

USE OF A Y-SHAPED SILICONE TUBE FOR CICATRICIAL STENOSIS OF THE LOWER THIRD OF THE TRACHEA (SUPRA-BIFURCATION REGION OF THE TRACHEA)

V.M. Madiarov, N.S. Zharylkapov, N.A. Zhunisov, M.A. Nysanbai,
T.D. Rakova, B.A. Stykulov
NEI «Kazakh-Russian Medical University», Kazakhstan, Almaty

Summary

An original method for the treatment of cicatricial stenosis of the lower third of the trachea using a Y-shaped silicone tube has been developed. The method was tested on 11 patients. The effectiveness of the method was assessed by clinical, X-ray, endoscopic methods. The analysis of the results was carried out in order to study the immediate and long-term results and evaluate the effectiveness of using a Y-shaped silicone tube in cicatricial stenosis of the lower third of the trachea. The degree and extent of tracheal stenosis was assessed by tracheolaryngoscopy and spiral computed tomography. The length of cicatricial changes ranged from 1.5 to 3 cm. In all cases, endoscopic electro excision of cicatricial tracheal stenosis was used, followed by installation of a Y-shaped silicone tube.

It is shown that the method reliably prevents the growth of scar tissue in the lumen of the trachea.

Key words: trachea, tracheal cicatricial stenosis, stent, plastic.

УДК: 611.08
МРНТИ: 76.03.43.

DOI: 10.24412/2790-1289-2021-19497

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ИММУНИЗАЦИИ КРОЛИКОВ

Г.А. Толеген, А. Хасанов

НУО «Казakhstanско-Российский Медицинский Университет», Казахстан, г. Алматы

Аннотация

Авторы представленной статьи задались целью исследовать влияние иммунизации кроликов разными видами дрожжей на общую антимикробную активность сыворотки и специфическую активность фракции ее АМП. Опытная группа кроликов состояла из 7 здоровых самок породы шиншилла массой 1,5 кг, полученных из питомника «ЛАР-Сик» Казахстан, филиал «Андреевка». Контрольную группу составляли 4 таких же кролика. Эксперименты проводили в соответствии с межгосударственным стандартом по содержанию и уходу за лабораторными животными (ГОСТ 33217-2014). Кроликов иммунизировали клетками дрожжей – *Candida albicans*, *Rhodotorula mu cilaginosa*, *Malassezia furfur*, *Cryptococcus neoformans*, *Geotrichum candi dum*, *Trichosporon cuta neum*, *Saccharomyces cerevisiae*. Фракции АМП получали фильтрацией сывороток через фильтры с диаметром пор 100 кД. Общую активность сывороток и их АМП-фракций оценивали спектрофотометрическим методом.

Установлено, что сывороточный альбумин в физиологических концентрациях (порядка 50 мг/мл и выше) обладает непосредственным антимикробным действием на клетки дрожжевых грибов и бактерий, проявляя при этом дозозависимый эффект [10]. Определение концентрации альбумина в настоящем исследовании показало отсутствие существенных различий в этих показателях у иммунизированных и не иммунизированных животных. Однако для некоторых видов дрожжей наблюдалась корреляция между концентрацией альбумина и общей активностью сыворотки.

Ключевые слова: сыворотки крови, антимикробная активность, антимикробные пептиды (АМП), иммунизации кроликов.

Актуальность. Прямым противомикробным действием сыворотки крови млекопитающих обладают белки системы комплемента, иммуноглобулины и антимикробные пептиды (АМП). При различных механизмах это действие выражается в повреждении клеточной мембраны патогенных микроорганизмов [1]. На основании данного свойства разработан способ оценки общей противомикробной активности сыворотки крови и ее низкомолекулярной фракции (2,8-80 кД) в которую входят АМП [2]. Данный способ заключается в действии образцов сыворотки на клетки тест-культур микроорганизмов и спектрофотометрическом измерении процента красителя, вошедшего в убитые клетки, по сравнению с контролем. С помощью этого метода определены указанные свойства сывороток 4 видов млекопитающих, включая человека, и обнаруже-

ны различия в величинах противогрибковой активности (ПГА) АМП-фракций сывороток, но не в величинах общей активности [3]. Этим же методом показано, что иммунизация мышей дрожжевыми антигенами приводила не только к увеличению уровней специфических иммуноглобулинов класса G, но и к повышению активности фракции АМП по отношению к *Candida albicans* [4]

Материал и методы. Кроликов иммунизировали клетками дрожжей – *Candida albicans*, *Rhodotorula mu cilaginosa*, *Malassezia furfur*, *Cryptococcus neoformans*, *Geotrichum candi dum*, *Trichosporon cuta neum*, *Saccharomyces cerevisiae*. Фракции АМП получали фильтрацией сывороток через фильтры с диаметром пор 100 кД. Общую активность сывороток и их АМП-фракций оценивали спектрофотометрическим методом.

