

УДК 616.982.23-085.36:597.553.2

Н.Ф. Тимченко, С.Н. Павлович, В.К. Покровский,
Л.С. Долматова, Т.А. Кузнецова, Т.К. Каленик,
Л.М. Эпштейн

ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ДНК ИЗ МОЛОК ЛОСОСЕВЫХ РЫБ ПРИ ПСЕВДОТУБЕРКУЛЕЗЕ

НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН
(г. Владивосток),
Тихоокеанский государственный экономический
университет (г. Владивосток),
Тихоокеанский океанологический институт
им. В.И. Ильичева ДВО РАН (г. Владивосток),
Тихоокеанский научно-исследовательский
рыбохозяйственный центр (г. Владивосток)

Ключевые слова: низкомолекулярная ДНК,
антиокислительные ферменты, нейтрофилы,
псевдотуберкулез.

Псевдотуберкулез представляет собой острую инфекцию, характеризующуюся полиморфизмом клинических проявлений: поражением желудочно-кишечного тракта, опорно-двигательного аппарата, печени и других органов, общей интоксикацией, экзантемой, часто рецидивирующим и затяжным течением [8]. Патогенность возбудителя псевдотуберкулеза — *Yersinia pseudotuberculosis* — обусловлена инвазивной, антифагоцитарной и токсической функциями бактерии и ее биомолекулами, оказывающими влияние на макроорганизм с первых минут инфицирования. Значительную роль в патогенезе псевдотуберкулеза играет термолabileльный летальный токсин *Y. pseudotuberculosis* (ТЛПҮр) — белок с молекулярной массой 200 кДа, вызывающий гибель мышей при перитонеальном введении [6, 7, 9].

В настоящее время в комплексной терапии ряда инфекционных заболеваний применяют биологически активные вещества, в частности, из морских гидробионтов, обладающие иммунокорригирующим действием [3, 4]. К природным биологически активным веществам, обладающим иммунокорригирующим свойством, относится и низкомолекулярная дезоксирибонуклеиновая кислота (нДНК), выделенная из молок лососевых рыб [2].

Целью работы явилось изучение влияния нДНК из молок лососевых рыб на тяжесть течения псевдотуберкулеза, а также на функциональное состояние клеток иммунной системы при введении ТЛПҮр *in vitro*.

В работе использованы вирулентные и токсигенные штаммы *Y. pseudotuberculosis*: 512— I серовар (выделен от больного в 1983 г.) и 2517 — III серовар (получен от Н. Mollaret, Франция); термолabileльный летальный токсин, выделенный методом Е.П. Не-

дашковской [6], нДНК из молок лососевых рыб [2] и напитки — бифидумбактерин на тыквенной основе с нДНК и бифидумбактерин на соевой основе с нДНК. В экспериментах использовали 360 неинбредных мышей. Результаты обрабатывали методом вариационной статистики с учетом критерия Стьюдента [1].

Для оценки влияния профилактического скармливания нДНК на выживаемость и иммунитет мышей при псевдотуберкулезе животные были разделены на следующие группы: 1-я (контрольная) — мыши, не получавшие напитков с нДНК до инфицирования иерсиниями, 2-я (опыт) — животные, получавшие нДНК, и 3-я (опыт) — животные, получавшие напитки с нДНК. Наблюдение вели в течение 9 дней.

При определении влияния нДНК в составе бифидумбактерина на тыквенной основе¹ на фагоцитарные процессы при псевдотуберкулезе мыши опытной группы получали в течение 7 суток напитков с нДНК по 60—70 мл на животное в сутки с последующим внутрибрюшинным заражением *Y. pseudotuberculosis* по 107 мк/мл. Через 30 мин, 1, 3 и 5 часов от момента заражения забирали клетки перитонеального экссудата, окрашивали мазки азур-П-эозином и определяли фагоцитарное число (ФЧ) и фагоцитарный показатель (ФП).

В отдельной серии экспериментов изучали влияние профилактического скармливания нДНК на функциональную активность (оксидантную и антиоксидантную ферментную активность) нейтрофилов мышей при воздействии термолabileльного летального токсина *in vitro*. В контроле мыши получали стандартное питание. Опытным животным на протяжении 7 дней ежедневно скармливали нДНК в дозе 0,192 мкг и давали напитки с нДНК. Нейтрофилы выделяли из экссудата перитонеальной полости. Токсин (380 мкг/мл) инкубировали с нейтрофилами ($3,09 \cdot 10^6$ /мл) в течение 30 мин при температуре 37°C. Оксидантную активность клеток оценивали с помощью теста с нитросиним тетразолием [5]. Спектрофотометрически определяли активность антиоксидантных ферментов — супероксиддисмутазы, глутатионредуктазы, каталазы [4, 12, 11].

