

относительно консорциума *C. albicans* и *S. aureus*. В результате проведенного исследования было установлено, что способность к формированию биопленок изолятов *C. albicans* и *S. aureus* разная и наибольшие показатели оптической плотности оказались у биопленок образованных ассоциацией этих микроорганизмов. Комбинация лекарственных веществ тербинафин, эритромицин и эфирное масло полыни имели высокую эффективность в отношении консорциума *C. albicans* и *S. aureus*, МПК для планктонных клеток составила 2,6 мкг / мл, для биопленок 6,2 мкг / мл.

**Ключевые слова:** консорциум *C. albicans* и *S. aureus*, комбинированное действие, противомикробные препараты.

#### Summary

**Minukhin V.V., Kochneva E.V., Gramatyuk S.N., Krychko S.S.** Combined action of antimicrobial substances on consortium *C. albicans* and *S. aureus*.

Consortium *S. aureus* and *C. albicans* ranks third among causes of polymicrobial disease, and in 27% of cases, these pathogens cause nosocomial infection in the pathogenesis of infectious diseases, about 80% of all microbial infections in humans occur with the formation of biofilms. In the bacteria in biofilms 50-500 times more resistant to disinfectant, antibiotics, bacteriophages, and antibody phagocytes. The issues of identifying new combinations of antimicrobial products effective against consortium *C. albicans* and *S. aureus*. As a result of this study found that the ability to form biofilms and *S. aureus* isolates *C. albicans* different and the highest rates of optical density appeared in biofilms formed by the association of these microorganisms. Combination drugs terbinafine, erythromycin and essential oil of wormwood had relatively high efficiency consortium *C. albicans* and *S. aureus*, the minimum inhibitory concentration for planktonic cells was 2.6 micrograms / ml for biofilms 6.2 mg / ml.

**Key words:** consortium *C. albicans* and *S. aureus*, combined action, antimicrobial drugs.

*Рецензент: д.мед.н. С.І. Похил*

УДК 617.713-092.4.068

## МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ПОДТВЕРЖДЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ЛИМБАЛЬНОЙ КЛЕТОЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

**Е.Н. Свидко, Ю.А. Демин**

*Институт проблем криобиологии и криомедицины  
НАН Украины (Харьков)*

*Харьковская медицинская академия последипломного образования*

### Введение

В настоящее время доказана роль лимбальной зоны глаза в регенерации и самообновлении роговицы в течение всей жизни. Установлено, что в базальном слое лимбального эпителия располагаются клетки, которые обладают всеми свойствами стволовых. Проведенные исследования подтвердили локализацию стволовых клеток в лимбальной зоне и позволили охарактеризовать их как клетки с высокой пролиферативной способностью и большей продолжительностью существования по сравнению с центральными клетками роговицы [6, 8, 9]. Существующие заболевания органа зрения человека, особенно хронические, характеризуются вовлечением клеток зоны лимба в патогенез [3, 7, 10]. Наблюдается как снижение количества стволовых лимбальных клеток, способных к делению, так и ухудшение состояния микроокружения клеток лимба из-за недостатка специфических ростовых регуляторов, таких как факторы роста эпителия, трансформирующий ростовой фактор, различные нейротрофические ростовые факторы [5, 11].

Для исследования альтернативных адекватных методов лечения лимбальной недостаточности необходима экспериментальная модель. Наиболее оправданной моделью лимбальной недостаточности является модель с использованием аппликации 0,04% митомицина С на область лимба [2]. Однако, известно, что митомицин С обладает цитостатическим действием [12], поэтому необходимо знать время выведения данного препарата из роговицы животного, адаптировать данную модель, чтобы полученные результаты были наиболее достоверные, и митомицин С не смог оказать цитостатического действия на вводимые препараты.

**Целью** нашего исследования было определить время выведения митомицина С из роговицы животного, а также изучить изменения в роговице животных, вызванные созданной экспериментальной моделью.

#### Материалы и методы исследования

Экспериментальное исследование проводилось на 13 кроликах породы «Шиншилла», весом 4-5 кг. При работе с животными были учтены все «Общие этические принципы экспериментов на животных» [4]. Для исследования время выведения митомицина С из роговицы были отобраны 3 кролика (6 глаз) с одинаковым диаметром роговицы, который составил 10 мм. Каждому животному была выполнена пахиметрия на ультразвуковом пахиметре Osuscan фирмы Alcon. Перед аппликацией митомицина С на роговицу провели аппликацию диска фильтровальной бумаги диаметром 10 мм, который был пропитан 10% раствором этилового спирта на 20 сек. Затем с помощью микротупфера удалялись некротизированные клетки роговичного эпителия. Контроль удаления проводился стандартно, путем окрашивания 1% раствором флуоресцеина.