Цель работы: исследовать влияние иммунизации кроликов разными видами дрожжей на общую антимикробную активность сыворотки и специфическую активность фракции ее АМП. Опытная группа кроликов состояла из 7 здоровых самок породы шиншилла массой 1,5 кг, полученных из питомника «ЛАРСик» Казахстан, филиал «Андреевка». Контрольную группу составляли таких же 4 кролика. Эксперименты проводили в соответствии с межгосударственным стандартом по содержанию и уходу за лабораторными животными (ГОСТ 33217-2014).

Материалы и методы: Штаммы дрожжей *Candida albicans* № 927, *Rhodotorula mucilaginosa* № 132, *Malassezia furfur* № 1451, *Cryptococcus neoformans* № 3465, *Geotrichum candidum* № 1206, *Trichosporon cutaneum* № 18 получены из коллекции ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова; а *Saccharomyces cerevisiae* Y-375 – из Всероссийской коллекции микроорганизмов. Суспензии клеток для иммунизации и прочих опытов готовили из экспоненциальных культур, выращенных на плотной среде Сабуро при 25°C (в случае *M. furfur* – на модифицированной среде Диксона при 32°C).

Иммунизацию кроликов проводили по следующей схеме: каждого кролика из опытной группы иммунизировали суспензией убитых мертиолятом клеток одной из культур дрожжей плотностью 1010 КОЕ/мл в объеме 1 мл, внутримышечно (в бедро), 8-кратно в течение 2 мес. Сыворотки получали от всех кроликов одновременно, включая контрольную группу, лиофильно высушивали, определяли плотность путем взвешивания сухих остатков и соотношения с объемами исходных сывороток, после чего хранили при 5°C. Для проведения каждого эксперимента с одним видом дрожжей взвешивали часть сыворотки, разводя ее до исходной плотности дистиллированной стерильной водой.

Фракции, содержащие АМП, получали путем фильтрации сывороток через молекулярные фильтры «Amicon Ultra» («Millipore», «Merck») с диаметром пор 100 кД на центрифуге в течение 15 мин при 16 000 об/мин. ПГА определяли по схеме: аликвоты сывороток или их АМП-фракций объемом 150 мкл (контрольная пробирка содержала физиологический раствор) соединяли с 50 мкл суспензии дрожжей в пробирках типа Эппендорф, инкубировали 2 ч при 32°C на шейкере, затем центрифугировали 5 мин при 16 000 об/мин, супернатанты удаляли, а к осадкам добавляли по 300 мкл раствора бромкрезолового пурпурного в фосфатном буфере pH 4,6. Смесь суспендировали, инкубировали 45 мин при 32°C на шейкере, затем суспензии вновь центрифугировали и по 50 мкл полученных супернатантов добавляли в заранее подготовленные пробирки, содержащие по 2,5 мл фосфатного буфера pH 4,6. Оптическую плотность растворов измеряли на спектрофотометре «Genesys 10S UV-Vis» при длине волны 440 нм в кюветах толщиной 1 см. Активность рассчитывали в процентах по отношению к контрольному образцу [5].

Метод определения концентрации сывороточного альбумина основан на образовании окрашенных комплексов соединений при взаимодействии альбумина с бромкрезоловым зеленым в слабокислой среде в при-

сутствии детергента. К 0,1 мл сыворотки, разведенной в 10 раз, добавляли 4 м реактива, содержащего бромкрезоловый зеленый и детергент Trigon X-100 в ацетатном буфере («Альбумин Агат», «Агат», Россия); инкубацию проводили в течение 10 мин при комнатной температуре, после чего оптическую плотность измеряли на спектрофотометре при длине волны 625 нм в кювете толщиной 1 см. Калибровочные растворы делали на основе человеческого сывороточного альбумина («Reanal», Чехия). Прямая зависимость оптической плотности от концентрации альбумина имела место в диапазоне концентраций 0,3-20 мг/мл.

Статистический анализ проводили с помощью программы Microsoft Excel. Коэффициенты Манна Уитни, свидетельствующие о наличии/отсутствии значимости различий между показателями, рассчитывали с помощью автоматической программы Microsoft Excel. В качестве показателя корреляционных взаимосвязей использовали коэффициент Пирсона (г).