При наблюдении за тяжестью течения псевдотуберкулезной инфекции у мышей, профилактически получавших нДНК и напитки, ее содержащие, выявлено увеличение процента выживших животных в опыте по сравнению с контролем. Так, на 3-и сутки от момента заражения 100% летальной дозой *Y. pseudotuberculosis* в контроле выжило $87,5 \pm 11,6\%$, в опытных же группах — выжило 100% мышей. На 5-е сутки в контрольной группе в живых осталось $62,5 \pm 17,1\%$ животных. В опытных группах выжило 100% мышей. Доля выживших мышей, которым профилактически скармливали напиток на тыквенной основе, составил $87,5 \pm 12,5\%$. На 7-е сутки в группе, употреблявшей напиток с нДНК на соевой основе, выжило $60,0 \pm 12,9\%$

¹ТУ 9224-128-02067936-2004: «Напиток кисло-молочный бифидумбактерин на тыквенной основе с нДНК». - Владивосток, 2004 (внесен в реестр государственной регистрации № 035/003195 от 20.07.2004 г.). ТУ 9224-129-02067936-2004: «Напиток кисло-молочный бифидумбактерин на соевой основе с нДНК». — Владивосток, 2004 (внесен в реестр государственной регистрации № 035/003196 от 20.07.2004 г.).

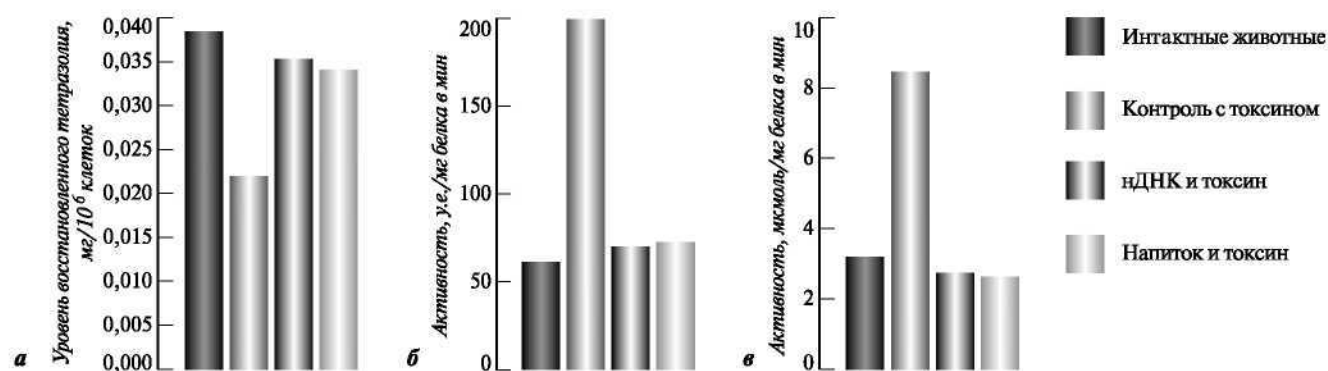


Рис. 1. Влияние нДНК на окислительную активность (а), активность супероксиддисмутазы (б) и активность каталазы (в) перитонеальных нейтрофилов мышей при введении термолабильного летального токсина *Y. pseudotuberculosis*.

животных. В контроле за этот период остались живыми $37,5 \pm 17,1\%$ мышей. К 9-м суткам при 100% гибели в контроле, в опытной группе, профилактически получавшей нДНК, выжило $85,7 \pm 13,4\%$ мышей.

Профилактическое употребление нДНК или напитка с нДНК до введения токсина приводило к снижению выраженности патологического действия летального токсина на животных. Так, в группе, получавшей нДНК за сутки до введения токсина, выжило $75,0 \pm 11,6\%$ мышей, в то время как в контроле все мыши погибли. В группе, получавшей продукт на тыквенной основе с нДНК, выжило 100% мышей.