Для приготовления исходного испытуемого раствора использовали флакон препарата, содержащий 2 мг митомицина С. Содержимое флакона растворяли в 5 мл воды очищенной (концентрация митомицина С – 0,04%). Затем из фильтровальной бумаги вырезали кружки диаметром 10 мм. На этот кружок с помощью мерной автоматической пипетки наносили 7 мкл ранее приготовленного раствора митомицина С. Экспонирование на роговице глаза кружка фильтровальной бумаги проводили с различными интервалами времени: 30 секунд, 1 минута, 2 минуты, 3 минуты, 4 минуты, 5 минут. После экспонирования кружок помещали в виалку объемом 20 мл и герметично закрывали резиновой пробкой. В каждую 20 мл виалку, одной и той же пипеткой 1 класса, прибавили 2 мл метилового спирта. Затем виалки помещали на 5 минут на УЗ баню. Количественное определение митомицина С в образцах проводили используя жидкостную хроматографию с диоднолучной детекцией. В качестве разделяющей колонки использовали колонку с октадецилсилильной привитой фазой, имеющей 3-х кратное эндкипирование. В качестве аналитической длины волны использовали максимум поглощения митомицина С при 360 нм, что обеспечило достаточно высокую селективность сигнала в сочетании с низким порогом обнаружения вещества в пробах. Элюирование

пробы проводили, используя градиентный режим для двух фаз – ацетонитрила и фосфатного буферного раствора, имеющего рН равный 3,0 с концентрацией ионпарной добавки – гептансульфоната натрия – 0,01М.

Для изучения морфологических особенностей протекания лимбальной недостаточности роговицы было отобрано 10 кроликов, которым была создана лимбальная недостаточность по разработанной методике.

Животных выводили из эксперимента под наркозом методом воздушной эмболии на 3 и 7 сутки. Фиксацию роговицы проводили в 10 % водном растворе нейтрального формалина, потом обезжиривали в спиртах возрастающей концентрации, заливали в парафин [1]. Из готовых парафиновых блоков делали срезы толщиной 3-4 мкм, которые окрашивали гематоксилин-эозином. Микроскопические исследования проводили с помощью микроскопа BIOREX 3 “KONUS”. Микрофотографирование – с помощью микроскопа фирмы BIOREX 3 “KONUS” с адаптированными для данного исследования программами.

#### Полученные результаты и их обсуждение

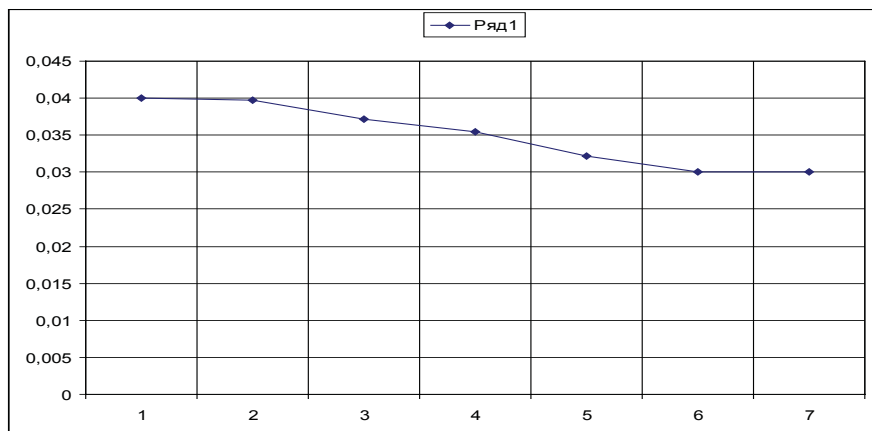
При проведении исследований нами получены такие результаты количественного определения митомицина С в пробах (таблица 1).