Сравнение данных величин показывает наличие прямой корреляции высокой степени между общей активностью сыворотки иммунизированных кроликов (горизонтальные ряды) и общей активностью, не иммунизированных животных (верхний ряд) против разных видов дрожжей. Кроме того, если сравнивать те же величины (верхний ряд) с активностями сывороток иммунизированных кроликов против тех же культур, которыми они были иммунизированы (числа, выделенные жирным шрифтом), то обнаруживается также высокая положительная корреляция ($r = 0,819$). Несмотря на то, что достоверность различий в величинах общей активности между выборками не иммунизированных и иммунизированных кроликов не в каждом случае высока, векторы изменения общей ПГА для всех изучаемых микроорганизмов одинаковы – тенденция к снижению активности в результате иммунизации.

В отличие от величин общей активности, эти величины менялись значительно, о чем свидетельствуют значения коэффициентов Манна-Уитни. Однако прямая корреляция высокой силы между АМП-активностью сыворотки иммунизированных кроликов (горизонтальные ряды) и общей активностью не иммунизированных животных (верхний ряд) также имела место. Сравнение тех же величин (верхний ряд) с АМП-активностями сывороток иммунизированных кроликов против тех же культур, которыми они были иммунизированы (числа, выделенные жирным шрифтом), показало также наличие высокой положительной корреляции ($r = 0,687$). В отличие от общей активности векторы изменения АМП-активностей зависели от вида дрожжей: в случае иммунизации *S. cerevisiae*, *G. candidum*, *Cr. neoformans* и *C. albicans* имело место повышение данного показателя, тогда как после иммунизации *R. mucilaginosa*, *M. furfur* и *T. cutaneum* – снижение.

Интересно отметить, что значения общей активности сыворотки иммунизированных кроликов против данной культуры не коррелировали с таковыми для АМП-активности ($r = -0,006$).

Концентрацию альбумина определяли во всех сыворотках: медиана для не иммунизированных кроликов

равна 86,9 мг/мл, а для иммунизированных – 83,1 мг/мл. Различия между выборками недостоверны: $p > 0,05$. Сравнение величин концентрации альбумина и общей активности сывороток против разных видов дрожжей по всей выборке иммунизированных и не иммунизированных кроликов дало следующие коэффициенты корреляции: для *C. albicans* - 0,760; для *R. mucilaginosa* - 0,728; для *M. furfur* - 0,723; для *Cr. neoformans* - 0,316; для *G. candidum* - 0,432; для *T. cutaneum* - 0,588 и для *S. cerevisiae* - 0,056.

Обсуждение. Дрожжевые грибы родов *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* и *Trichosporon* имеют большое значение в клинической практике, а такие роды, как *Geotrichum* и *Saccharomyces*, часто встречаются в продуктах питания [7].

Дрожжи рода *Malassezia* являются нормальными обитателями кожи теплокровных животных, но при иммунодефиците вовлекаются в патологические процессы [8]. Хорошо известно, что на введение чужеродного антигена организм отвечает повышением уровней специфических иммуноглобулинов. Публикаций о влиянии иммунизации на АМП чрезвычайно мало. Есть данные об индукции эпителиального бета-дефензина – 3 в результате иммунизации мышей живыми клетками *Pseudomonas aeruginosa* [9].

Общая активность сывороток под действием иммунизации имела тенденцию к снижению независимо от вида дрожжей. Активность АМП-фракций под действием *C. albicans*, *Cr. neoformans*, *G. candidum* и *S. cerevisiae* возрастала, а под действием прочих – снижалась. Наиболее высокая чувствительность к АМП-фракции сывороток соответствовала *C. albicans*, особенно в отношении сыворотки кролика, иммунизированного этими же дрожжами – в 1,5 раза выше контроля. Концентрация альбумина в сыворотках имела положительную корреляцию с общей активностью против *C. albicans* ($r = 0,760$), *R. mucilaginosa* ($r = 0,728$), *M. furfur* ($r = 0,723$) и *T. cutaneum* ($r = 0,588$).

Результаты экспериментов не только согласуются с полученными ранее данными, но и расширяют представления о воздействии дрожжевых антигенов на активность сывороточных АМП против разных видов дрожжей.

Альбумин сыворотки и сывороточные АМП обладают специфичностью в отношении разных микроорганизмов, причем наибольшую активность они проявляют в отношении тех видов, которые чаще выступают в роли условных патогенов. Подавление экспрессии эпителиального кишечного альфа-дефензина [10]. При иммунизации мышей антигенами разных видов дрожжей наблюдали увеличение специфических иммуноглобулинов наряду с повышением активности АМП-фракции сывороток животных по отношению к одному виду дрожжей, а именно *C. albicans* [4].