При изучении влияния нДНК в составе бифидумбактерина на тыквенной основе на функциональную активность перитонеальных нейтрофилов по отношению к *Y. pseudotuberculosis* установлено, что через полчаса после инфицирования ФП в опытной группе возрастал на 9,2% по сравнению с контролем, а ФЧ увеличивалось на 0,63. Через 1 час данные показатели продолжали увеличиваться, и в опытной группе ФП достигал $57,3 \pm 2,4\%$, что на 13,3% больше, чем в контроле. При этом ФЧ в опытной группе составило $2,83 \pm 0,05$, что на 1,31 превышало ФЧ в контроле. Максимальное значение ФП в опытной группе выявлено через 3 часа после заражения — $72,2 \pm 4,2\%$, что на 24% больше, чем в контроле. В опыте ФЧ составило $4,42 \pm 0,4$, превышая таковое в контроле. Через 5 часов ФП в обеих группах уменьшался, однако разница результатов между опытной и контрольной группами сохранилась. Таким образом, можно заключить, что нДНК в составе продукта на тыквенной основе стимулирует функциональную активность фагоцитов.

При оценке влияния нДНК как отдельно, так и в составе напитка на окислительную и антиокислительную активность перитонеальных нейтрофилов было установлено, что в интактных клетках нДНК достоверно снижала окислительную активность, способствуя сохранению их фагоцитарного потенциала (рис. 1,а). В качестве стимулирующего инфекционного агента использовали сублетальную концентрацию термолабильного летального токсина иерсиний. Клетки, полученные от животных, инкубировали с токсином в течение получаса, затем проводили оценку окислительной активности нейтрофилов и актив-

ности их антиокислительных ферментов. Воздействие термолабильного токсина на нейтрофилы приводило к резкому снижению окислительной активности. При инкубации нейтрофилов контрольных мышей с токсином уровень восстановленного тетразолия в клетках был в 1,75 раза ниже, чем в клетках, не инкубированных с токсином, и в 1,6 раза меньше, чем в клетках мышей, получавших нДНК. В опыте при воздействии токсина на нейтрофилы мышей, получавших нДНК, уровень восстановленного реактива в них изменялся незначительно и фактически соответствовал уровню в клетках, не инкубированных с токсином.

При воздействии термолабильного летального токсина на нейтрофилы наблюдалось резкое увеличение активности супероксиддисмутазы (в 3,3 раза) и каталазы (в 3,1 раза) в сравнении с показателями активности этих ферментов в клетках, не инкубированных с токсином.

В то же время в контроле под действием токсина было отмечено снижение активности глутатионредуктазы в клетках. В опыте не было выявлено достоверных изменений активности антиокислительных ферментов в клетках под влиянием токсина (рис. 1,б, в). Установлено, что токсин не снижал окислительную активность нейтрофилов мышей, употреблявших нДНК, и не оказывал дестабилизирующего влияния на антиокислительную ферментную систему клеток. Низкомолекулярная ДНК оказывала стабилизирующее влияние на антиокислительную ферментную систему нейтрофилов мышей, предотвращая резкое повышение их активности при введении термостабильного летального токсина.

Таким образом, профилактическое скармливание нДНК как отдельно, так и в составе бифидумбактерина способствовало 75–100% выживанию животных, инфицированных бактериями псевдотуберкулеза. Применение нДНК при токсинемии, вызванной термолабильным летальным токсином, приводило к выживанию 75% мышей. Обнаружено стимулирующее влияние нДНК в составе напитка на фагоцитарный процесс. Ее использование приводило к коррекции патогенного воздействия токсина на окислительную и антиокислительную системы нейтрофилов. Полученные данные свидетельствуют о том, что резистентность

иммунитета мышей к псевдотуберкулезной инфекции при профилактическом приеме нДНК может быть обусловлена тем, что она предотвращает оксидантный стресс в фагоцитах при действии термолабильного летального токсина *Y. pseudotuberculosis*, что способствует повышению выживаемости животных.

Литература

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. *Статистические методы в микробиологических исследованиях*. — Л. : Медгиз, 1962.
2. Беседнова Н.Н., Эпштейн Л.М. *Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) из молок рыб — перспективы клинического применения (в помощь практическому врачу)*. — Владивосток : ТИПРО-Центр, 2002.
3. Запорожец Т.С. // *Антибиотики и химиотерапия*. — 2003. - Т. 48, № 9. - С. 3-7.
4. Логвиненко А.А., Долматова Л.С., Тимченко Н.Ф., Эпштейн Л.М. // *Антибиотики и химиотерапия*. — 2001. - Т. 46, № 2. - С. 17-21.
5. Мельников В.П. // *Лабораторное дело*. — 1991. — № 8. - С. 51-53.
6. Недашковская Е.П. // *Проблемы инфекционной патологии в Сибири, на Дальнем Востоке и Крайнем Севере*. — Новосибирск, 1996 — С. 16—17.
7. Пашин А.Ю. *Совершенствование методов выделения и идентификации экзотоксина псевдотуберкулезного микроба : автореф. дис. ... канд. мед. наук*. — Саратов, 1986.

