляційної тканини. До того ж, при типовому перебігу загоювального процесу під час стадії ремоделювання спостерігається зниження числа капілярів при заміщенні тканини сполучнотканинним рубцем. Таким чином, на нашу думку, метою збільшення VEGF є «повторне» залучення нейтрофілів до осередку загоювання, оскільки нейтрофіли, як було показано раніше, мають рецептори VEGFR1 [17]. Ще однією можливою функцією VEGF на цьому етапі є посилення та модуляція лімфоангіогенезу, адже утворення лімфатичних судин, що сліпо починаються в тканині, потребує завершення формування архітекtonіки позаклітинного матриксу, а це припадає саме на стадію ремоделювання опікової рани.

Отже, ми вважаємо, що «повторне» залучення до осередку загоювання нейтрофілів з активацією фагоцитозу та їхньої мієлопероксидазної функції, а також переважання в тканині M2-макрофагів у стадії ремоделювання забезпечує функцію елімінації продуктів розпаду колагену вторинного провізорного матриксу (грануляційної тканини) з

наступним їх кліренсом шляхом модуляції та завершення лімфоангіогенезу. Очищення рани призводить до повного зникнення PAMPs та DAMPs (якими можуть виступати самі продукти розпаду колагену) [18]. За їх відсутності нові нейтрофіли, що знаходяться під впливом VEGF, не активуються (тому і не виявлено явища гострого запалення) та гинуть апоптозом. Апоптичні тільця поглинаються макрофагами, що приводить до інгібування запальної та імунної відповіді та завершення ремоделювання тканини з формуванням щільного рубця.

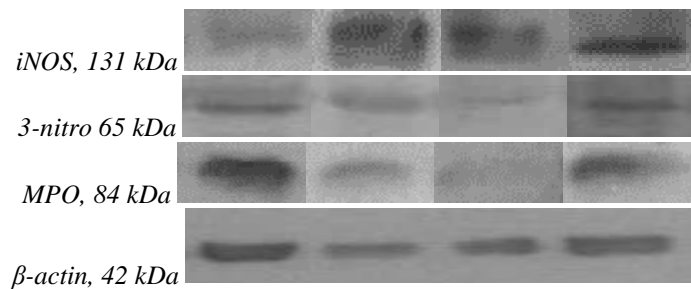
Між pNF-κB та iNOS у тканинному регенераті було продемонстровано значний зворотньопропорційний лінійний кореляційний зв'язок. Вважаємо, що зменшення вмісту iNOS у регенераті тканини з 14 по 21 добу спостереження свідчить про зменшення кількості «класично активованих» M1-макрофагів та переважання субпопуляції «альтернативно активованих» M2-макрофагів. А це співпадає з виявленим зростанням активності NF-κB у цей період. Таким чином, можна зробити висновок, що індукція NF-κB сприяє протизапальній функції у M2-макрофагів.

Цікаво, що зі зменшенням експресії iNOS у тканинному регенераті у стадію ремоделювання вміст продуктів нітрозилування (3-нітропротеїдів) парадоксально збільшувався, що говорить про активність вільнорадикальних реакцій, але джерелом яких вірогідно виступає мієлопероксидаза нейтрофілів. І, дійсно, між MPO та 3-нітропротеїдами виявлено значний кореляційний зв'язок ($R=0,875$, $p<0,05$). Тому зростання експресії MPO нейтрофілів у тканинному регенераті у стадію ремоделювання ми розцінюємо не тільки як свідчення активації фагоцитозу для елімінації компонентів позаклітинного матриксу та відновлення архітекtonіки дерми, але й цілеспрямований механізм активації та/або модуляції протеолітичних протеїнів шляхом їхнього нітрозилування – у першу чергу, низки металопротеїназ.

Ми виявили, що динаміка Flt-1 у тканинному регенераті опікової рани позитивно корелювала із вмістом VEGF та MPO, що вкотре підкреслює провідну роль нейтрофілів в ангиогенезі під час усіх етапів загоювання опікової рани.

Таким чином, ми припускаємо, що при типовому перебігу процесу загоювання опікової рани з 14 по 21 добу, за відсутності ознак інфікування, створюються оптимальні умови для завершення ремоделювання рани та відновлення архітекtonіки дерми шляхом ефективного фагоцитозу та лімфоангіогенезу, при якому прибираються та дренуються продукти деградації провізорного матриксу та надлишки фіброзної тканини. Збільшення вмісту NF-κB у сполучнотканинному регенераті, за нашими даними, збільшується, можна говорити про ефект перемикачання («switch») прозапальних властивостей цього транскрипційного фактору на протизапальні, репаративні (Рис.4).

1



2

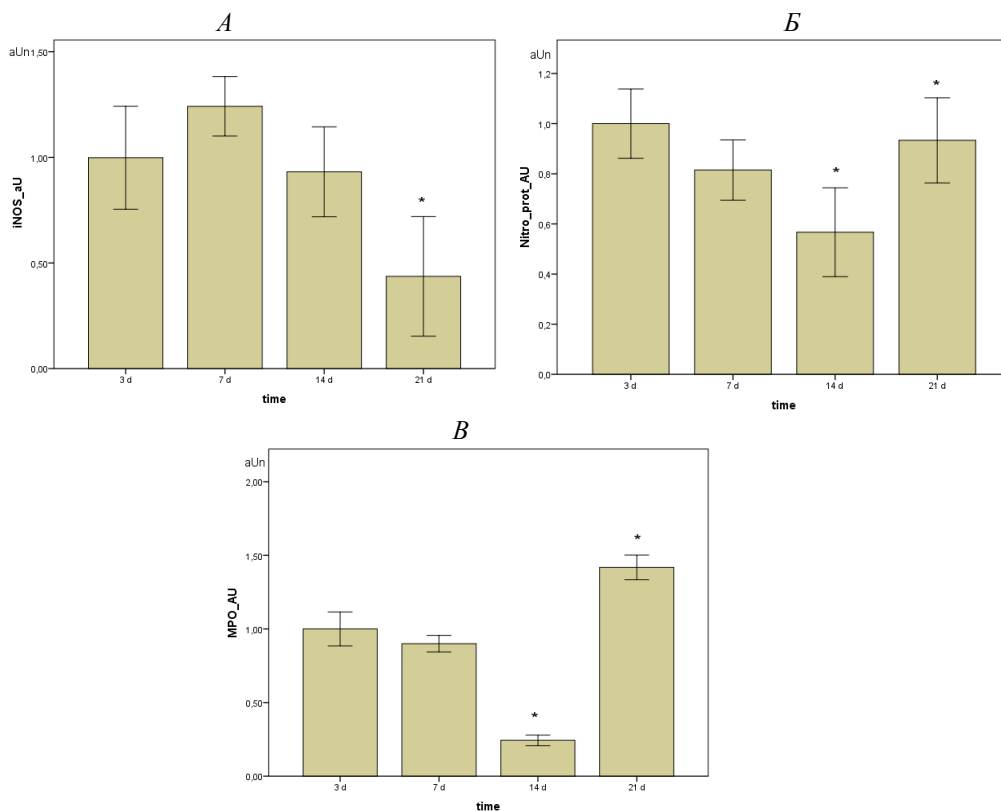


Рис.1. Вміст рNF-κB-залежних протеїнів у регенераті сполучної тканини шкіри щурів в динаміці загоювання опікової рани (3,7,14,21 доба).