Выводы. В настоящей работе оценивали не только активность АМП-фракций сыворотки против *C. albicans* в результате иммунизации животных, но и ту же активность против других значимых видов дрожжей, а также общую ПГА сывороток. Оказалось, что общая ПГА сывороток под действием иммунизации менялась не-

значительно, однако имела тенденцию к снижению независимо от вида дрожжей. В то же время активность АМП-фракций сывороток варьировала гораздо сильнее, при этом имело место зависимость от вида дрожжевых грибов: под действием *C. albicans*, *Cr. neoformans*, *G. candidum* и *S. cerevisiae* она значительно возрастала, а под действием прочих – снижалась. Обращает на себя внимание тот факт, что общая активность сывороток (и активность их АМП-фракций) у «чистых» и иммунизированных кроликов коррелировала между собой, что свидетельствует о некоторой специфичности по отношению к разным видам испытуемых дрожжей. Наиболее высокая чувствительность к АМП-фракции сывороток характерна для *C. albicans*, особенно в отношении сыворотки кролика, иммунизированного этими же дрожжами. Очевидно, что наибольшую активность АМП-фракции организм проявляет в отношении грибов, наиболее часто выступающих в качестве возбудителя микозов.

Именно их антигены, попадая в организм животного, вызывают повышение иммунного ответа не только в виде специфических иммуноглобулинов, но и в виде комплекса АМП. Напротив, наименьшую активность организм проявляет по отношению к представителям нормобиоты и видам, поступающим с пищевыми продуктами.

Установлено, что сывороточный альбумин в физиологических концентрациях (порядка 50 мг/мл и выше) обладает непосредственным антимикробным действием на клетки дрожжевых грибов и бактерий, проявляя при этом дозозависимый эффект [10]. Определение концентрации альбумина в настоящем исследовании показало отсутствие существенных различий в этих показателях у иммунизированных и неиммунизированных животных. Однако для некоторых видов дрожжей наблюдалась корреляция между концентрацией альбумина и общей активностью сыворотки.

Величина коэффициента корреляции Пирсона убывала в ряду: *C. Albicans* - *R. mucilaginosa* - *M. furfur* - *T. cutaneum* - *G. candidum* - *Cr. neoformans* - *S. cerevisiae*. Наиболее высокой взаимосвязь между общей ПГА сыворотки и концентрацией альбумина была в случае дрожжей *C. albicans*.

Заключение. Альбумин сыворотки, как и АМП, обладает специфичностью в отношении разных дрожжевых грибов, причем наибольшую активность они проявляют в отношении тех видов, которые чаще выступают в роли условных патогенов.

Список литературы:

1. Zasloff M. Antimicrobial peptides in health and disease. N. Engl. J. Med. 2002; 347(15): 1199-200.
2. Арзуманян В.Г., Михайлова Н.А., Артемьева Т.А., Бутовченко Л.М., Вартанова Н.О., Ерофеева Т.В. и др. Способ определения противомикробной активности цельной сыворотки и фракции ее антимикробных пептидов. Патент РФ № 2686337С1; 2018.
3. Арзуманян В.Г., Артемьева Т.А., Иксанова А.М. Противогрибковая активность сыворотки крови человека и некоторых млекопитающих. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2019; (1): 17-22.

4. Arzumanyan V., Shmeleva O., Michailova N. Elevated activity levels of serum antimicrobial peptides in mice as response to immunization with yeast antigens. *Med. Mycol. Open Access*. 2017; 3 (1): 23.

5. Арзуманян В.Г., Ожован И.М. Модифицированный метод оценки целостности цитоплазматической мембраны клеток эукариот. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2002; 134 (7): 118-20.

6. Арзуманян В.Г., Шмелева О.А. Клинически значимые дрожжевые грибы - классификация, антигены и современные методы диагностики. В кн.: Дьяков Ю.Т., Сергеев А.Ю., ред. *Микология сегодня. Том III*. М.: Национальная академия микологии; 2016: 116-39.

7. Арзуманян В.Г. Дрожжи рода *Malassezia*: таксономия, идентификация, значение в экологии и патологии

человека. В кн.: Дьяков Ю.Т., Сергеев Ю.В., ред. *Новое в систематике и номенклатуре грибов*. М.: Медицина для всех; 2003: 458-92.

8. Bals R., Wang X., Meegalla R.L., Wattler S., Weiner D.J., Nehls M.C., et al. Mouse beta-defensin 3 is an inducible antimicrobial peptide expressed in the epithelia of multiple organs. *Infect. Immun*. 1999; 67 (7): 3542-7.