8. Сомов Г.П., Покровский В.И., Беседнова Н.Н., Антоненко Ф.Ф. *Псевдотуберкулез*. — М. : Медицина, 2001.
9. Тимченко Н.Ф., Недашковская Е.П., Долматова Л.С., Сомова-Исачкова Л.М. *Токсины Yersinia pseudotuberculosis*. — Владивосток : Примполиграфкомбинат, 2004
10. Юсупова Л.Б. // *Лабораторное дело*. — 1989. — № 4. - С. 19-21.
11. Beachamp C.O., Fridovich. I. // *Anal. Biochem.* — 1971. - Vol. 44. - P. 276-287.

Поступила в редакцию 19.06.06.

OPPORTUNITY OF USE OF DNA FROM THE SALMON SPERM AT THE PSEUDO-TUBERCULOSIS

N.F. Timchenko, S.N. Pavlinich, V.K. Pokrovsky et al. *Scientific Research Institute of Epidemiology and microbiology Siberian Branch of the RAMS, Pacific State Economic University, Pacific Oceanologic Institute named by V.I. Il'yichev Far-Eastern Branch of the Russian Academy of Science, Pacific Research Fish-farming Center (Vladivostok)*

Summary — The action of low-molecular DNA from salmon sperm and the drinks enriched with this substance is investigated, at experimental pseudo-tuberculosis. At prophylactic feeding of the animals by IDNA and drinks, containing it, the survival rate of mice at infection of them with 100% lethal doze of bacteria raised. DNA stimulated the functional activity of peritoneal neutrophil cells and prevented the lethal action of the thermo resistant toxin of *Y. pseudo-tuberculosis*. The use of DNA resulted in correction of pathogenic influence of the thermo resistant lethal toxin on oxidizing and antioxidizing enzyme systems of mice's neutrophil cells.

Pacific Medical Journal, 2006, No. 4, p. 80-82.

УДК614.27:615.1

Н.И. Елисеева

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЭТАПНОГО КАЛЬКУЛИРОВАНИЯ В ОПТИМИЗАЦИИ РАБОТЫ АПТЕКИ СОВМЕСТНОГО ПРЕДПРИЯТИЯ

Дальневосточный государственный медицинский университет (г. Хабаровск),
Аптека «Эй И Эй Интернэшнл (Сахалин) ЗАО»
(г. Южно-Сахалинск)

Ключевые слова: совместное предприятие, аптека, модель, управление ассортиментом.

Сахалинская область является наиболее инвестируемой территорией Дальневосточного экономического региона [3]. Запасы нефти и газа на шельфе острова стали важным фактором экономического развития не только Сахалинской области и прилегающих областей и краев России, но и всего Азиатско-Тихоокеанского региона. На сегодняшний день сахалинские нефтегазовые проекты являются крупнейшими инвестиционными проектами в России. Одной из наиболее эффективных форм прямых иностранных инвестиций служат совместные предприятия [1,2]. На территории

области зарегистрировано и активно работают более 300 совместных предприятий. Доля иностранных партнеров в их уставном капитале составляет 54,9%. Освоение нефтегазовых проектов происходит в отдаленном районе, в сложных ледовых условиях, при повышенной сейсмической активности. Все это требует применения современных технологических разработок в различных отраслях народного хозяйства.

«Эй И Эй Интернэшнл (Сахалин) ЗАО» — лидирующая организация Дальневосточного региона в предоставлении медицинских услуг международного уровня на удаленных рабочих площадках компаний, работающих в рамках проектов «Сахалин-1» и «Сахалин-2». ЗАО имеет аптеку и осуществляет различные виды фармацевтической деятельности в соответствии с лицензией, с соблюдением законодательства РФ и международных стандартов ISOS [9]. Аптека осуществляет лекарственное обеспечение 20 медицинских пунктов, расположенных в отдаленных районах, как на суше, так и на буровых платформах в море (таких, как Моликпак, Орлан), а также на кораблях.

Целью настоящего исследования послужила разработка комплексной программы по лекарственному обеспечению, ассортиментной политике предприятия. В соответствии с поставленной целью были выдвинуты следующие задачи: