

ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

МАРЧЕНКО ІРИНА АНАТОЛІЇВНА

УДК: 579.262:616.61-002.3-053.2-085.015.8(043.3)

ДИСЕРТАЦІЯ

**ОСОБЛИВОСТІ ПРОЦЕСУ ФОРМУВАННЯ БАКТЕРІАЛЬНИХ
БІОПЛІВОК ЗАЛЕЖНО ВІД ЗМІН ПОКАЗНИКІВ ФАКТОРІВ
НЕСПЕЦИФІЧНОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ У ДІТЕЙ З
ПІЄЛОНЕФРИТАМИ**

Спеціальність 222 «Медицина»

спеціалізація «Мікробіологія» (медичні науки)

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії (PhD).

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

_____ І. А. Марченко

Науковий керівник: _____ Мішина Марина Митрофанівна
(доктор медичних наук, професор)

Харків – 2021

АНОТАЦІЯ

Марченко І. А. Особливості процесу формування бактеріальних біоплівок залежно від змін показників факторів неспецифічної резистентності у дітей з пієлонефритами. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 Медицина спеціалізація «Мікробіологія» (медичні науки) – Харківський національний медичний університет МОЗ України, Харків, 2021.

Захист відбудеться у спеціалізованій вченій раді Харківського національного медичного університету.

Метою даного дослідження було установлення особливостей процесу утворення біоплівок провідними збудниками пієлонефритів залежно від стану факторів неспецифічної резистентності в дітей різного віку.

В дослідження було включено 107 дітей віком від 1 місяця до 18 років, яких було розподілено на 2 основні групи: 1-ша група – діти з гострою й хронічною формами пієлонефриту та 2-га група - діти з пієлонефритом унаслідок вродженого гідронефрозу.

Унаслідок проведеного дослідження виявлено етіологічні особливості пієлонефритів у дітей з одночасним установленням особливостей формування біоплівок збудниками з визначенням стадій для кожного з ізолятів та встановленням здатності до продукування планктонних клітин добовими біоплівками як фактора колонізації мікроорганізмів з метою розроблення діагностичних критеріїв і подальшого визначення ефективних протимікробних засобів для запобігання рецидивів пієлонефритів у дітей.

Вперше було встановлено на регіонарному рівні, що основними збудниками первинного гострого та хронічного пієлонефритів у дітей були *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus spp.*; збудниками вторинного пієлонефриту в дітей з уродженим гідронефрозом –

Enterococcus faecalis, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Proteus spp.*

Отримали подальший розвиток наукові дослідження щодо визначення стадій формування біоплівки: встановлено, що до класичних п'яти етапів формування біоплівки додатковими є 6-й етап – дисемінація планктонних клітин, що утворилися всередині первинної біоплівки і внаслідок дисперсії, 7-й етап – реадсорбція планктонних клітин на субстратах, 8-й етап – агрегація, 9-й етап – сегментація бактеріальної вторинної біоплівки.

Уперше виявлено особливості формування біоплівки у дітей з пієлонефритами залежно від клінічної форми перебігу захворювання та вікової категорії. Встановлено, що в дітей з гострою формою пієлонефриту формування біоплівки ізолятами відбувається повільніше, ніж у дітей з хронічною формою та з пієлонефритом на фоні гідронефрозу. У дітей з хронічною формою пієлонефриту та пієлонефритом на фоні вродженого гідронефрозу старшої вікової категорії формуються біоплівки високої щільності, здатні до продукції великої кількості планктонних клітин, які дисемінують по організму й утворюють щільні вторинні біоплівки, що обумовлює виникнення частих рецидивів.

Отримали подальший розвиток наукові положення щодо вдосконалення методів протимікробної терапії пієлонефритів із застосуванням похідних нітрофуранів у дітей з метою запобігання ускладнень на підставі визначення способу пригнічення формування біоплівки мікроорганізмів, збудників пієлонефритів. Уперше встановлено, що похідні нітрофуранів у терапевтичній дозі пригнічують продукування планктонних клітин мікроорганізмів за впливу на первинні біоплівки як при гострих, так і при хронічних пієлонефритах у дітей, що запобігає формуванню вторинних біоплівки за рахунок утворення «отворів», крізь які до біоплівки потрапляють антибактеріальні препарати, що попереджає розвиток рецидивів.

Доповнено наукові дані щодо порушення імунного статусу з пригніченням субпопуляції лімфоцитів CD3⁺ CD4⁺, CD8⁺, CD25⁺; підвищенням субпопуляції клітин – активаторів апоптозу CD95⁺ у дітей середньої і старшої вікової категорії з одночасним підвищенням рівнів прозапальних цитокінів у дітей з пієлонефритом, причому рівень їх залежив від етіологічного фактора й віку дитини. Установлено, що дисбаланс клітинної та гуморальної ланок імунітету в дітей, хворих на первинний і вторинний пієлонефрит, сприяє рецидивуванню патологічного процесу, його прогресуванню та погіршенню подальшого перебігу пієлонефриту.

Уперше виявлено, що в дітей старшого віку, хворих на хронічний пієлонефрит, при збільшенні щільності біоплівки достовірно підвищується показник умісту антигенів у NETs, тобто здатність нейтрофілів у момент загибелі до захоплення більшої кількості збудників хронічного пієлонефриту.

Уперше встановлено, що інтенсивність фагоцитозу й здатність до формування NETs з найбільшим умістом антигенів притаманна дітям з хронічним пієлонефритом, зумовленим *Enterococcus faecalis*, та дітям з вторинним пієлонефритом в активній стадії захворювання старшої групи.