9. Simuyandi M., Kapulu M., Kelly P. Anti-microbial peptide gene expression during oral vaccination: analysis of a randomized controlled trial. *Clin. Exp. Immunol*. 2016; 186 (2): 205-13.

10. Арзуманян В.Г., Ожован И.М., Свитич О.А. Анти-микробное действие альбумина на клетки бактерий и дрожжей. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2019; 167(6): 722-723.

ҚОЯНДАРДЫ ИММУНДАУДЫҢ ӘСЕРІН ЗЕРТТЕУ

Г.А. Төлеген, А. Хасанов

«Қазақстан - Ресей медициналық университеті» МЕМБМ, Қазақстан, Алматы қ.

Түйінді

Ұсынылған мақаланың авторлары әр түрлі ашытқы түрлерімен қояндарды иммунизациялаудың Сарысудың жалпы микробқа қарсы белсенділігіне және оның АМП фракциясының ерекше белсенділігіне әсерін зерттеуді мақсат етті. Қояндардың тәжірибелік тобы "Андреевка" филиалы "ЛАРСик" Қазақстан питомнигінен алынған, салмағы 1,5 кг Шиншиллалар тұқымының 7 сау ұрғашысынан тұрды. Бақылау тобы бірдей 4 қоян болды. Тәжірибелер зертханалық жануарларды күту және күту бойынша Мемлекетаралық стандартқа сәйкес жүргізілді (ГОСТ 33217-2014). Қояндарды ашытқы жасушалары - *Candida albicans*, *Rhodotorula mu cilaginos*, *Malassezia furfur*, *Cryptococcus neoformans*, *Geotrichum candi dum*, *Trichosporon cuta neum*, *Saccharomyces cerevisiae* иммунизациялады. АМП фракциялары диаметрі 100 кД сүзгілер арқылы сарысуды сүзу арқылы алынды. Сарысулар мен олардың АМП фракцияларының жалпы белсенділігі спектрофотометриялық әдіспен бағаланды.

Сарысулық альбуминнің физиологиялық концентрацияларда (шамамен 50 мг/мл және одан жоғары) ашытқы саңырауқұлақтары мен бактериялардың жасушаларына тікелей микробқа қарсы әсері бар екені анықталды, бұл ретте дозаға тәуелді әсерін көрсетеді [10]. Осы зерттеуде альбумин концентрациясын анықтау иммунизацияланған және иммунизацияланбаған жануарларда осы көрсеткіштерде айтарлықтай айырмашылықтар жоқ екенін көрсетті. Алайда, ашытқының кейбір түрлері үшін альбумин концентрациясы мен сарысудың жалпы белсенділігі арасындағы байланыс байқалды.

Кілт сөздер: қан сарысуы, микробқа қарсы белсенділік, микробқа қарсы пептидтер (АМП), қояндарды иммундау.

STUDY OF THE EFFECT OF RABBIT IMMUNIZATION

G.A. Tolegen, A. Khasanov

NEI «Kazakh-Russian Medical University», Kazakhstan, Almaty

Summary

The authors of the presented article set out to study the effect of immunization of rabbits with different types of yeast on the general antimicrobial activity of serum and the specific activity of its AMP fraction. The experimental group of rabbits consisted of 7 healthy chinchilla females weighing 1.5 kg, obtained from the nursery "LARSik" Kazakhstan, branch "Andreevka". The control group consisted of 4 of the same rabbits. The experiments were carried out in accordance with the interstate standard for the maintenance and care of laboratory animals (GOST 33217-2014). Rabbits were immunized with yeast cells - *Candida albicans*, *Rhodotorula mu cilaginos*, *Malassezia furfur*, *Cryptococcus neoformans*, *Geotrichum candidum*, *Trichosporon cuta neum*, *Saccharomyces cerevisiae*. AMP fractions were obtained by filtration of sera through filters with a pore diameter of 100 kDa. The total activity of the sera and their AMP fractions was assessed by the spectrophotometric method.

It was found that serum albumin at physiological concentrations (about 50 mg / ml and higher) has a direct antimicrobial effect on yeast and bacterial cells, while exhibiting a dose-dependent effect [10]. Determination of the albumin concentration in the present study showed no significant differences in these parameters in immunized and non-immunized animals. However, for some yeast species, a correlation was observed between the albumin concentration and the total serum activity.

Key words: blood serum, antimicrobial activity, antimicrobial peptides (AMP), rabbit immunizations.