

**БЕЛКОВЫЙ СПЕКТР МЕМБРАН
ЭРИТРОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТРОГО
ПАНКРЕАТИТА И ХОЛАНГИТА**

Гаврилюк В.П., Конопля А.И.

*Курский государственный медицинский университет,
Курск*

Лечение больных с острыми формами панкреатита и холангита и их обострениями остается сложной и трудоемкой проблемой не только хирургии, но и всей медицины в целом. Столь значительные изменения на макроскопическом уровне, сопровождающие заболевания билиарного тракта, безусловно, опосредуются в изменении архитектоники клеточных мембран тканей и органов. Изучение количественной и качественной представительности белков в цитоплазматической мембране позволит раскрыть патогенез осложнений данных патологий на микроскопическом уровне.

Цель исследования – качественное и количественное изучение изменения белкового спектра мембран эритроцитов у животных с острым панкреатитом и острым холангитом.

Исследования проведены на крысах Вистар, которые были разделены на 3 группы (по 10 животных в каждой группе): контрольная группа животных с лапаротомией (ложная операция), животные с острым панкреатитом и животные с острым холангитом. Острый панкреатит моделировали по Шалимову С.А. (1989) в модификации Чуевой Т.В. (2002) путем криодеструкции головки поджелудочной железы и нанесения травмы селезеночного сегмента органа. Экспериментальный острый отечный панкреатит развивался через 3 часа, что подтверждалось морфологически. Гнойный обтурационный холангит был смоделирован по Ахаладзе Г.Г. (1994) в нашей модификации (). На пятые сутки после моделирования холангита у экспериментальных животных под эфирным наркозом забирали кровь из хвостовой вены. Эритроциты получали из 5 мл гепаринизированной крови по методу Beutler с незначительной модификацией. Мембраны эритроцитов получали методом Dodge. Электрофорез проводили в присутствии додецилсульфата натрия в вертикальных колонках полиакриламидного геля по методу Laemmli.

В результате проведенного сравнительного анализа (критерий Стьюдента, $p < 0,05$) количественного содержания белков мембран животных контрольной группы и животных с острым панкреатитом установлены достоверные различия между представительностью ряда белковых фракций. У животных с панкреатитом происходит снижение как α - так и β -спектрина (на 30,4% и 28,5% соответственно), снижается представительность анкирина (подфракции 2.1, 2.2 и 2.3; почти в 2 раза) и белка полосы б (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; на 24,2%). Уменьшение количества α - и β -спектрина, образующих двумерную сеть цитоскелета эритроцитов и, вместе с ними, анкирина, определяющего степень изгиба мембраны, при экспериментальном панкреатите приводит к увеличению гибкости и эластичности, но к резкому уменьшению прочности и деформабельности эритроцитарной мембраны.

При гнойном обструктивном холангите происходит увеличение представительности анионтранспортного белка (или белка полосы 3; на 21,1%), β -спектрина (на 16,0%) и белка полосы 4.5 (на 57,8), но уменьшение представительности глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (на 39,6%). Можно предположить, что выявленные изменения белкового спектра в мембране эритроцитов являются компенсаторной реакцией организма на изменения, сопровождающиеся гнойным обструктивным холангитом. Но повышение функциональной активности и прочности эритроцитарной мембраны приводит к ускорению процесса старения эритроцитов.

Полученные изменения белкового спектра в условиях изучаемых патологий гепатобилиарной системы приводят к уменьшению прочности и эластичности эритроцитов и ускорению процесса их старения, что диктует необходимость использования фармакологических способов коррекции физико-химических свойств эритроцитов.

**ПРОБЛЕМЫ ДИАГНОСТИКИ И
ПРОФИЛАКТИКИ ИКБ И КЭ
В КРАСНОДАРСКОМ КРАЕ**

Гальцева Г.В., Пиликова О.М.,

Ковтун С.И., Малай В.И., Стержантова Л.В.

*ФГУЗ Причерноморская противочумная станция,
Новороссийск*

В природных ландшафтах Черноморского побережья широко распространены кровососущие членистоногие, переносчики трансмиссивных инфекций вирусной и бактериальной этиологии. При эпизоотологических исследованиях в последние годы особое внимание уделяли отлову клещей, преимущественно *I. ricinus*, при исследовании которых выявили возбудителей туляремии, листериоза, клещевого боррелиоза, а так же возбудителей клещевого энцефалита (3,4).

Материалы и методы. Материалом для исследования служили суспензии клещей (нимфы, имаго) голодных и напивавшихся, суспензии органов экспериментально зараженных белых мышей, сыворотки крови КРС и МРС. От больных поступали кровь, сыворотка, плазма крови, ЦСЖ с диагнозами: лихорадка неясной этиологии, КЭ, КМЭ, менингит, энцефалит, менингоэнцефалит, энцефаломиелит, миеломная болезнь, серозный менингит, энцефалопатия, лимфоцитоз, ХАД, заболевания опорнодвигательной системы и другие.

Методом выбора при диагностике иксодового клещевого боррелиоза (ИКБ) является НРИФ. Для постановки реакции использовали корпускулярный антиген Ip-21 *V. afzelii* и ФИТЦ – меченные конъюгаты поливалентные, против IgM и IgG человека производства НИИЭМ им.Н.Ф.Гамалеи. Антитела к боррелиям выявляли в титрах 1:40-1:640. НРИФ также ставили с целью обнаружения боррелиозного антигена в ЦСЖ. Мазки обрабатывали антиборрелиозной сывороткой, на другой мазок наносили гомологичную сыворотку этого же больного с титром антител 1:160 – 1:320, на третий – отрицательную сыворотку. При постановке ИФА использовали диагностическую

тест-систему (ООО «ОМНИКС», Санкт-Петербург) для обнаружения иммуноглобулинов класса М и класса G к *Borrelia burgdorferi* s.l. ПЦР ставили с набором реагентов «Ампли-Лайм» (ООО «ОМНИКС») для обнаружения хромосомной ДНК патогенных генотипов боррелий (*Borrelia burgdorferi* ss, *B.afzelii*, *B.garini*, *B.valaisiana*, *B.lusitaniae*) размер специфического ампликона 500 н.п. В ПЦР используется внутренний контроль, представляющий собой плазмиду со встроенным участком ДНК размером 800 н.п. Детекцию продуктов амплификации проводили в агарозном геле 1,7%. Для выявления инфицирования вирусом КЭ и установления диагноза клещевого энцефалита повсеместно используются лабораторные методы иммуноферментного анализа антигенов ВКЭ и антител к ним в сыворотках крови пациентов. Анализ антигена ВКЭ используется для определения инфицированности клещей, снятых с людей или с КРС и МРС. ИФА предназначен для выявления ВКЭ в ликворе человека или животных и используется в клинических и эпидемиологических исследованиях, а так же для выявления IgM к ВКЭ и IgG к ВКЭ (ЗАО «Вектор-Бест»). Данные тест-системы выпускаются в соответствии с требованиями ВФС 42-3503-99 и её производство сертифицировано как медицинского иммунобиологического препарата (1).

Работами авторов (6,9) показаны преимущества анализа РНК ВКЭ перед анализом антигенного вируса иммуноферментным методом. Авторы считают, что возможны расхождения результатов ПЦР и ИФА, причина объясняется маскировкой вируса за счет формирования иммунных комплексов. ЗАО «Вектор-Бест» предоставляет тест – систему анализа в его наиболее высокочувствительном варианте, основанном на методе обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР). Для увеличения чувствительности анализа этап ПЦР проводили в «nested» - варианте: первый раунд – с «внешней» парой олигонуклеотидов – праймеров, второй раунд – с «внутренней» парой олигонуклеотидов - праймеров и аликвотой реакционной смеси ПЦР первого раунда в соответствии с наставлением. Размер специфического ампликона в первом раунде ПЦР с «внешними» праймерами – 340 пар оснований, во втором раунде ПЦР с «внутренними» праймерами – 171 пара оснований. Детекцию результатов ПЦР- анализа проводили визуально после гель-электрофореза в агарозе. В наших исследованиях не всегда результаты ПЦР совпадали с результатами ИФА. Несовпадение результатов возможно объяснить инфицированием людей т.н. дефектными вариантами вирусов. Лица, инфицированные антигенно – дефектными штаммами, в клинических условиях образуют группу т.н. серонегативных больных и больных с низкими титрами антител (4).

Результаты и обсуждение. Анализ результатов клинико-эпидемиологического обследования позволил установить, что на территории Краснодарского края и Р.Адыгея встречаются разнообразные нозологические формы ИКБ и включают все основные, характерные для этой инфекции синдромы: общинфекционный, поражения кожи, нервной, сердечно-

сосудистой системы и опорно-двигательного аппарата (4,5).