(1) Гістограма вмісту протеїнд в ум.од. (А) iNOS, (Б) 3-nitrotyrosine, (В) MPO. (2) Імуноблотограма. * різниця порівняно зі значенням в попередній термін (P<0,001).

R	Nf-kb	Ikb	VEGF	FLT	MPO	iNOS	3-nitro	Neu_PB
Nf-kb	0,00							
Ikb	0,19	0,00						
VEGF	-0,08	0,27	0,00					
FLT	0,67	0,22	0,68	0,00				
MPO	0,60	-0,40	0,38	0,80	0,00			
iNOS	-0,94	-0,47	-0,16	-0,77	-0,50	0,00		
3-nitro	0,46	-0,75	-0,04	0,42	0,87	-0,14	0,00	
Neu_PB	-0,20	-0,42	0,76	0,50	0,63	0,57	0,47	0,00
Mono_PB	-0,13	-0,83	0,31	0,25	0,69	0,18	0,78	0,85

Рис. 2. Таблиця значень коефіцієнта Пірсона, розрахованого при аналізі кореляційних зв'язків між показниками.

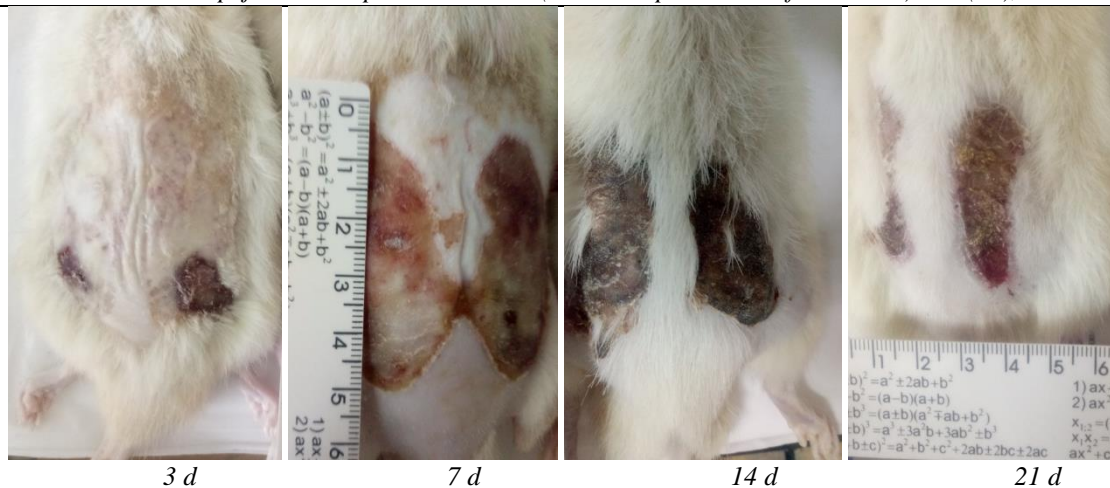


Рис.3. Зовнішній вигляд опікової рани щурів в динаміці загоєння (3,7,14,21 доба).

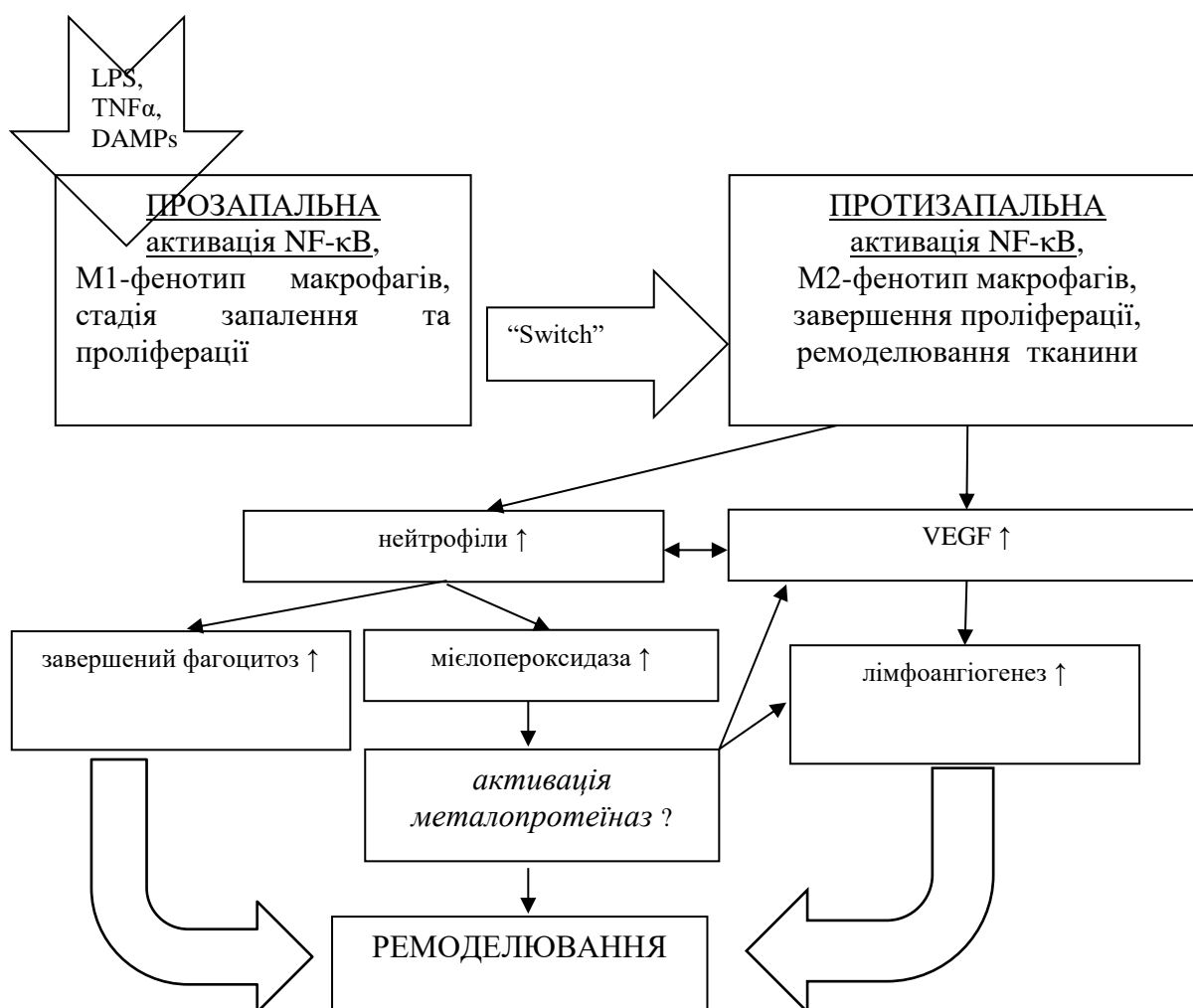


Рис.4. Імовірна схема реалізації протизапальних та репаративних ефектів NF-κB внаслідок перемикання («switch») його функцій у стадію ремоделювання з 14 по 21 добу загоєння опікової рани.

Література

1. Ambrozova N, Ulrichova J, Galandakova A. Models for the study of skin wound healing. The role of NRF2 and NF-κB. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2017; 161(1):1-13.
2. Widgerow A.D. Cellular/extracellular matrix cross-talk in scar evolution and control. Wound Repair Regen. 2011; 19:117–33.

3. Olczyk P, Mencner A, Komosinska K. The Role of the Extracellular Matrix Components in Cutaneous Wound Healing. BioMed Research International Volume. 2014; article ID 747584.