Доповнено наукові дані щодо апоптозу лейкоцитів при пієлонефритах у дітей: виявлено найвищу активність апоптозу лейкоцитів при первинному пієлонефриті в дітей вікової категорії 0–3 роки з гострою формою на ранній стадії, одночасно встановлено, що й у дітей з хронічною формою пієлонефриту показники кількості лейкоцитів, у тому числі й нейтрофілів, на ранній стадії апоптозу значно підвищено, що пояснюється поліетіологічністю захворювання та виникненням ускладнень.

У роботі уточнено наукові дані щодо зростання кількості апоптичних клітин при хронічній формі первинного пієлонефриту й при вторинному пієлонефриті на фоні гідронефрозу та встановлено, що в дітей середньої та старшої вікової категорії ці показники достовірно збільшені при змішаній інфекції незалежно від етіологічного чинника.

Доведено, що втрата лімфоцитів через апоптоз є компонентом фізіологічних змін неспецифічного імунітету, що має місце при пієлонефритах у дітей середнього та старшого віку, особливо на фоні вродженого гідронефрозу.

На основі поглибленого вивчення імунологічних, мікробіологічних показників й аналізу фахової літератури було систематизовано дані про взаємозв'язок здатності до біоплівкоутворення провідними збудниками пієлонефритів у дітей і неспецифічної імунної реакції залежно від віку хворої

Таким чином, значення одержаних результатів полягає в науковому обґрунтуванні механізмів розвитку та прогресування пієлонефритів у дітей. На основі визначення здатності до формування біоплівок збудників пієлонефритів у дітей, провідних показників неспецифічної резистентності організму та механізмів утворення нейтрофільних позаклітинних пасток можливо мікробіологічне й імунологічне обґрунтування нових підходів до комплексної терапії пієлонефритів у дітей і вдосконалення способів застосування антимікробних препаратів з урахуванням віку дитини залежно від клінічної форми захворювання.

На підставі проведеного дослідження запропоновано: спосіб пригнічення біоплівкоутворення збудниками гострих пієлонефритів у дітей, який включає визначення здатності до формування біоплівок патогенними мікроорганізмами та встановлення протимікробного ефекту препаратів нітрофуранового ряду (Патент України на корисну модель UA 139320, номер заявки u 2019 07222, дата пріоритету 26.12.2019. Публікація відомостей про видачу патенту 26.12.2019, Бюл. № 24. Спосіб пригнічення біоплівкоутворення патогенними мікроорганізмами, збудниками гострих пієлонефритів у дітей) і спосіб прогнозування ускладнень пієлонефритів у дітей на підставі дослідження стадій апоптозу та повної характеристики імунного статусу хворих на пієлонефрит дітей різного віку залежно від клінічної форми й етіологічного чинника захворювання (Патент України на корисну модель UA №144851. МПК G01N33/48 (2006.01), номер заявки

u202003529, дата пріоритету 11.06.2020. Публікація відомостей про видачу патенту 26.10.2020, Бюл. № 20. Спосіб оцінки імунного статусу дітей з пієлонефритами різних форм за станом апоптозу нейтрофілів венозної крові).

Результати дисертації впроваджено в наукову роботу кафедри мікробіології, вірусології та імунології ім. проф. Д. П. Гриньова Харківського національного медичного університету, кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного фармацевтичного університету (м. Харків), кафедри загальної та клінічної імунології й алергології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.

Ключові слова: біоплівки мікроорганізмів, діти, пієлонефрит, апоптоз, нейтрофільні позаклітинні пастки, неспецифічні фактори імунного захисту, цитокіни, вікова категорія.

ABSTRACT

Marchenko I.A. Peculiarities of the bacterial biofilms formation process depending on changes in indicators of non-specific resistance factors in children with pyelonephritis. - Manuscript copyright qualifying scientific work.

The dissertation on competition of a scientific degree of the doctor of philosophy on a specialty specialty Medicine 222 "Microbiology" (medical science) - Kharkov national medical university of the Ukrainian HCM, Kharkiv, 2021.

The defense of the thesis will take place in the specialized educational council of the Kharkiv National Medical University.

The dissertation is devoted to studying the peculiarities of bacterial biofilms formation process by causative agents of pyelonephritis in children depending on changes in indicators of non-specific resistance factors of the organism.

The study included 107 children aged 1 month to 18 years, who were divided into 2 main groups: group 1 - children with acute and chronic pyelonephritis and group 2 - children with pyelonephritis due to congenital hydronephrosis.

The carried out study revealed etiological features of pyelonephritis in children with simultaneous establishing of biofilms formation peculiarities by causative agents of pyelonephritis in children with the definition of stages for each of the isolates and establishing the ability to produce planktonic cells by daily biofilms as a factor of microorganisms colonization for diagnostic criteria development and further establishing of effective antimicrobial means to prevent pyelonephritis recurrence in children.

It was first established at the regional level that the main causative agents of primary acute and chronic pyelonephritis in children were *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus spp* .; the causative agents of secondary pyelonephritis in children with congenital hydronephrosis -

Enterococcus faecalis, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Proteus spp.*

Scientific research on determining the stages of biofilm formation has been further developed. The following five stages were added to the classic five stages of biofilm formation: 6 - dissemination of planktonic cells formed inside the primary biofilm and as a result of dispersion, 7 - reabsorption of planktonic cells on substrates, 8 - reaggregation, 9 - segmentation of bacterial secondary biofilm.

For the first time, the peculiarities of biofilm formation in children with pyelonephritis depending on the clinical form of the disease and age category were revealed. It was found that in children with acute pyelonephritis the formation of biofilm by isolates is slower than in children with chronic form and pyelonephritis on the background of hydronephrosis. In children with chronic pyelonephritis and pyelonephritis on the background of congenital hydronephrosis of older age, high-density biofilms are formed, which produce a large number of planktonic cells, which spread throughout the body and form dense secondary biofilms, which leads to frequent recurrences.

Scientific provisions for the improvement of methods of antimicrobial therapy of pyelonephritis with the use of derived from nitrofurans in children were further developed in order to prevent complications by determining the method of inhibiting the formation of biofilms of microorganisms, pathogens of pyelonephritis. It was found for the first time that derived from nitrofurans in a therapeutic dose inhibit the production of planktonic cells of microorganisms by exposure to primary biofilms in both acute and chronic pyelonephritis in children, which prevents the formation of secondary biofilms due to the formation of "pores - slits" through which that prevents the development of relapses.

It was found that they changed in children of different ages: subpopulations of lymphocytes indices with $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD25^+$ and $CD95^+$ markers of differentiation were reduced in young children and misbalance in cellular immunity link in middle-aged and older children were marked: a reliable increase of $CD95^+$ with a simultaneous decrease of $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD25^+$. It is

established that the disbalance of cellular and humoral parts of immunity in children with primary and secondary pyelonephritis contributes to the recurrence of the pathological process, its progression and deterioration of the further course of pyelonephritis.

For the first time it was found that in older children with chronic pyelonephritis, with increasing density of biofilms significantly increases the content of antigens in NETs, ie the ability of neutrophils to capture more pathogens at the time of death.

It was first established that the intensity of phagocytosis and the ability to form NETs with the highest content of antigens is characteristic of children with chronic pyelonephritis caused by *Enterococcus faecalis* and children with secondary pyelonephritis in the active stage of the disease of the older group.

Scientific data on leukocyte apoptosis in pyelonephritis in children have been supplemented: the highest activity of leukocyte apoptosis in primary pyelonephritis in children aged 0–3 years with acute form at an early stage has been revealed, at the same time it has been established that in children with chronic pyelonephritis including neutrophils, in the early stage of apoptosis is significantly increased, due to the polyetiology of the disease and the occurrence of complications.

The paper clarifies the scientific data on the growth of apoptotic cells in the chronic form of primary pyelonephritis and secondary pyelonephritis on the background of hydronephrosis and found that in middle-aged and older children, these rates are significantly increased with mixed infection, regardless of etiological factor.

It is proved that the loss of lymphocytes due to apoptosis is a component of physiological changes in nonspecific immunity that occurs in pyelonephritis in middle-aged and older children, especially against the background of congenital hydronephrosis.

Thus, the significance of the obtained results lies in the scientific substantiation of the mechanisms of development and progression of

pyelonephritis in children. Based on determining the ability to form a biofilm of pyelonephritis in children, leading indicators of nonspecific resistance and mechanisms of neutrophilic extracellular traps, microbiological and immunological substantiation of new approaches to complex therapy of pyelonephritis in children and improving methods of antimicrobial therapy depends on clinical form of the disease and child's age.

According to the materials of the thesis the patent of Ukraine for a utility model is received:

Method of inhibiting biofilm formation by pathogenic microorganisms, causative agents of acute pyelonephritis in children Patent of Ukraine UA 139320, 26 Dec 2019.

A method of assessing the immune status of children with pyelonephritis of various forms by the state of apoptosis of venous blood neutrophils Patent of Ukraine UA 144851, 26 Oct 2020.

The main provisions and conclusions of the thesis are implemented in the curriculum of departments Microbiology, Virology and Immunology named by prof. DP Grinyov Kharkiv National Medical University, Department of Microbiology, Virology and Immunology, National University of Pharmacy (Kharkiv), Department of General and Clinical Immunology and Allergology, VN Karazin Kharkiv National University.

Key words: microorganisms biofilms, children, pyelonephritis, apoptosis, neutrophilic extracellular traps, non-specific immune protection factors, cytokines, age category.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

У фахових виданнях (основні наукові результати дисертації):

(* особистий внесок дисертантки)

1. Мішина М.М., Макєєва Н.І., Давиденко В.Б., Бабійчук Л.А., Марченко І.А., Головачова В.О., Мозгова Ю.А., Маланчук С.Г., Дукаров С.В., Дубовик О.С., Мішина Ю.М., Зубова П.М. пієлонефрит у дітей: роль бактеріальної комунікації. *Монографія, ХНМУ*. 2020.121с.
2. Мішина М.М. Марченко І.А. Макєєва Н.І. Головачова В.О. Етіологічна характеристика збудників мікробно – запальних захворювань нирок і сечових шляхів у дітей залежно від віку та статі. *Український журнал медицини, біології та спорту*. 2019. Т.4, №2(18). С.81-86. (* - встановлено етіологічні фактори виникнення пієлонефритів у дітей раннього віку).
3. Mishyna M., Marchenko I., Malanchuck S., Makeeva N., Mozgova Yu.. Ability to form biofilms by pyelonephritis causative agents in children. *Georgian Medical News*. 2019; №9(294). P.132-136. (* - визначенно здатність збудників пієлонефритів у дітей формувати біоплівки).
4. Marchenko I. A., Babiichuk L. O., Mishyna M. M., Makieieva N. I., Zubov P. M. Peculiarities of leukocytes apoptosis modulation in children with pyelonephritis. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2020. № 11 (1). С. 88-92 (* - досліджено модуляцію апоптозу лейкоцитів при пієлонефритах у дітей різного віку).
5. Мішина М. М., Макєєва Н. І., Марченко І. А., Головачова В. О., Осолодченко Т. П. Формування біоплівок збудниками пієлонефритів у дітей раннього віку, як один з механізмів виникнення стійкості до антимікробних препаратів. *Український журнал медицини, біології та спорту*. 2020. Т.5, №2(24). С.104-111. (* - визначенно здатність

збудників пієлонефритів у дітей раннього віку формувати біоплівки та досліджено чутливість ізолятів до протимікробних препаратів).

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

1. Mozgova Yu., Mishyna M., Malanchuk S., Marchenko I., Mishyn Yu. Primary and Secondary biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from patients with purulent inflammatory processes. *International Conference on Virology, Bacteriology & Infectious Diseases*. November 26-28, 2018 Holiday Inn Rome, Aurelia, Italy. P.25. www.infectiousdiseasesconference.org (* - проведено дослідження щодо здатності до формування вторинних біоплівки ізольованими *Klebsiella pneumoniae in vitro*).
2. Mishyna M., Marchenko I., Makeeva N., Mozgova Yu., Mishyn Yu. Etiologic Structure of Pyelonephritis in Children and Ability of Causative Agents to Form Biofilms. *International Conference on Virology, Bacteriology & Infectious Diseases*. November 26-28, 2018 Holiday Inn Rome, Aurelia, Italy. P.27. www.infectiousdiseasesconference.org (* - проведено дослідження щодо встановлення етіологічної структури збудників пієлонефритів і здатності до формування біоплівки ізольованими).
3. Mishyna M., Marchenko I., Mozgova Yu. Neutrophils phagocytic activity and nets forming ability in young children with acute pyelonephritis. *EUSER 4th International Conference on Medicine and Natural Sciences Published*, 2019. Amsterdam, 26-27 April 2019. P.41. (* - визначено активність нейтрофілів у дітей з гострою формою пієлонефритів та здатність формувати нейтрофільні позаклітинні пастки).
4. Mishyna M., Marchenko I., Malanchuk S., Hololobova O. The effect of dnaase activity of *Pseudomonas aeruginosa*, causative agents of pyelonephritis, on the ability to form biofilms. *EUSER 4th International Conference on Medicine and Natural Sciences Published*, 2019 Amsterdam, 26-27 April 2019. P.40. (* - проведено дослідження щодо здатності до формування біоплівки ізольованими *Pseudomonas aeruginosa*).

5. Мішина М.М., Марченко І.А., Бабічук Л.О., Бабічук Г.А., Макєєва Н.І., Мозгова Ю.А., Головачова В.О., Мішин Ю.М. Оцінка стадій апоптозу лімфоцитів у дітей старшого віку з гострої і хронічної формами пієлонефриту. *Матеріали Всеукраїнської науково-практична конференція з міжнародною участю «Актуальні питання сучасної мікробіології та імунології», присвячена 90-річчю акад. А.Я. Циганенка 24-26 червня 2019 р., Харків. С. 62-64. (* - оцінено стадії апоптозу лімфоцитів у дітей старшого віку з гострою і хронічною формами пієлонефриту).*
6. Мішина М.М., Марченко І.А., Маланчук С.Г., Макєєва Н.І., Головачова В.О., Мозгова Ю.А., Мішин Ю.М. Формування біоплівки грамнегативними бактеріями, збудниками пієлонефритів у дітей. *Матеріали Всеукраїнської науково-практична конференція з міжнародною участю «Актуальні питання сучасної мікробіології та імунології», присвячена 90-річчю акад. А.Я. Циганенка. 24-26 червня 2019 р., Харків. С. 64-65. (* - визначено здатність до формування біоплівки грамнегативними бактеріями, збудниками пієлонефритів у дітей).*
7. Мішина М.М., Марченко І.А., Давиденко В.Б., Мозгова Ю.А., Дубовик О.С. Утворення біоплівки збудниками пієлонефритів у дітей з вродженим гідронефрозом. *Матеріали конференції «Актуальні проблеми мікробіології, вірусології та імунології», присвяченої 100-річчю з дня заснування кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця МОЗ України, 05 листопада 2019, м. Київ, Україна. С. 94-95. (* - визначено здатність до утворення біоплівки збудниками пієлонефритів у дітей з вродженим гідронефрозом).*
8. Maryna Mishyna, Iryna Marchenko, Svitlana Malanchuk. Evaluation Of Peripheral Blood Neutrophils Apoptosis Stages In Children With Acute And Chronic Pyelonephritis. *Scitech World conference on Immunology&infectious diseases. Annual Conference on Nephrology and kidney diseases. October 08-*