Следует отметить, что курируемая территория не входит в перечень регионов по распространению КЭ. Однако данные, полученные в нашей лаборатории, позволяют говорить о расширяющемся ареале распространения иксодовых клещей, носителей ВКЭ, и, по-видимому, о расширении территории заболеваемости клещевым энцефалитом. Комплексное исследование полевого материала на зараженность возбудителями природноочаговых инфекций позволило установить, что в суспензии клещей обнаруживается ДНК боррелий методом ПЦР и в этих же пробах выявили антиген вируса КЭ. Таким образом, на территории края циркулируют возбудители ИКБ и КЭ, что может привести к развитию микст-инфекции у людей. Следует отметить, что еще в 1989 – 2000гг. антиген ВКЭ был обнаружен у диких млекопитающих в 24 случаях, у клещей – 37 пробах. Антитела к ВКЭ обнаружили в трех сыворотках с/х животных и в тридцати сыворотках людей. В 2004 году антитела к ВКЭ обнаружены в пяти сыворотках людей с диагнозом ЛНЭ (лихорадка неясной этиологии).

По данным различных авторов (2,7,8,10) частота возникновения микст-инфекций (МИ) ИКБ и КЭ в разных регионах страны колеблется в широких пределах – до 4,8 %.

Нами в 2004 году подтверждена МИ (ИКБ+ КЭ) у больного из Вологды, где произошел укус клеща, а так же в 2005 году у больной г.Краснодара. Следует отметить, что положительные результаты были получены в НРИФ, ПЦР, а ИФА результаты были отрицательные. Определение вирусной РНК в плазме крови больной и ЦСЖ и отрицательный результат ИФА вероятно указывает на серонегативную форму болезни КЭ. Положительные результаты на ИКБ получены у этой больной методом ПЦР и НРИФ. Антитела к боррелиям выявлены в титре

1: 320. В НРИФ при поиске антигена в ЦСЖ наблюдали специфическое свечение клеток боррелий как с положительной антиборрелиозной сывороткой, так и с гомологичной плазмой больной. Клиническое распознавание ИКБ и КЭ на первом этапе основывается на известных клинико-эпидемиологических данных. При КЭ в анамнезе также выявляется укус клещей или употребление сырого инфицированного молока коров или коз. А клинические исследования выявляют нейроинфекционный характер болезни. При МИ (ИКБ+ КЭ) прослеживаются три основных синдрома: общий инфекционный, менингеальный и очаговое поражение нервной системы.

Заключение. Опыт работы последних лет указывает на необходимость проведения исследований по клещевым инфекциям на территории края по совершенствованию эпизоотолого – эпидемиологического надзора, оснащения лабораторий современными диагностическими тест-системами, совершенствования методов профилактики и проведения акарицидных обработок. Проведение этих мероприятий невозможно без поддержки централизованных и местных бюджетных средств. Очень актуальным является решение вопроса о комплексной серологической диагностике, позволяющей обнаруживать антитела и антигены к

различным возбудителям клещевых инфекций, особенно МИ, и своевременном назначении сочетанной противовирусной терапии с антибиотиками в остром периоде болезни. В целях улучшения качества диагностической помощи, её унификации, совершенствования необходимо разработать и внедрить единую информационную систему слежения с помощью компьютерной обработки специальных тематических карт, заполняемых лечащими врачами на каждого больного (11).

С целью прогнозирования заболеваемости клещевыми инфекциями необходимо динамичное слежение за распространением клещей, их вирусофорностью, определения зон прокормителей клещей, территории риска. Следует проводить работу с населением через СМИ. Необходимо уделять особое внимание совершенствованию уровня подготовки врачей и средних медицинских работников по диагностике, лечению и реабилитации больных ИКБ, КЭ и других клещевых инфекций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Амосов А.Д. // Клещевой энцефалит. Кольцово 2002. – 112с.
2. Бочкова Н.Г., Левина Н.С.// Новое в диагностике клещевого энцефалита. Научн.конф. «Вирусные, риккетсиозные и бактериальные инфекции, переносимые клещами». – Иркутск 1996.- с55-56.
3. Гальцева Г.В., Юничева Ю.В., Костюковский В.М. и др. // Перспективы диагностики клещевого боррелиоза. Актуал.аспекты природно-очаговых инфекций.- Омск, 2001.- с.119-120.
4. Гальцева Г.В.,Юничева Ю.В., Малай В.И. и др. // Некоторые аспекты клещевого боррелиоза в Краснодарском крае. «Клещевые боррелиозы». – Ижевск, 2002.- с.100-102.
5. Гальцева Г.В., Юничева Ю.В.,Стержантова Л.В. и др. // Иксодовые клещевые боррелиозы – болезнь Лайма: Матер.конф. ПЧУ России и их роль в обеспечении эпидемиологического благополучия населения страны. – Москва, 2004. – с.153-156.
6. Злобин В.И., Цветкова Э.А., Наволодкин О.А. и др. // Сравнение трех экспресс-методов индикации вируса клещевого энцефалита. Вопросы вирусологии, 1990. 1. с .57-59.
7. Коренберг Э.И.// Клещевой энцефалит. Природная очаговость болезней. Исследование института Гамалеи РАМН, Москва, 2003.- с.35-63.
8. Попонникова Т.В., Субботин А.В.// Исходы менингоэнцефалита при сочетанной инфекции ИКБ и КЭ у детей. «Клещевые боррелиозы». – Ижевск, 2002.- с.234-237.
9. Пищенко Н.Д., Кветкова Е.А., Шаманин Е.А. и др.// Применение метода молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот для диагностики клещевого энцефалита. «Клещевой энцефалит». Тр.института им.Пастера. Том 65. Ленинград 1989. – с.169-175.
10. Осинцева Т.С.// Неврологические аспекты микст-инфекции ИКБ и КЭ в резидуальном периоде.: мат.н/п.конф. «Клещевые боррелиозы». – Ижевск, 2002. – с.222-224.
11. Щадрин С.Г., Забродин Н.А., Ромаданова Т.В. и др.// Эпидемиологическая ситуация и клиниче-

ская характеристика клещевого боррелиоза в Удмуртии. Там же с.301-307.

РАДИАЛЬНАЯ И ПРОДОЛЬНАЯ МОРФОМЕТРИЯ ТКАНИ ПЕЧЕНИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ЭНДОТОКСИКОЗЕ

Горячев А.Н., Новочадов В.В.

*Отдел общей и экспериментальной патологии
Поволжского научного центра РАН.*

Исследование ткани печени при хроническом эндотоксикозе имеет большое значение, поскольку именно печень является тем барьером, через который идет поток информационных молекул от органов спланхического кровотока. Этот факт ставит печень в ряд органов, повреждение которых при эндотоксикозе носит как первичный характер ввиду непосредственного повреждения эндотоксинами, так и вторичный, благодаря разрушительному действию цитокинов, выделяющихся в ответ на липополисахаридную агрессию.

Однако было бы ошибкой думать, что морфологические изменения в печени можно исчерпывающе описать в категориях соотношений объемных и плоскостных структур, как это предусматривает методика классической морфометрии. Ткань печени изначально неоднородна по своей структуре и представляет собой совокупность ограниченных надклеточных компартов – долек, являющихся функционально целостными элементами. В этих элементах, как и в любых других биологических структурах, существуют строгие взаимосвязи между каждым из составляющих ее объектов – гепатоцитами, триадами, центральными венами. Именно эти взаимосвязи лежат в основе элементов уравнения, описывающего сбалансированную работу печеночной паренхимы. Сдвиг каких-либо параметров этого уравнения в ту или иную сторону приводит к дестабилизации работы системы печени, что в итоге отражается в патоморфозе печени при хроническом эндотоксикозе. Описание количественными показателями этих сдвигов, имеющих, кстати, различную направленность в пространстве и выявление закономерностей в их развитии, явилось целью данного цикла работ.

Целью данной работы стало изучение закономерностей изменения тинкториальных свойств печеночной дольки при хроническом эндотоксикозе в радиальном направлении, в кольцевых зонах по периметру дольки и по направлению от центральной вены до портальной триады. Для этого исследование проводили на беспородных взрослых крысах-самках массой 200 - 250 г. Хронический эндотоксикоз в течение 30-ти суток у крыс опытной группы моделировали с помощью сочетанного применения липополисахарида *S. typhimurium* и тетрахлорметана [Новочадов В.В., 2001]. В качестве контроля использовались интактные крысы. Для радиальной и кольцевой морфометрии и использовались оригинальные программные пакеты, разработанные в лаборатории патофизиологии ПНЦ РАН [Новочадов В.В., 2005]. Измерение проводилось на участке центральная вена – портальная триада с построением графика зависимости яркости от рас-