4. Rowan M.P, Cancio L.C, Elster E.A, Burmeister D.M, Rose L.F, Natesan S, Chan R.K, Christy R.J, Chung K.K. Burn wound healing and treatment: review and advancements. Critical Care. 2015; 19:243.

5. Reinke J.M, Sorg H. Wound repair and regeneration. Eur Surg Res. 2012; 49:35–43.
6. Park Y.R, Sultan M.T, Park H.J, Lee J.M, Ju H.W, Lee O.J, Lee D.J, Kaplan D.L, Park C.H. NF- κ B signaling is a key in the wound healing processes of silk fibroin. Acta Biomater. 2018; 67:183-195.
7. Pires B.R, Silva R.C, Ferreira G.M, Abdelhay E. NF-kappaB: Two Sides of the Same Coin. Genes. 2018; 9:24; doi:10.3390/genes9010024.
8. Ying Wang, Zhenju Song, Jing Bi, Jie Liu, Lin Tong, Yuanlin Song, Chunxue Bai, Xiaodan Zhu. A20 protein regulates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by downregulation of NF- κ B and macrophage polarization in rats. Molecular Medicine Reports. 2017; 16:4964-4972.
9. Frank Christian, Emma L. Smith, Ruaidhrí J. Carmody. The Regulation of NF- κ B Subunits by Phosphorylation. Cells. 2016; 5:12; doi:10.3390/cells5010012.
10. Hayden M.S, Ghosh S. Nf-kappaB, the First Quarter-Century: Remarkable Progress and Outstanding Questions. Genes. 2012; 26:203–234.
11. Reinders S. et al. Proinflammatory functions of vascular endothelial growth factor in alloimmunity. J. Clin. Invest. 2003; 112:1655–1665.
12. Shinohara H. et al. Positive feedback within a kinase signaling complex functions as a switch mechanism for NF-kappaB activation. Science. 2014; 344:760–764.
13. Sandra I. Zittermann, Andrew C. Issekutz. Endothelial growth factors VEGF and bFGF differentially enhance monocyte and neutrophil recruitment to inflammation. Journal of Leukocyte Biology. 2006; 80:247-257.
14. Gong Y, Koh D.R. Neutrophils promote inflammatory angiogenesis via release of preformed VEGF in an in vivo corneal model. Cell Tissue Res. 2010; 339:437–448.
15. Натрус Л, Рижко І, Панова Т, Осадчук Ю, Концепція регуляції неоангіогенезу при регенерації сполучної тканини в нормі та за умов гіперглікемії ISSN 0201-8489 Фізіол. журн., 2019, Т. 65, № 3 (Додаток)С. 30-31. https://biph.kiev.ua/images/6/69/FiziolZh-3_dod_2019.pdf
16. Рижко І, Натрус Л, Коновалов С., Рижко Д. Вплив гіперглікемії на NF- κ B-залежний ангіогенез сполучної тканини шкіри білих щурів при загоєнні опікової травми East European Scientific Journal, (Warsaw, Poland), 2019, 8 (48), 2019 part 4. 42-51. https://eesa-journal.com/wp-content/uploads/EESA_august_part4.pdf
17. Park Y.R, Sultan M.T, Kaplan D.L, Park C.H. Wound healing via NF- κ B regulated proteins including cyclin D1, fibronectin, and VEGF. Acta Biomater. 2018; 67:183-195.
18. Gurtner G.C, Werner S, Barrandon Y, Longaker M.T. Wound repair and regeneration. Nature. 2008; 453:314–321.

Troyanova E.N.

student of Tver State Medical University

Al-Galban L. N.

student of Tver State Medical University

Poselyugina O.B.

doctor of medicine,

professor of the department of hospital therapy and professional diseases,

Tver State Medical University

DIABETES INSIPIDUS. CLINICAL DISCUSSION

Троянова Екатерина Николаевна

студент ФГБОУ ВО

Тверской государственной медицинской университет Минздрава России,

г. Тверь, Россия

Аль-Гальбан Лина Нахедовна

студент ФГБОУ ВО

Тверской государственной медицинской университет Минздрава России,

г. Тверь, Россия

Поселюгина Ольга Борисовна

доктор медицинских наук,

профессор кафедры госпитальной терапии и профессиональных болезней

ФГБОУ ВО

Тверской государственной медицинской университет Минздрава России,

г. Тверь, Россия

НЕСАХАРНЫЙ ДИАБЕТ. КЛИНИЧЕСКИЙ РАЗБОР

Summary. Central diabetes insipidus is a disease of the hypothalamic-pituitary system caused by a defect in the synthesis or secretion of antidiuretic hormone, which leads to a decrease in the reabsorption of water in the kidneys and the release of excess urine with a low specific gravity. One of the causes of this pathology is surgery

in the hypothalamic-pituitary region. The disease can lead to serious complications in the postoperative period, therefore, correctly conducted differential diagnosis between different forms of diabetes insipidus is important, which allows you to prescribe a pathogenetically correct and safe treatment. The article analyzes the current medical literature, clinical recommendations for diabetes insipidus, and analyzes the medical records of a patient at the endocrinology department of the regional clinical hospital in the city of Tver, operated on for prolactin-secreting pituitary macroadenomas, with central diabetes insipidus developing in the postoperative period.

Аннотация. Центральным несахарным диабетом – заболеванием гипоталамо-гипофизарной системы, вызванное дефектом синтеза или секреции антидиуретического гормона, что приводит к снижению реабсорбции воды в почках и выделению избыточного количества мочи с низким удельным весом. Одной из причин возникновения данной патологии является оперативное вмешательство в гипоталамо-гипофизарной области. Заболевание может приводить к тяжелым осложнениям в послеоперационном периоде, поэтому важна правильно проведенная дифференциальная диагностика между различными формами несахарного диабета, что позволяет назначить патогенетически верное и безопасное лечение. В статье проведен анализ современной медицинской литературы, клинических рекомендаций по несахарному диабету, а также разбор медицинской карты пациентки эндокринологического отделения ГБУЗ ОКБ г. Твери, прооперированной по поводу пролактинсекретирующей макроаденомы гипофиза, с развившимся в послеоперационном периоде центральным несахарным диабетом.

Key words: diabetes insipidus, polyuria, polydipsia, desmopressin, transnasal adenomectomy.

Ключевые слова: несахарный диабет, полиурия, полидипсия, десмопрессин, трансназальная аденомэктомия.

Актуальность: несахарный диабет (НД) – группа заболеваний, обусловленных нарушением реабсорбции воды и концентрации мочи в почках, клинически проявляющихся выраженной жаждой и увеличением объема выделяемой мочи. НД по этиологии классифицируют на центральный, нефрогенный, психогенный, функциональный, ятрогенный и транзиторный на фоне беременности. Центральный НД (ЦНД) – наиболее часто встречаемая форма данного заболевания, выявляется со средней частотой 1:25000. Его распространенность в различных популяциях варьирует от 0,004% до 0,01% [1–4]. В последнее время отмечается тенденция к росту ЦНД за счет повышения числа проводимых оперативных вмешательств на головном мозге [5]. Заболевание может выявляться в любом возрасте, однако чаще развивается в интервале от 20 до 40 лет [3]. По одним литературным данным заболевание может одинаково часто встречаться как у мужчин, так и у женщин, по другим – преобладают женщины в соотношении 2,2:1 [4].

Центральная форма НД, возникшая после хирургического или травматического повреждения гипоталамуса или нейрогипофиза, может иметь различные особенности клинического течения. В случае локализации патологического процесса над срединным возвышением с вовлечением вазопрессинсинтезируемых клеток супраоптического и паравентрикулярного ядер, функция последних необратимо утрачивается. Если же местоположение патологического процесса ниже указанной структуры, то нарушение водного баланса нередко оказывается транзиторным [6,7]. НД, развившийся в результате оперативных вмешательств на гипофизе и тяжелых черепно-мозговых травм, в 50–75% случаев обратим (имеет транзиторное течение) [8–10].

В основе патогенеза НД в большинстве случаев лежит недостаточная секреция вазопрессина [2–4]. При снижении его синтеза

возникает полиурия, большие потери воды приводят к дегидратации, развитию гиперосмоляльности плазмы, раздражению центра жажды в гипоталамусе и полидипсии [4]. Если снижение общего содержания воды в организме развивается быстрее, чем могут отреагировать адаптационные механизмы мозга, то происходит его обезвоживание, сморщивание, отделение от твердой мозговой оболочки с разрывом сосудов и внутримозговыми кровоизлияниями, повышением внутримозгового давления с компрессионными повреждениями ствола головного мозга [8, 9].

При диагностике НД, очень важно уточнить этиологию заболевания. Учитывая многообразие причин, приводящих к развитию НД необходима правильно проведенная дифференциальная диагностика между различными формами НД, что позволяет назначить патогенетически верное и безопасное лечение.

Цель исследования: продемонстрировать клинический разбор пациентки с послеоперационным несахарным диабетом.

Материалы и методы: был проведен анализ современной медицинской литературы, клинических рекомендаций по НД, а также разбор медицинской карты пациентки эндокринологического отделения ГБУЗ ОКБ г. Твери.

Результаты и обсуждение

Больная С. 59 лет, жительница г. Твери 04.07.2019 поступила в эндокринологическое отделение ГБУЗ «Областная клиническая больница» города Твери с жалобами на выраженную сухость во рту, жажду, слабость, сонливость, учащенное мочеиспускание до 5–6 раз в течение ночи; повышение артериального давления (АД) до 180/110 мм.рт.ст., сопровождающееся дрожью в теле, учащенным мочеиспусканием; потребностью пить жидкость в ночное время.

Из истории заболевания известно, что с возраста 20 лет у пациентки появились жалобы на сердцебиения, увеличение в размерах пальцев рук, сужение полей зрения, ощущение мелькания «мушек перед глазами». В июле того же года при обследовании у невролога, была проведена компьютерная томография (КТ) головного мозга, на которой было выявлено объемное образование в полости турецкого седла (аденома гипофиза с интра-супраселлярным ростом), размером 15×17×22 мм. Больная была направлена к нейрохирургу, назначившему дообследование в результате которого выявлено повышенное содержание пролактина в крови 51,17 нг/мл (норма 4,79–29,9), уровни инсулиноподобного фактора роста 1, соматотропного и аденокортикотропного гормонов находились в пределах нормы. При осмотре окулистом диагностирована ангиопатия сетчатки обоих глаз. В том же месяце больная была госпитализирована для дообследования, уточнения диагноза и определения дальнейшей тактики ведения в эндокринологическое отделение. Учитывая наличие пролактинсекретирующей макроаденомы гипофиза, отсутствие клинически значимых изменений данных периметрии, высокий риск оперативного лечения, было показано консервативное лечение.

Повторная госпитализация в стационар проводилась в июле 2017 года с диагнозом гиперпролактинемия, макроаденома гипофиза, пролактинсекретирующая, с интра- и супраселлярным ростом. По результатам повторного КТ головного мозга сохранялась картина аденомы гипофиза прежних размеров (15×19×17 мм), однако была выявлена компрессия хиазмы. По результатам осмотра окулиста диагностирован отек диска зрительного нерва обоих глаз. Пациентке было предложено оперативное лечение аденомы, от которого она отказалась. Наблюдалась эндокринологом поликлиники амбулаторно. Получала лечение каберголином – агонистом дофаминовых рецепторов пролонгированного действия по 0,25 мг 2 раза в неделю и метформин по 500–1000 мг на ночь.

Заболевание прогрессировало и в мае 2019 г. была проведена трансназальная аденомэктомия. В раннем послеоперационном периоде отмечалось улучшение зрения, увеличение объема полей, однако появилось учащенное мочеиспускание, развился эпизод полиурии, нарастала сухость во рту. Появление вышеуказанных симптомов было расценено как развитие несахарного диабета. Пациентке был назначен внутрь десмопрессин по 60 мкг в сутки. От приема данного препарата пациентка воздерживалась. Вышеуказанные симптомы заболевания нарастали и пациентка вновь была госпитализирована в эндокринологическое отделение с целью уточнения диагноза постоперационного гипопитуитаризма и подбора терапии.

По данным объективного обследования при поступлении общее состояние было удовлетворительным. Телосложение правильное. Рост 165 см, вес 144 кг. ИМТ = 52,9 кг/м², соответствовал ожирению 3 степени. Кожные покровы обычной окраски, нормальной влажности, на локтях сухие. На коже живота отмечаются узкие белесые стрии. Видимые слизистые розовые. Щитовидная железа увеличена до 1 степени, плотноватая, неоднородная, безболезненная. Паращитовидные железы не пальпируются. Симптомы тиреотоксикоза и тетании отрицательные. При аускультации легких дыхание жесткое, хрипов нет. Пульс – 76 ударов в минуту, ритмичный. АД 135/90 мм рт.ст. Тоны сердца приглушены, ритмичные, акцент 2-го тона над аортой. Язык влажный, обложен белым налетом. Живот мягкий, безболезненный. Печень, селезенка и почки не пальпируются. Симптом поколачивания по поясничной области отрицательный с обеих сторон. Пульсация на тыльных артериях стопы ослаблена справа. Кожа ног сухая, шелушение. Пастозность голеней и стоп. Стул регулярный, оформленный. Диурез около 5,0 литров.

По результатам биохимического анализа крови выявлялась гиперхолестеринемия, гипертриглицеридемия (холестерин общий – 6,98 ммоль/л, триглицериды – 3,90 ммоль/л), билирубин, трансаминазы, тимоловая проба, общий белок крови находились в пределах нормы, мочевины составила 5,0 ммоль/л, креатинин – 90,6 мкмоль/л, СКФ С_{kd}-epi – 60 мл/мин/1,73 м². Уровень глюкозы крови натощак и постпрандиально не выходил за границы нормы, уровень калия – 4,4 ммоль/л, кальция – 2,5 ммоль/л, натрия – 123 ммоль/л). Уровень пролактина, соматотропного, тиреотропного гормонов и Т4-свободного в норме, суточный ритм секреции кортизола не нарушен.

В общем анализе мочи отмечен низкий удельный вес, мочевой осадок без патологии, глюкозы не выявлено. Для оценки концентрационной способности почек проводилось исследование мочи по пробе Зимницкого. Оказалось, что общий диурез составил 6500 мл, что расценивалось как наличие полиурии. Дневной диурез был равен ночному и составил по 3250 мл, имела никтурия. Колебания удельного веса были от 1003 г/л до 1004 г/л, что расценивалось как снижение концентрационной способности почек по типу гипостенурии.

В клиническом анализе крови при поступлении отмечено повышение СОЭ до 55 мм/час, в динамике до 20 мм/час. На основании полученных данных был выставлен клинический диагноз: Несахарный диабет центрального генеза. Состояние после трансназальной аденомэктомии по поводу пролактиномы.

В соответствии с выставленным диагнозом была подобрана доза десмопрессина, которая составила 0,1 мг в 8:00 и 0,2 мг в 22:00. На фоне указанной терапии отмечена положительная

динамика в состоянии пациентки: уменьшилась кратность и объем мочеиспусканий, в течение ночи частота мочеиспускания снизилась до 1-2 раз.

При выписке проведено повторное исследование анализа мочи по Зимницкому. Общий диурез составил 1980 мл, дневной диурез – 810 мл, ночной – 1170, колебания удельного веса мочи находились в диапазоне от 1006 до 1014. Следовательно, проведенное лечение было эффективным, купирована полиурия, улучшилась концентрационная способность почек.

Пациентка была выписана с рекомендациями продолжить начатое лечение в амбулаторных условиях. Учитывая высокую вероятность ремиссии послеоперационного ЦНД у данной пациентки, которая обычно приходится на 3-6 месяцы после операции, рекомендуется контроль водного баланса и электролитных показателей крови (натрий, калий, глюкоза).

Заключение: таким образом, в данном клиническом случае четко прослеживается причинная связь предшествующего нейрохирургического вмешательства в гипоталамо-гипофизарной области по поводу пролактинсекретирующей макроаденомы гипофиза и развившихся сразу после операции проявлений несахарного диабета (сухость во рту, полиурия), и эффективностью назначенной терапии синтетическим аналогом вазопрессина. Совокупность указанных фактов в сочетании с данными лабораторно-инструментальных исследований подтверждают центральный генез развития несахарного диабета.

Можно полагать, что анализ данного клинического случая улучшит осведомленность врачей о данной патологии и позволит своевременно распознавать и начинать лечение ЦНД.

Литература

1. Ефремов, А.В. Патофизиология. Основные понятия: учебное пособие / А.В. Ефремов, Е.Н. Самсонова, Ю.В. Начаров; Под ред. А.В. Ефремова. – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2010. – 256 с.
2. Потемкин, В. В. Эндокринология: руководство для врачей / Под ред. В.В. Потемкина – М.:ООО Издательство «Медицинское информационное агенство», 2013 – 776 с.
3. Шустов,С.Б. Эндокринология: руководство для врачей в 2 т.Т1 / под ред. С.Б. Шустова – Санкт-Петербург: СпецЛит, 2011. – 400 с.
4. Российская ассоциация эндокринологов. // Клинические рекомендации. Диагностика и лечение несахарного диабета у взрослых, 2018.
5. Пигарова, Е. А. Диагностика и лечение центрального несахарного диабета/Е.А.Пигарова, Л.К. Дзеранова // Ожирение и метаболизм. – 2014. – №4. – С.48-55.
6. Бирюкова, Е.В. Выбор препаратов десмопрессина для лечения центрального несахарного диабета/ Е.В. Бирюкова // Ожирение и метаболизм. – 2017. – №4. – С.23–30.
7. Моргунов Л.Ю. Несхарный диабет: заболевание на стыке специальностей // Эндокринология: новости, мнения, обучение. – 2019. Т. 8, № 2. С. 74–82.
8. Вагапова, Г.Р. Вопросы дифференциальной диагностики и лечения центрального несахарного диабета / Г.Р.Вагапова // Медицинский совет. – 2018. – №4. – С. 74 – 80.
9. Гарднер Дэвид. Базисная и клиническая эндокринология: в 2 т.Т 2/ Дэвид Гарднер, Долорес Шобек – М.: БИНОМ, 2015. – 696 с.
10. Лукьянчиков, В.С. Несхарный диабет и коморбидные нарушения водно-электролитного обмена /В.С. Лукьянчиков // Медицинский совет. – 2017. – №3. – С.89 – 94.

Khambir T.S.

postgraduate student

of the Department of Therapy and Rheumatology

Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education

FEATURES OF THE COURSE AND TREATMENT OF KNEE OSTEOARTHRITIS IN PATIENTS WITH LOW BONE MINERAL DENSITY

Abstract. Osteoarthritis and osteoporosis are one of the most common diseases among the elderly, which significantly impair the quality of life and even reduce its duration in patients. The study of the relationship between osteoporosis and rheumatic diseases is of considerable interest not only among rheumatologists but also specialists from other branches of medicine. In the article the features of the course and clinical manifestations of osteoarthritis (OA) of the knee joints, as well as the effect of anti-inflammatory drugs on its course in patients with reduced bone mineral density. According to current guidelines for the treatment of osteoarthritis, symptomatic slow-acting anti-inflammatory drugs (SYSADOA) are used. Due to the influence of osteoporosis on OA, namely, the more severe course, more pronounced X-ray changes, increased CRP is an important consideration to date of the features of the flow of OA with reduced bone mineral density.

Key words: osteoarthritis, osteoporosis, mineral density of bone tissue, anti-inflammatory effect, diacerein.

The relevance of the topic:

Today, a considerable amount of attention is paid to the treatment of diseases of the musculoskeletal

system associated with lesions of the skeletal system, such as osteoarthritis and osteoporosis, which by their prevalence compete with cardiovascular diseases and

often lead to incapacity and disability. Osteoarthritis and osteoporosis are one of the most common diseases among elderly patients, they significantly worsen the quality of life and even reduce the lifespan of patients. [7] The study of the relationship between osteoporosis and rheumatic diseases is of considerable interest not only among rheumatologists but also specialists from other branches of medicine. [8]

Osteoarthritis (OA) is the most common form of arthritis and the main cause of disability. [1] The most common localization of OA is the knee joint, 24% of the total population. [2] In Ukraine in recent years, the prevalence of osteoarthritis has remained high.

The prevalence of OA is 2200.6 per 100 thousand. The population varies in different regions from 13.6 percent to 41.7 percent and increases significantly as the population ages, and the incidence is 497.1 cases per year. [6]

There has been a discussion about the relationship in the development of these diseases for many years. There are different points of view. One of them suggests that in old and elderly age osteoporosis can trigger the pathogenetic chain of osteoarthritis, and an alternative view is based on the fact that osteoarthritis and osteoporosis are independent nosological forms that are independent of each other. [5]

Recent studies have shown that there are common and dependent interaction mechanisms between the bone and cartilage tissues [3]. Osteoblasts and chondrocytes have a common embryological origin with mesenchymal tissue.

The connection of microtraumas of the subchondral bone with cartilage damage has been established. As a result of mechanical compression of osteoblasts of the subchondral bone, the production of interleukin-6 (IL) increases and the level of osteoprotegerin decreases (osteoprotegerin, OPG). A

decrease in the osteoprotegerin (OPG) / ligand ratio of the nuclear activator receptor kappa B receptor activator (RANKL) causes damage to both bone and cartilage. It has been established that a decrease in the OPG / RANKL ratio significantly accelerates the progression of OA. [4]

In Ukraine, signs of systemic osteoporosis and clinical and radiological symptoms of gonarthrosis are found in 14.3% of women in the age group of 40-44 years, and at the age of 65-69 years, the combination of these diseases occurs in 83.2% of women.[9]

Due to the effect of osteoporosis on the course of OA, namely, a more severe course, more pronounced X-ray changes, increased CRP, it is important today to study the features of OA with a reduced BMD.

According to current guidelines for the treatment of osteoarthritis, symptomatic slow-acting anti-inflammatory drugs (SYSADOA) are used. Among them, the most common are chondroitin sulfate, glucosamine sulfate, diacerein, unsaponified soybean and avocado compounds and ginger root extract and others.

Objective: To investigate the features of the course, clinical manifestations and the effect of anti-inflammatory drugs on the course of OA of the knee joints in cases of reduced bone mineral density.

Materials and research methods:

The study was conducted on a basis of the therapeutic department №1 of the Kiev City Clinical Hospital №7. The study included 100 patients (60 women and 40 men) aged 34 to 80 years. OA patients were divided into 3 groups depending on the index of bone mineral density (BMD). First group included patients with OA and normal BMD, second group included patients with osteopenia, third group – with osteoporosis. General characteristics of examined patients are presented in table.1.

Table 1

CHARACTERISTICS OF EXAMINED PATIENTS

Indicator	Group
Number of patients of them:	100
men	40
women	60
Middle age, years	57,00 (IQR 51,00-68,00)
Average body mass index, kg/m ²	30,00 (IQR 25,50-35,50)
Patients with:	
Normal weight	20
Excessive weight	30
Obesity 1	24
Obesity 2	18
Obesity 3	8
Number of patients who had a stage for Kellgren-Lawrence:	
I	9
II	73
III	18
Number of patients who had:	
Normal BMD	32
Osteopenia	38
Osteoporosis	30

Criteria for inclusion of the examined:

1. The diagnosis of osteoarthritis of the knee to the criteria of EULAR.
2. Men and women are aged 30-80 years.
3. Before beginning of the study, patients suffered from pain for at least 15 to 30 days, and general symptoms of the disease were observed for at least six months.
4. Patient consent to participate in the study.

Exclusion criteria for subjects:

1. Refusal to participate in the study
2. The presence of malignant neoplasms.
4. Untimely laboratory and instrumental methods of research.

Research methods:

1. General clinical: a collection of complaints and anamnesis, objective examination, assessment of arthrological status of patients, questionnaires (filling in cases of adapted questionnaires from WOMAC, Leken, VAS).
2. Laboratory: cholesterol, blood glucose, bilirubin, ALT, AST, creatinine, uric acid in the blood, CRP, IL-1, IGF-1, NO.
3. Instrumental (X-ray examination of the knee joints, ultrasound densitometry)
4. Methods of biomedical statistics.

Results and discussion:

Table 2

DEPENDENCE OF X-RAY STAGE OF OA ON THE REDUCTION OF BMD

Indicator	Group 1 normal BMD (n=32)	Group 2 osteopenia (n=38)	Group 3 osteoporosis (n=30)
Number of patients who had a stage for Kellgren – Lawrence:			
I	6	3	0
II	24	29	20
III	2	6	10

As can be seen from the data in table 2, more pronounced radiological changes are observed in cases

of osteopenia and osteoporosis. Such data indicates a more severe course of OA in cases of reduced BMD.

Table 3

DYNAMICS OF VAS AND LEKEN INDICATORS DEPENDING ON THE BMD

Indicator	Group 1 normal BMD (n=32)		Group 2 osteopenia (n=38)		Group 3 osteoporosis (n=30)	
	Me	IQR	Me	IQR	Me	IQR
VAS to rest, mm (0-100)	14,50	4,25-20,25	26,00*	21,50-31,00	40,00**	31,75-47,25
VAS while walking, mm (0-100)	51,00	34,75-61,00	59,00*	52,50-65,00	79,00**	68,25-87,25
Leken Index, points (0-25)	6,00	5,00-12,00	9,00*	8,00-12,50	13,50**	11,00-15,00

* The reliability of the differences $p < 0,05$

** The reliability of the differences $p < 0,05$ in comparison with the 2nd group

Analyzing the intensity of pain according to the VAS scale, a statistically significant difference was established between the three groups of patients. The most pronounced pain intensity was observed in cases of osteoporosis and osteopenia compared with normal BMD (Tabl. 3). So, patients with normal BMD had VAS indices at rest 14.50 (IQR 4.25-20.25), VAS when walking 51.00 (IQR 3.75-61.00), in cases of osteopenia, VAS at rest was 26.00 (IQR 21.50-31.00), VAS while walking - 59.00 (IQR 52.50-65.00), respectively, and in cases of osteoporosis - 40.00 (IQR

31.75-47.25) and 79.00 (IQR 68.25-87.25), respectively.

With the help of Leken algo-functional index severity of gonarthrosis was estimated. It turned out that indicators of the Leken index among three groups statistically differed significantly. Patients with normal BMD showed better performance (6.0 (IQR 5.00–12.00)) than patients with osteopenia (9.00 (IQR 8.00–12.50)), and patients with osteoporosis (13.50 (IQR 11.00-15.00) - worse than patients with osteopenia (Tabl. 3). This indicates a more severe course of gonarthrosis in cases of reduced BMD.

Table 4

DYNAMICS OF WOMAC INDICATORS DEPENDING ON THE BMD

Indicator	Group 1 normal BMD (n=32)		Group 2 osteopenia (n=38)		Group 3 osteoporosis (n=30)	
	Me	IQR	Me	IQR	Me	IQR
WOMAC (pain), mm (0-500)	219,50	183,00-254,50	304,00*	232,00-381,50	390,00**	282,50-469,75
WOMAC (stiffness), mm (0-200)	68,50	33,25-98,50	74,00*	49,00-107,00	129,00**	83,25-151,25
WOMAC (functional activity), mm (0-1700)	467,50	324,50-714,25	674,00*	428,00-830,50	1052,50**	734,00-1278,00
Total index WOMAC, mm (0-2400)	781,50	569,25-1080,75	1044,00*	825,00-1277,5	1503,00**	1170,50-1876,25

* The reliability of the differences $p < 0,05$

** The reliability of the differences $p < 0,05$ in comparison with the 2nd group

When assessing the WOMAC index, a statistically significant difference in the indices among patients with normal and low BMD was also detected, as can be seen from the table. 4. Yes, the pain was intense in cases of reduced BMD, especially in cases of

osteoporosis. Stiffness was also most pronounced in cases of osteoporosis and somewhat less of osteopenia. Functional activity was less pronounced among the 1st group, more in the 2nd group and the largest in the 3rd group of the examined.

Table 5

IMMUNOLOGICAL INDICATORS DEPENDING ON THE REDUCTION OF BMD

Indicator	1 group normal BMD (n=32)		2 group osteopenia (n=38)		3 group osteoporosis (n=30)	
	Me	IQR	Me	IQR	Me	IQR
IL-1,pg/ml	18,00	11,00-37,50	27,00*	3,00-40,50	31,73*	19,75-54,17
NO, mkmol/l	2,80	1,70-6,00	3,80	2,00-6,70	5,80**	2,85-8,36
IGF-1,ng/ml	589,00	502,00-600,00	524,00*	363,50-585,00	519,00*	449,00-600,00
CRP, mg/l	4,00	4,00-6,00	6,00*	6,00-8,00	17,00*	6,00-23,25
ESR, mm/hr	13,00	8,25-17,00	14,00	10,00-18,00	20,50*	15,00-24,25
Uric acid, umol/l	317,17	254,75-343,75	321,3	267,5-364,00	403,77*	324,50-499,00

* The reliability of the differences $p < 0,05$

** The reliability of the differences $p < 0,05$ in comparison with the 2nd group

When analyzing the indicators of the inflammatory process between patients with normal and lowered BMD, a statistically significant difference between these indicators were found. As can be seen from the table. 5, the most pronounced inflammatory process was observed in cases of osteoporosis, as

evidenced by higher levels of ESR, CRP, IL-1, NO, and reduced levels of IGF-1. The inflammatory process was less pronounced in cases of osteopenia compared with patients with normal BMD. Higher uric acid levels were also observed in cases of osteoporosis.

Table 6

DYNAMICS OF BMD DEPENDING ON THE INTAKE OF INDIVIDUAL SYMPTOMATIC SLOW-ACTING ANTI-INFLAMMATORY DRUGS

Indicator	Prior treatment		After treatment	
	Me	IQR	Me	IQR
Diacerein (n=62)	-1,6	-2,7 – -0,5	-0,9*	-0,9 – 0,4
Glucosamine sulfate (n=18)	-1,7	-2,4 – 0,7	-1,6	-2,4 – 0,3
Ginger root extract (n=20)	-1,6	-2,9 – -1,1	-1,5	-2,3 – 0

* The reliability of the differences $p < 0.05$

As can be seen from table 6, the use of symptomatic slow-acting drugs led to an increase in indicators of BMD. So a statistically significant increase in BMD was observed with patients taking

diacerein. Also, the indices of BMD with patients who took ginger root extract significantly changed with positive dynamics. With patients taking glucosamine sulfate, BMD indices did not change significantly.

Table 7

DYNAMICS OF ARTICULAR INDICES IN CASES OF OA WITH DIACEREIN TREATMENT

Indicator		Normal BMD (n=26)		Osteopenia (n=21)		Osteoporosis (n=15)	
		Me	IQR	Me	IQR	Me	IQR
VAS at rest, mm (0-100)	Prior treatment	14,00	5,75-21,00	42,50	25,00-56,25	43,25	33,00-50,50
	After treatment	8,85* (-37%)	4,25-15,5	34,50* (-19%)	20,00-41,75	35,00* (-19%)	28,50-40,5
VAS while walking, mm (0-100)	Prior treatment	37,43	24,50-51,25	76,6	65,00-89,25	73,3	67,25-77,00
	After treatment	26,43* (-29%)	17,25-32,00	61,3* (-20%)	51,75-71,25	62,46* (-15%)	54,50-68,50
Leken index, score (0-25)	Prior treatment	5,00	4,25-6,00	10,00	8,00-11,50	12,69	11,00-15,25
	After treatment	3,00* (-40%)	2,75-4,25	6,9* (-31%)	8,00-11,50	10,23* (-19%)	7,75-13,25

* The reliability of the differences $p < 0.05$

Depending on the indicator of BMD, the effectiveness of treatment of diacerein in cases of OA was evaluated. It was revealed that patients with normal

BMD responded to treatment better than patients with reduced BMD, as evidenced by the data from table 7.

Table 8

DYNAMICS OF ARTICULAR INDICES IN CASES OF OA WITH DIACEREIN TREATMENT

Indicator		Normal BMD (n=26)		Osteopenia (n=21)		Osteoporosis (n=15)	
		Me	IQR	Me	IQR	Me	IQR
WOMAC (pain), mm (0-500)	Prior treatment	198,00	146,25-235,00	285,70	221,25-355,25	362,61	312,00-455,50
	After treatment	127,28* (-36%)	97,50-190,75	202,10* (-29%)	131,25-250,00	292,85* (-19%)	278,00-352,00
WOMAC (stiffness), mm (0-200)	Prior treatment	63,85	36,00-98,25	80,70	42,00-131,75	117,46	65,25-152,00
	After treatment	41,71* (-35%)	19,50-56,00	57,50* (-29%)	22,75-91,25	90,08* (-23%)	55,50-111,50
WOMAC (functional activity), mm (0-1700)	Prior treatment	377,86	218,75-482,25	562,00	404,25-800,50	933,23	732,50-128,25
	After treatment	261,43* (-31%)	160,00-368,50	459,50* (-18%)	314,75-618,25	821,46* (-12%)	641,00-994,00
Summary index WOMAC, mm (0-2400)	Prior treatment	639,71	431,25-810,76	928,40	748,50-1206,75	1431,31	1215,00-1696,00
	After treatment	430,43* (-33%)	276,00-621,75	719,10* (-23%)	521,25-889,25	1204,38* (-16%)	1006,50-1427,5

* The reliability of the differences $p < 0.05$

As can be seen from the data in table 8, the index of BMD has a significant impact on the effectiveness of the treatment of OA. Assessing the dynamics of WOMAC indices before and after treatment, it is seen that in cases of normal BMD, pain decreased by 36%, stiffness by 35%, and functional activity improved by

31%. In cases of osteopenia, pain and stiffness decreased by 29%, and functional activity improved by 18%.

Finally, in cases of osteoporosis, pain decreased by only 19%, stiffness by 23%, and functional activity improved by 12%.

Table 9

DYNAMICS OF BMD PARAMETERS IN CASES OF OA WITH DIACEREIN TREATMENT

Indicator	Prior treatment		After treatment	
	Me	IQR	Me	IQR
Normal BMD (n=26)	0,51	-0,40 – 1,30	0,84*	0,10 – 1,30
Osteopenia (n=21)	-1,60	-1,87 – -1,33	-0,95*	-1,53 – -0,4
Osteoporosis (n=15)	-3,58	-4,60 – -2,70	-3,02	-3,35 – -2,30

* The reliability of the differences $p < 0,05$

Studying the dynamics of indicators of BMD among the three groups revealed a statistically significant increase in indicators in cases of normal

BMD and osteopenia, while in cases of osteoporosis, the indicators did not significantly change (Table 9).

Table 10

DYNAMICS OF IMMUNOLOGICAL PARAMETERS IN CASES OF OA WITH DIACEREIN TREATMENT

Indicator		Normal BMD (n=26)		Osteopenia (n=21)		Osteoporosis (n=15)	
		Me	IQR	Me	IQR	Me	IQR
CRP, mg/l	Prior treatment	5,57	3,25-6,75	8,00	6,00-9,00	13,31	6,00-21,00
	After treatment	4,57* (-18%)	2,00-5,00	6,80* (-15%)	4,75-7,75	12,50 (-6%)	6,25-18,00
ESR, mm/hr	Prior treatment	8,86	6,00-12,25	15,40	10,00-21,25	19,15	14,50-24,50
	After treatment	6,42* (-28%)	6,00-8,50	12,40* (-19%)	7,50-18,50	17,30* (-10%)	12,00-22,00
IL-1, pg/ml	Prior treatment	18,43	11,25-23,00	27,10	7,50-45,75	39,77	18,98-61,50
	After treatment	12,28* (-33%)	4,75-23,00	21,30* (-21%)	6,50-35,50	34,85 (-12%)	16,50-57,50
NO, mkmol/l	Prior treatment	2,37	1,60-28,00	5,14	2,86-7,60	5,05	2,20-7,48
	After treatment	1,54* (-35%)	1,00-2,20	3,89* (-24%)	2,22-5,04	4,11 (-19%)	1,60-7,35
IGF-1, ng/ml	Prior treatment	437,29	245,00-542,00	306,90	193,25-440,50	381,14	234,75-489,00
	After treatment	574,0* (+24%)	569,25-600,00	380,9* (+19%)	227,5-534,72	437,08 (+13%)	351,75-535,00

* The reliability of the differences $p < 0,05$

As for immunological parameters, it is also clear that a statistically significant improvement in immunological parameters was observed in cases of normal BMD and osteopenia, while in cases of osteoporosis, BMD did not significantly change (Table 10).

Findings:

1. As a result of the study, it was shown that patients with reduced BMD have a more severe course of OA.
2. It has been established that patients with reduced BMD on radiographic signs have more severe

damage to knee joints according to the classification J.H. Kellgren and J.S. Lawrence.

3. It was revealed that in cases of osteopenia, pain in knee joints is more pronounced at rest and in walking compared to normal BMD, and in osteoporosis, it is much greater compared to normal BMD and osteopenia.

4. Patients with osteopenia and osteoporosis, compared with normal BMD, suffer more severe pain, stiffness, as well as reduced functional activity in knee joints.

5. It is proved that in cases of reduced bone mineral density there is a more intense inflammatory process (according to the ESR, CRP, IL-1, NO, IGF-1) than in cases of normal BMD.

6. The use of symptomatic slow-acting anti-inflammatory drugs, namely diacerein, in cases of OA led to an increase in BMD and changes towards normalization of immunological parameters and articular syndrome, more pronounced in cases of normal BMD and osteopenia while in cases of osteoporosis, immunological parameters did not change significantly.

8. So, in cases of OA with osteopenia, diacerein can be limited, and cases of osteoporosis, it is desirable to include drugs in the treatment of antiosteoporotic.

References

1. Bijlsma J.W., Berenbaum F., Lafeber F.P. (2011) Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *Lancet*, 377: 2115–2126

2. Pereira D., Peleteiro B., Araújo J., Branco J., Santos R.A., Ramos E. (2011) The effect of osteoarthritis definition on prevalence and incidence

estimates: asystematic review. *Osteoarthritis Cartilage*; 19:1270–85.

3. Richette P., Funk-Brentano T. (2010) What is new on the osteoarthritis front? *Eur. Musculoskeletal Rev.*, 5(2): 8–10

4. Souich P. (2009) Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of chondroitin sulphate. *Eur. Musculoske. Rev.*, 4(2): 8–10.

5. Deduh NV, Yakovenchuk NN (2013) Osteoarthritis and osteoporosis: similarity and difference. *Magazine "Pain. Joints. Spine »* 1 (09) 2013

6. Kovalenko VM, Shuba NM (2013) *National Textbook on Rheumatology*. - K.: Morion. – 672.

7. Kovalenko VN «2015 in Ukrainian Cardiology and Rheumatology» *Health of Ukraine №1* (44) 2016, 5-7

8. Nasonov EL (2000) Osteoporosis and osteoarthritis: mutually exclusive or complementary diseases? // *Consilium medicum*. № 2(6). 248-250.

9. VV Povoroznyuk (2009) Diseases of the musculoskeletal system and age / VV Povorozniuk // *Problems of osteology*. - V. 12, № 4. - 6-15.

#10 (50), 2019 część 3
Wschodnioeuropejskie Czasopismo Naukowe
(Warszawa, Polska)
Czasopismo jest zarejestrowane i publikowane w Polsce. W czasopiśmie publikowane są artykuły ze wszystkich dziedzin naukowych. Czasopismo publikowane jest w języku polskim, angielskim, niemieckim i rosyjskim.

Artykuły przyjmowane są do dnia 30 każdego miesiąca.

Częstotliwość: 12 wydań rocznie.

Format - A4, kolorowy druk

Wszystkie artykuły są recenzowane

Każdy autor otrzymuje jeden bezpłatny egzemplarz czasopisma.

Bezpłatny dostęp do wersji elektronicznej czasopisma.

Zespół redakcyjny

Redaktor naczelny - Adam Barczuk

Mikołaj Wiśniewski

Szymon Andrzejewski

Dominik Makowski

Paweł Lewandowski

Rada naukowa

Adam Nowicki (Uniwersytet Warszawski)

Michał Adamczyk (Instytut Stosunków Międzynarodowych)

Peter Cohan (Princeton University)

Mateusz Jabłoński (Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki)

Piotr Michalak (Uniwersytet Warszawski)

Jerzy Czarnecki (Uniwersytet Jagielloński)

Kolub Frennen (University of Tübingen)

Bartosz Wysocki (Instytut Stosunków Międzynarodowych)

Patrick O'Connell (Paris IV Sorbonne)

Maciej Kaczmarczyk (Uniwersytet Warszawski)

Dawid Kowalik (Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki)

Peter Clarkwood (University College London)

#10 (50), 2019 part 3
East European Scientific Journal
(Warsaw, Poland)
The journal is registered and published in Poland. The journal is registered and published in Poland. Articles in all spheres of sciences are published in the journal. Journal is published in **English, German, Polish and Russian.**

Articles are accepted till the 30th day of each month.

Periodicity: 12 issues per year.

Format - A4, color printing

All articles are reviewed

Each author receives one free printed copy of the journal

Free access to the electronic version of journal

Editorial

Editor in chief - Adam Barczuk

Mikołaj Wiśniewski

Szymon Andrzejewski

Dominik Makowski

Paweł Lewandowski

The scientific council

Adam Nowicki (Uniwersytet Warszawski)

Michał Adamczyk (Instytut Stosunków Międzynarodowych)

Peter Cohan (Princeton University)

Mateusz Jabłoński (Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki)

Piotr Michalak (Uniwersytet Warszawski)

Jerzy Czarnecki (Uniwersytet Jagielloński)

Kolub Frennen (University of Tübingen)

Bartosz Wysocki (Instytut Stosunków Międzynarodowych)

Patrick O'Connell (Paris IV Sorbonne)

Maciej Kaczmarczyk (Uniwersytet Warszawski)

Dawid Kowalik (Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki)

Peter Clarkwood (University College London)

Igor Dzedzic (Polska Akademia Nauk)
Alexander Klimek (Polska Akademia Nauk)
Alexander Rogowski (Uniwersytet Jagielloński)
Kehan Schreiner(Hebrew University)
Bartosz Mazurkiewicz (Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki)
Anthony Maverick(Bar-Ilan University)
Mikołaj Żukowski (Uniwersytet Warszawski)
Mateusz Marszałek (Uniwersytet Jagielloński)
Szymon Matysiak (Polska Akademia Nauk)
Michał Niewiadomski (Instytut Stosunków Międzynarodowych)
Redaktor naczelny - Adam Barczuk

1000 kopii.

Wydrukowano w «Aleje Jerozolimskie 85/21, 02-001 Warszawa, Polska»

Wschodnioeuropejskie Czasopismo Naukowe

Aleje Jerozolimskie 85/21, 02-001
Warszawa, Polska

E-mail: info@eesa-journal.com ,

<http://eesa-journal.com/>

Igor Dzedzic (Polska Akademia Nauk)
Alexander Klimek (Polska Akademia Nauk)
Alexander Rogowski (Uniwersytet Jagielloński)
Kehan Schreiner(Hebrew University)
Bartosz Mazurkiewicz (Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki)
Anthony Maverick(Bar-Ilan University)
Mikołaj Żukowski (Uniwersytet Warszawski)
Mateusz Marszałek (Uniwersytet Jagielloński)
Szymon Matysiak (Polska Akademia Nauk)
Michał Niewiadomski (Instytut Stosunków Międzynarodowych)
Editor in chief - Adam Barczuk

1000 copies.

Printed in the "Jerozolimskie 85/21, 02-001 Warsaw, Poland»

East European Scientific Journal

Jerozolimskie 85/21, 02-001 Warsaw,
Poland

E-mail: info@eesa-journal.com ,

<http://eesa-journal.com>