- 09, 2019, Dubai, UAE. (* - оцінено стадії апоптозу лімфоцитів у дітей з гострою і хронічною формами пієлонефриту).
9. Марченко І.А. Визначення стану ключових компонентів системи комплементу у дітей молодшого віку з вродженим гідронефрозом, що ускладнений пієлонефритом, зумовленим *E.coli*. *Матеріали конференції ISIC-2019*. 18-20 вересня 2019. Харківський національний медичний університет, Харків, Україна. С.32-33.
 10. Марченко І.А. Формування NETs при гострому обструктивному пієлонефриті у дітей. *Збірник тез міжвузівської конференції молодих вчених та студентів «Медицина третього тисячоліття» до 215-ої річниці утворення Харківської вищої медичної школи*, 30 - 31. 01.2019, Харків. С.30-31.
 11. Марченко І.А. Оцінка стану клітинної ланки імунітету у дітей раннього віку з пієлонефритом на фоні гідронефрозу. *Збірник матеріалів конференції «Медицина III тисячоліття»*, 20-22 січня 2020, Харків. С. 56-57.
 12. Malanchuk S., Mishyna M., Marchenko I., Davydenko V., Mozgova Yu. Modulation of the immune status in pyelonephritis caused by *Pseudomonas aeruginosa* in children with hydronephrosis. *30th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), France (Paris), Abstract Book*. 2020. P.2566. (* - оцінено імунний статус у дітей з пієлонефритом, зумовленим *Pseudomonas aeruginosa*, на фоні вродженого гідронефрозу).
 13. Мішина М. М., Марченко І. А., Давиденко В. Б. Дубовик О. С., Мішин Ю. М. Визначення адгезивної активності збудників пієлонефриту у дітей із вродженим гідронефрозом. Медичні та фармацевтичні науки: аналіз сучасності та прогноз майбутнього: *Збірник матеріалів міжнародної науково-практичної конференції (м. Дніпро, 13–14 листопада 2020 р.)*. – Дніпро: Організація наукових медичних досліджень «Salutem», 2020. –

С.18-23. (* - визначенно адгезивну активність збудників пієлонефритів у дітей з уродженим гідронефрозом).

14. Марченко І.А. Рівень компонентів системи комплементу у дітей старшої вікової категорії з вродженим гідронефрозом, що ускладнений пієлонефритом. *Матеріали науково-практичної конференції студентів та молодих вчених «Мікробіологія – перспективи розвитку», яка присвячена 140-річчю проф. Д.П. Гриньова. Харківський національний медичний університет, Харків, Україна. 10 грудня 2020. С.32-33.*

Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації:

1. Патент на корисну модель № 139320.МПК (2019.01) А61К 45/00 А 61Р 31/00 Спосіб пригнічення біоплівкоутворення патогенними мікроорганізмами, збудниками гострих пієлонефритів у дітей. Власник ХНМУ, Макєєва Н.І., Мішина М.М., Марченко І.А., Вовк О.О., Мозгова Ю.А., Головачова В.А., Мішин Ю.М. № заяв.у2019 07222, опубл.26.12.2019, Бюл. №24.
2. Патент на корисну модель №144851. МПК G01N33/48 (2006.01). Спосіб оцінки імунного статусу дітей з пієлонефритами різних форм за станом апоптозу нейтрофілів венозної крові. Власник ХНМУ, Мішина М.М., Марченко І.А., Макєєва Н.І., Вовк О.О., Баабітчук Л.О., Головачова В.А. №заяв.у202003529, опубл. 26.10.2020, бюл. №20.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ		22
ВСТУП		23
РОЗДІЛ 1	СУЧАСНИЙ ПОГЛЯД НА ПРОБЛЕМУ ВИНИКНЕННЯ ПІЕЛОНЕФРИТІВ У ДІТЕЙ ЗАЛЕЖНО ВІД ЕТІОЛОГІЧНОГО ЧИННИКА З УРАХУВАННЯМ СТАНУ НЕСПЕЦИФІЧНОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ОРГАНІЗМУ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ).....	34
	1.1 Сучасні уявлення про етіологію піелонефритів.....	35
	1.2 Стан проблеми формування біоплівок мікроорганізмами – збудниками піелонефритів у дітей	37
	1.3 Сучасні уявлення про стан неспецифічної резистентності в дітей з піелонефритами з визначенням функціонального значення нейтрофілів у патогенезі піелонефритів.....	39
	1.4 Функціональне значення апоптозу нейтрофілів у патогенезі піелонефритів у дітей.....	43
РОЗДІЛ 2	ОБ’ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	49
	2.1 Об’єкти і матеріал дослідження.....	49
	2.2 Методи дослідження.....	50
РОЗДІЛ 3	ЕТІОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЗБУДНИКІВ МІКРОБНО-ЗАПАЛЬНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ НИРОК І СЕЧОВИХ ШЛЯХІВ У ДІТЕЙ ЗАЛЕЖНО ВІД ВІКУ ТА СТАТІ.....	61
	3.1 Характеристика етіологічних чинників мікробно-запальних захворювань нирок і сечових шляхів у	

	дітей залежно від віку та статі.....	19
3.2.	Характеристика збудників пієлонефритів на фоні гідронефрозів у дітей залежно від віку та статі.....	63
		68
	Висновки до розділу 3.....	70
РОЗДІЛ 4	ОСОБЛИВОСТІ ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВОК ПРОВІДНИМИ ЗБУДНИКАМИ ПІЄЛОНЕФРИТІВ У ДІТЕЙ ЗАЛЕЖНО ВІД КЛІНІЧНОЇ ФОРМИ ПЕРЕБІГУ ЗАХВОРЮВАННЯ.....	72
4.1	Особливості формування біоплівки збудниками гострого і хронічного пієлонефритів у дітей.....	74
4.2	Особливості формування біоплівки збудниками гострого і хронічного пієлонефритів у дітей середньої та старшої вікової категорії.....	84
4.3	Дослідження етапів формування біоплівки провідними збудниками пієлонефриту на фоні вродженого гідронефрозу в дітей залежно від віку..	92
4.4	Вплив похідних нітрофуранів на здатність мікроорганізмів, збудників пієлонефритів у дітей, утворювати біоплівки.....	103
4.5	Підвищення ефективності антибактеріальної терапії пієлонефриту в дітей з уродженим гідронефрозом.....	110
	Висновки до розділу 4.....	113
РОЗДІЛ 5	ОСОБЛИВОСТІ ІМУННОГО, ЦИТОКІНОВОГО СТАНУ Й АПОПТОЗУ НЕЙТРОФІЛІВ ПРИ ПІЄЛОНЕФРИТАХ У ДІТЕЙ ЗАЛЕЖНО ВІД КЛІНІЧНОЇ ФОРМИ ПЕРЕБІГУ ТА ПРОВІДНОГО ЗБУДНИКА ЗАХВОРЮВАННЯ.....	117

5.1.	Особливості змін імунної відповіді при первинних пієлонефритах у дітей залежно від клінічної форми, вікової категорії та збудника захворювання.....	117
5.2.	Визначення стану вродженого й адаптивного імунітету в дітей з пієлонефритом у стадії загострення на тлі вродженого гідронефрозу.....	120
5.3	Визначення здатності утворення NETs у дітей різного віку з пієлонефритами залежно від клінічної форми, вікової категорії та збудника захворювання.....	132
	5.3.1. Визначення здатності до утворення NETs у дітей з первинними пієлонефритами.....	132
	5.3.2. Визначення здатності до утворення NETs у дітей різного віку з вторинним пієлонефритом на фоні вродженого гідронефрозу в активній стадії перебігу захворювання.....	135
5.4	Визначення функціональної активності нейтрофільних гранулоцитів при пієлонефриті в дітей різного віку залежно від утворення біоплівки провідними збудниками.....	136
5.5.	Визначення патогенетичної ролі апоптозу нейтрофілів при пієлонефритах у дітей залежно від клінічної форми, вікової категорії та збудника захворювання.....	140
	5.5.1 Особливості модуляції апоптозу нейтрофілів у дітей з первинними пієлонефритами.....	140
	5.5.2.Визначення показників апоптозу лімфоцитів у дітей з пієлонефритом на фоні вродженого	

	21
гідронефрозу.....	148
Висновки до розділу 5.....	156
РОЗДІЛ 6 ВИЗНАЧЕННЯ КОРЕЛЯЦІЙНИХ ВЗАЄМОЗВ'ЯЗКІВ ЗНАЧЕНЬ ЩІЛЬНОСТІ УТВОРЕННЯ БІОПЛІВОК ПРОВІДНИМИ ЗБУДНИКАМИ ПІСЛОНЕФРИТІВ У ДІТЕЙ З ПОКАЗНИКАМИ НЕСПЕЦИФІЧНОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ЗАЛЕЖНО ВІД КЛІНІЧНОЇ ФОРМИ ТА ВІКОВОЇ КАТЕГОРІЇ.....	161
Висновки до розділу 6.....	175
АНАЛІЗ Й УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	176
ВИСНОВКИ.....	197
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ.....	200
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	201
ДОДАТКИ.....	217

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ І
ТЕРМІНІВ

ГПН – гострий пієлонефрит

IAM – індекс адгезивної активності мікроорганізмів

M33 НСШ – мікробно-запальні захворювання нирок і сечових шляхів

ПН-ВГН – пієлонефрит на фоні вродженого гідронефрозу

ХПН – хронічний пієлонефрит

CD3⁺ – кластер диференціації Т-клітин

CD4⁺ – Т-хелпери

CD8⁺ – цитотоксичні Т-клітини

CD25⁺ – регуляторні, активовані Т-лімфоцити

CD95⁺ – апоптичні клітини

IgG – імуноглобулін G

IgM – імуноглобулін M

IL-1 β – інтерлейкін 1 β

IL-6 – інтерлейкін 6

TNF α – tumor necrosis factor- α , фактор некрозу пухлини

NETs – нейтрофільні позаклітинні пастки

CH50 – система комплементу

C3, C4, C5 – компоненти комплементу

ВСТУП

Поширеність хвороб органів сечової системи серед дитячого населення України за останні роки збільшилася. У структурі захворювань сечовидільної системи в дітей пієлонефрит посідає провідне місце [20, 110]. Зростання захворюваності на пієлонефрит обумовлене не тільки поліпшенням діагностики та диспансеризації дітей, але й збільшеною вірулентністю і резистентністю до антимікробних препаратів мікроорганізмів, збільшенням кількості дітей з імунодепресивним станом. Незважаючи на застосування сучасних антибактеріальних препаратів і певну тенденцію до поліпшення результатів лікування, відсоток виникнення ускладнень, зокрема ниркової недостатності, таких хворих не зменшується [34, 127]. Велику проблему становить зростання резистентності мікроорганізмів до антибактеріальних засобів [6, 9], а також зміна структури уропатогенів в етіології захворювання.

Дослідження останніх років довели, що недостатня ефективність протимікробної терапії пієлонефритів пов'язана з нехтуванням роллю біоплівок мікроорганізмів у розвитку патологічного процесу, а утворення біоплівок є однією з основних стратегій виживання бактерій у зовнішньому середовищі [43, 85, 109].