Таблица 1

Результаты количественного определения митомицина С в пробах

| N | Концентрация, % | Площадь пика | Время экспонирования, мин |
|---|-----------------|--------------|---------------------------|
| 1 | 0,03971519      | 703648       | 0,5                       |
| 2 | 0,03715364      | 658264       | 1                         |
| 3 | 0,03551022      | 629147       | 2                         |
| 4 | 0,03221181      | 570708       | 3                         |
| 5 | 0,03001634      | 531810       | 4                         |
| 6 | 0,03001182      | 531730       | 5                         |
| 7 | 0,04            | 708694       | 0                         |

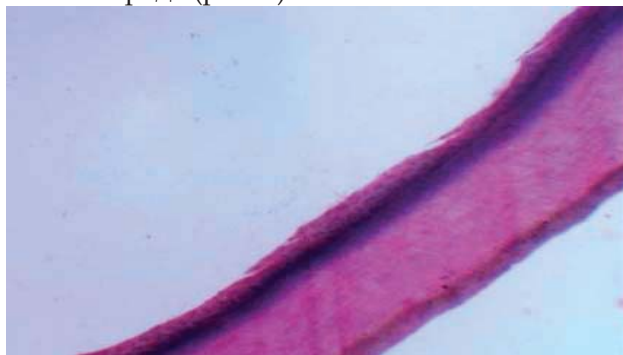
Скорость диффузии (v) составила 1,99764E-05 грамм в минуту 19,97635 мкг в минуту.



Объем можно было вычислить по стандартной формуле:  $V=2\pi R$   
 А затем и время выведения митомицина С из роговицы  $t=V/v$   
 $t= 2\pi R/v=2*3.14* 0,021/1,99764E-05=26,2$ ч.

Таким образом время выведения митомицина С составило 26,2 часа. Из этого следует, что при окончании данного периода времени возможно применение криоконсервированных клеток пуповинной крови и трансплантация их будет оправданной.

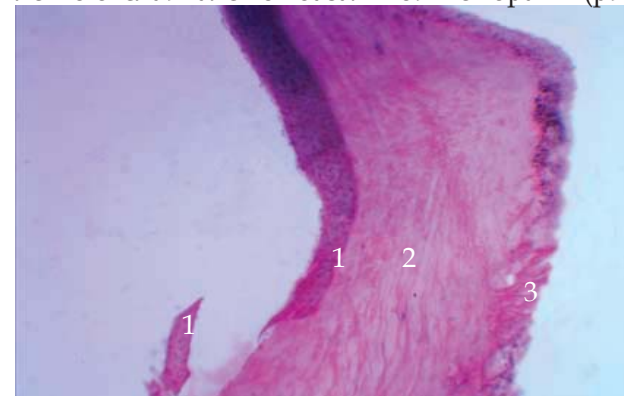
При проведении гистологического исследования на 3-и сутки в препаратах роговицы животных с лимбальной недостаточностью наблюдался почти полный (около 80%) дефект переднего эпителия. Эпителий тонкий, его поверхность неровная, эпителиоциты расположены в 1-2 ряда (рис. 1).



**Рис. 1.** Роговица животных на 3-и сутки экспериментальной лимбальной недостаточности. Тонкий слой переднего эпителия. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.: ок. 10, об. 10.

По периферии роговицы, ближе к лимбу, в переднем эпителии наблюдалось большее количество слоев клеток, чем в центральной части. У эпителиоцитов были гиперхромные ядра неправильной формы и отечная, оптически светлая цитоплазма. Клетки различных слоев морфологически не отличались, поэтому невозможно было выделить слои переднего эпителия.

При подготовке гистологических препаратов эпителиальный слой легко отслаивался от базальной мембраны (рис. 2).



**Рис. 2.** Роговица животных на 3-и сутки экспериментальной лимбальной недостаточности. Передний эпителий частично отслоился от базальной мембраны. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.: ок. 10, об. 10.

Встроме роговицы наблюдался значительный отек, который привел к расслоению коллагеновых волокон и появления между ними щелей. Кератоциты были вытянутой формы, с гиперхромными ядрами. Наблюдалась миграция сегментоядерных лейкоцитов, более выражена на периферии, что свидетельствовало об интенсивности течения воспалительного процесса.

Задняя пограничная пластинка была представлена слоем плотно расположенных коллагеновых волокон.

В заднем эпителии был хорошо виден один слой клеток, неправильной полигональной формы. Они имели ядра овальной формы, светлую цитоплазму. На гистологических препаратах наблюдалось значительное увеличение размеров клеток за счет отека цитоплазмы. Контур эндотелия был неровный, волнистый.

На 7-е сутки исследования в роговице животных наблюдалась эпителизация. При детальном изучении было замечено нарушение дифференцировки роговичного эпителия. Толщина пе-

реднего эпителия была неравномерной: по периферии больше, чем в центре. Эпителий многослойный, но было заметно нарушение упорядоченного расположения клеток, которое характерно для переднего эпителия роговицы, появление бокаловидных клеток, встречающихся в эпителии конъюнктивы. По периферии конъюнктивальный эпителий нарастал на поверхность роговицы в виде вала. Наблюдалась неровность поверхности роговицы.

Уменьшился отек стромы роговицы, коллагеновые волокна, объединенные в пучки, были ориентированы параллельно друг другу. Между ними наблюдались кератоциты с базофильными ядрами, длинная ось которых была расположена параллельно поверхности роговицы. Значительно уменьшилось количество сегментоядерных лейкоцитов в поверхностных слоях собственного вещества роговицы, что свидетельствовало о затухании воспалительного процесса. Наблюдались единичные сосуды в строме роговицы. Эндотелиоциты имели уплощенные базофильные ядра и слегка отекающую эозинофильную цитоплазму. Периваскулярно были заметны единичные лимфоциты. Задняя пограничная пластинка была не изменена. В клетках заднего эпителия были овальной формы базофильные ядра и светлая оксифильная цитоплазма. Наблюдалось значительное уменьшение отека цитоплазмы.

### Выводы

1. В ходе проведенным исследований установлено, что самой оправданной, простой и надежной экспериментальной моделью лимбальной недостаточности является модель с использованием аппликации 0,04% митомицина С на область лимба.

2. Экспериментально доказано, что время выведения митомицина С из роговицы кроликов составляет 26,2 часа, что обосновывает использование данной модели для исследования применения криоконсервированных клеток кордовой крови.

3. Проведенные гистологические исследования показали на 7-е сутки нарушение упорядоченного расположения клеток переднего эпителия роговицы, появление бокаловидных клеток, характерных для конъюнктивы, прорастание сосудов, что свидетельствовало об отсутствии полноценной регенерации роговицы при наличии лимбальной недостаточности.

### Литература

1. Микроскопическая техника: руководство / Под. ред. Д.С. Саркисова, Ю.Л. Перова. – М : Медицина, 1996. – 544 с.

2. Милудин Е.С. Экспериментальная модель недостаточности региональных стволовых клеток роговичного эпителия / Е.С. Милудин // Вестник СамГУ. Естественнонаучная серия. – 2006. – № 9 (49). – С. 219–226.

3. Получение трехмерного трансплантата лимбальных клеток роговицы / Н.В. Пасечникова, В.К. Гринь, Г.И. Дрожжина [и др.] // Вестник неотложной и восстановительной медицины. – 2012. – Т. 13, № 1. – С. 99–102.

4. Резников О.Г. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах / О.Г. Резников // Ендокринологія. – 2003. – Т. 8, № 1. – С. 142–145.

5. Сухинин М.В. Реактивные изменения переднего эпителия роговицы при повреждении ростковой зоны лимба глаза / М.В. Сухинин, В.Г. Гололов, И.В. Гайворонский // Фундаментальные проблемы гистологии, гистогенез и регенерация тканей. – СПб.: ВМедА, 2004. – С. 136–137.

6. Трансплантация стволовых клеток лимба при патологии роговицы / Г.К. Мухамеджанова, Б.О. Сулеева, И.Е. Ольшевский [и др.] // Новые технологии в лечении заболеваний роговицы : Всероссийская научно-практич. конф. «Федоровские чтения-2004»: тезисы докл. – М., 2004. – С. 490–495.

7. Ченцова Е.В. Лимбальная клеточная недостаточность / Е.В. Ченцова, Л.Р. Николаева // Вестник офтальмологии. – 2006. – № 3. – С. 43–47.

8. Characterisation of extracellular matrix components in the limbal epithelial stem cell compartment / U. Schlotzer-Schrehardt, T. Dietrich, K. Saito [et. al.] // Exp Eye Res. – 2007. – Vol. 85 (6). – P. 845–860.