Через формування біоплівок умовно-патогенними та патогенними мікроорганізмами значно ускладнюється лікування пієлонефритів у дітей. Це є наслідком значного підвищення резистентності мікроорганізмів до антимікробних препаратів, оскільки в біоплівках реалізуються процеси, практично відсутні в планктонних форм існування бактерій [113, 140].

У складі біоплівки мікроорганізми набувають надзвичайної стійкості до дії дезінфікувальних речовин, антибактеріальних препаратів, бактеріофагів, антитіл і фагоцитів. Концентрації антибіотиків, що необхідні для руйнування або видалення біоплівки, набагато перевищують максимальні терапевтичні дози.

Проблема утворення біоплівки протягом багатьох років залишається актуальною. Багатьма науковцями в усьому світі проводяться дослідження механізму формування біоплівок і пошуку засобів, які зможуть блокувати цей процес [96, 97, 114].

Одним із головних завдань сучасної медицини є пошук нових підходів до підвищення ефективності діагностики, лікування і профілактики пієлонефритів у дітей з вибором оптимальних схем протирецидивної терапії, оскільки, незважаючи на великий арсенал уросептиків і схем з призначення, проблема профілактики рецидивів хронічного перебігу пієлонефритів залишається невирішеною. Таким чином, у зв'язку зі значною поширеністю пієлонефритів у дітей, нерідко з хронічним стійким перебігом, частими рецидивами, множинними побічними реакціями на антибактеріальні препарати, розвитком резистентності мікроорганізмів до антибіотиків, ускладненнями внаслідок хронічної ниркової недостатності, вивчення мікробіологічних показників, особливостей імунних механізмів у патогенезі пієлонефритів у дітей, проблема пошуку нових патогенетично обґрунтованих й ефективних безпечних засобів, схем терапії і профілактики рецидивів пієлонефритів набуває особливої актуальності.

З огляду на це варто встановити етіологічні особливості пієлонефритів у дітей та визначити особливості процесу формування біоплівок збудниками з установленням змін факторів неспецифічної резистентності. Визначення стану клітинної та гуморальної ланок імунітету, цитокінового балансу, активності системи комплементу, фагоцитарного процесу та здатність нейтрофілів до формування позаклітинних пасток залежно від клінічної форми пієлонефриту в дітей та вікової категорії хворих дітей дасть змогу адекватно скорегувати антимікробну та імунотерапію для підвищення ефективності лікування з метою запобігання рецидивів пієлонефритів.

Водночас велика кількість питань щодо дизрегуляторних порушень природної загибелі клітин й участі апоптозу в патогенезі імунної дестабілізації при пієлонефритах у дітей залишаються відкритими, тому

представляється важливим вивчення мікробіологічних та імунних механізмів залежно від клінічної форми захворювання й віку дитини, що визначають розвиток і характер перебігу пієлонефритів. Це, безсумнівно, розширить наявні фундаментальні уявлення про патогенез пієлонефриту в дітей залежно від вікової категорії і слугуватиме основою для створення більш досконалих методів діагностики, виявлення груп ризику з розвитку важких прогресуючих форм захворювання, а також для розроблення більш ефективних методів профілактики й корегування імунopatологічних змін, які супроводжують перебіг пієлонефритів і протирецидивні заходи.

Гіпотеза дослідження полягає в тому, що встановлення взаємозв'язків між показниками факторів неспецифічної резистентності й утворення біоплівки провідними збудниками пієлонефритів може бути забезпечено шляхом визначення патогенетичної ролі нейтрофільних позаклітинних пасток та апоптозу лімфоцитів з метою вдосконалення схем лабораторної діагностики й підвищення ефективності комплексної протимікробної терапії хворих на пієлонефрит дітей для запобігання виникнення рецидивів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

НДР виконувалася в рамках науково-дослідних робіт Харківського національного медичного університету, зокрема кафедри педіатрії № 2 – тема з фінансуванням за рахунок Держбюджету МОЗ України «Оптимізація діагностики і профілактики хронізації мікробно-запальних захворювань сечовивідної системи та прогресування нефропатій у дітей керуванням взаємодією макро- та мікроорганізмів» (№ держреєстрації 0118U000945 КПКВК 2301020 – прикладна, 2018–2020 рр.) та кафедри мікробіології, вірусології та імунології ім. проф. Д. П. Гриньова «Експериментальне обґрунтування застосування комплексу протимікробних засобів на підставі визначення особливостей мікробіологічних властивостей збудників гнійно-запальних захворювань» (№ держреєстрації 0120U102569 КПКВК 2301020 – прикладна, 2020–2024 рр.).

Мета і завдання дослідження

Мета – установлення особливостей процесу утворення біоплівок провідними збудниками пієлонефритів залежно від стану факторів неспецифічної резистентності в дітей різного віку.

Для досягнення мети було поставлено **завдання**:

1. Установити видовий склад збудників пієлонефритів у дітей з визначенням адгезивної активності ізолятів.
2. Визначити етапи процесу формування біоплівок збудниками пієлонефритів у дітей залежно від вікової категорії та клінічної форми захворювання.
3. Визначити здатність до формування біоплівок збудниками пієлонефритів у дітей за дії похідних нітрофуранів.
4. Вивчити стан неспецифічного захисту за характером змін фагоцитарної, комплементарної активності, утворенням нейтрофільних позаклітинних пасток, клітинної і гуморальної ланок імунітету в дітей, хворих на пієлонефрит.
5. Визначити рівень прозапальних цитокінів при пієлонефритах у дітей залежно від віку та клінічної форми захворювання.
6. Дослідити апоптичну активність нейтрофілів при пієлонефритах у дітей різної вікової категорії залежно від збудників захворювання та їхніх асоціацій.
7. Визначити кореляційні взаємозв'язки значень щільності утворення біоплівок провідними збудниками пієлонефритів у дітей з показниками неспецифічної резистентності залежно від клінічної форми захворювання та вікової категорії.