8. Grueterich M. Human limbal progenitor cells expanded on intact amniotic membrane ex vivo / M. Grueterich, S.C. Tseng // Arch. Ophthalmol. – 2002. – Vol. 120 (6). – P.783–790.

9. Histopathology of human corneas after amniotic membrane and limbal stem cell transplantation for severe chemical burn / J. Stoiber, W.H. Muss, G. Pohl-Gubo [et. al.] // Cornea. – 2002. – Vol. 21 (5). – P.482–489.

10. Lavker R. Corneal epithelial stem cells at the limbus: looking at some old problems from a new angle / R. Lavker, S.Tseng, T.Sun // Experimental eye research. – 2004. – Vol. 78. – P. 433 – 446.

11. Mitomycin C-Assisted Photorefractive Keratectomy in High Myopia: A Long-term Safety Study / C. Gambato, S. Miotto, M. Cortese [et. al.] // Cornea. – 2011. – Vol. 30 (6). – P. 641–645.

### Резюме

Свидко К.М., Дьомін Ю.А. Морфологічне підтвердження експериментальної моделі лимбальної клітинної недостатності.

У даній роботі доведена практичність використання експериментальної моделі лимбальної недостатності з використанням митомицина С, встановлений час його виведення з рогівки кроликів – 26,2 години. Морфологічно підтвер-



джено відсутність повноцінної регенерації рогівки при створеній недостатності клітин лімба.

**Ключові слова:** експериментальна модель, лімбальна недостатність, мітомицин С, передній епітелій рогівки.

#### Резюме

**Свидко Е.Н., Демин Ю.А.** Морфологическое подтверждение экспериментальной модели лимбальной клеточной недостаточности.

В данной работе доказана практичность использования экспериментальной модели лимбальной недостаточности с использованием митомидина С, установленное время его выведения из роговицы кроликов - 26,2 часа. Морфологически подтверждено отсутствие полноценной регенерации роговицы при созданной недостаточности клеток лимба.

**Ключевые слова:** экспериментальная модель, лимбальная недостаточность, митомидин С, передний эпителий роговицы.

#### Summary

**Svidko K.M., Dyomin U.A.** Morphological confirmation of experimental model of limbal stem cells deficiency.

In this research practical using of experimental model of limbal cells deficiency with mitomycin C was proved. Period of elimination of mitomycin C from rabbit's cornea was 26.2 hours. Absence of a complete regeneration of the cornea after creation of limbal stem cells deficiency was morphologically confirmed.

**Key words:** experimental model, limbal stem cells deficiency, mitomycin C, anterior epithelium of the cornea.

*Рецензент: д.біол.н., проф. І.О. Іванюра*

УДК 631.452

## ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПОЧВ АГРАРНЫХ ЗАЛЕЖЕЙ ВОСТОКА УКРАИНЫ

**Дара Н. Сулейман**

*Луганский национальный университет имени Тараса Шевченко*

#### Введение

Истощение почвенного покрова, утрата плодородия почв является одной из актуальных проблем биологии.

В Украине около 70% земельного фонда предназначено для сельскохозяйственного использования, из них – 80% предназначено для выращивания сельскохозяйственных культур. Интенсивность ведения хозяйства привела к существенному истощению почв, особенно на территории Востока Украины. Повышение урожайности наиболее популярных культур с каждым годом требует всё больших затрат на удобрения и химикаты, поэтому часть земель остаются неиспользованными. Прекращение антропогенной нагрузки ведёт к возникновению постепенных сукцессионных процессов. Эти процессы существенно отличаются от естественных и способствуют появлению новых растительных сообществ.

**Целью** наших исследований явилось изучение сукцессий, происходящих на аграрных залежах Востока Украины. В задачи исследований входило: обследование степных участков аграрных залежей Донецкой области разного возраста; изучение закономерностей восстановительных процессов почв и растительности.

#### Материалы и методы исследования

Исследования проводились в течение вегетационных сезонов 2010-2012 годов на участках со средней площадью 1,8 га, расположенных в разных районах Донецкой области и города Донецка методом сбора гербарного материала и его определения [1, 2]. Участки исследования - это сукцессии аграрных залежей разного возраста (от 2 до 9 лет).

Отбор почвы для анализа проводился из пахотного горизонта (0-30 см глубины) на пробных площадках каждой сукцессии. Почва участков – чернозем обыкновенный с пахотным горизонтом 30 см. Анализ проб проводили в лаборатории Донецкого областного