Об'єкт дослідження – пієлонефрити в дітей.

Предмет дослідження – визначення стадій утворення біоплівок провідними збудниками пієлонефритів у дітей, планктонних клітин мікроорганізмів; оцінка стану неспецифічної резистентності в дітей з пієлонефритами.

Методи дослідження:

1. Бактеріологічний – ідентифікація мікроорганізмів за допомогою ідентифікаційних наборів «МІКРО-ЛА-ТЕСТ®»; визначення чутливості штамів мікроорганізмів до антимікробних препаратів за допомогою мікрометоду в полістиролових планшетах. Тестування ізолятів на здатність утворювати біоплівки у чашках Петрі d=40мм та в плоскодонних полістиролових планшетах. Вимірювання оптичної щільності (од.ощ.) вихідної бактеріальної суспензії проводилося на приборі «Densi-La-Meter», а інокульованих бактеріальних клітин – на фотометрі «Multiskan EX» при довжині хвилі 540 нм.
2. Імунологічний – вивчення імунного статусу оцінювали за рівнями Т-, В- та фагоцитарного ланцюгів імунітету. Для визначення нейтрофільних пасток ставили реакцію з використанням клітинної суспензії нейтрофілів периферичної крові, виділених на градієнтних розчинах фікол-верографіну, для фарбування нейтрофільних пасток використовували розчин акридинового помаранчевого. Рівні цитокінів (IL-1 β , IL-6, TNF- α), IgA, IgM, IgG визначено за допомогою ІФА (комерційні набори для імуноферментного аналізу («BioSource», Бельгія) і («Bender Medsystems», Австрія).
3. Цитологічний – апоптоз нейтрофілів оцінено методом проточної цитофлуориметрії з використанням моноклональних антитіл (МКАТ).
4. Статистичний – оцінювання достовірності досліджених показників. При обробленні результатів використано методи параметричної і непараметричної статистики із застосуванням програми «Statistica 7».

Наукова новизна отриманих результатів

На регіонарному рівні вперше встановлено, що основними збудниками первинного гострого та хронічного пієлонефритів у дітей були *Enterococcus*

faecalis, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus spp.*; збудниками вторинного пієлонефриту в дітей з уродженим гідронефрозом – *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Proteus spp.*

Отримали подальший розвиток наукові дослідження щодо визначення стадій формування біоплівок: встановлено, що до класичних п'яти етапів формування біоплівок додатковими є 6-й етап – дисемінація планктонних клітин, що утворилися всередині первинної біоплівки і внаслідок дисперсії, 7-й етап – реадсорбція планктонних клітин на субстратах, 8-й етап – реак агрегація, 9-й етап – сегментація бактеріальної вторинної біоплівки.

Уперше виявлено особливості формування біоплівок у дітей з пієлонефритами залежно від клінічної форми перебігу захворювання та вікової категорії. Встановлено, що в дітей з гострою формою пієлонефриту формування біоплівок ізолятами відбувається повільніше, ніж у дітей з хронічною формою та з пієлонефритом на фоні гідронефрозу. У дітей з хронічною формою пієлонефриту та пієлонефритом на фоні вродженого гідронефрозу старшої вікової категорії формуються біоплівки високої щільності, здатні до продукції великої кількості планктонних клітин, які дисемінують по організму й утворюють щільні вторинні біоплівки, що обумовлює виникнення частих рецидивів.

Отримали подальший розвиток наукові положення щодо вдосконалення методів протимікробної терапії пієлонефритів із застосуванням похідних нітрофуранів у дітей з метою запобігання ускладнень на підставі визначення способу пригнічення формування біоплівок мікроорганізмів, збудників пієлонефритів. Уперше встановлено, що похідні нітрофуранів у терапевтичній дозі пригнічують продукування планктонних клітин мікроорганізмів за впливу на первинні біоплівки як при гострих, так і при хронічних пієлонефритах у дітей, що запобігає формуванню вторинних біоплівок за рахунок утворення «отворів», крізь які

до біоплівки потрапляють антибактеріальні препарати, що попереджає розвиток рецидивів.

Доповнено наукові дані щодо порушення імунного статусу з пригніченням субпопуляції лімфоцитів CD3⁺ CD4⁺, CD8⁺, CD25⁺; підвищенням субпопуляції клітин – активаторів апоптозу CD95⁺ у дітей середньої і старшої вікової категорії з одночасним підвищенням рівнів прозапальних цитокінів у дітей з пієлонефритом, причому рівень їх залежив від етіологічного фактора й віку дитини. Установлено, що дисбаланс клітинної та гуморальної ланок імунітету в дітей, хворих на первинний і вторинний пієлонефрит, сприяє рецидивуванню патологічного процесу, його прогресуванню та погіршенню подальшого перебігу пієлонефриту.

Уперше виявлено, що в дітей старшого віку, хворих на хронічний пієлонефрит, при збільшенні щільності біоплівок достовірно підвищується показник умісту антигенів у NETs, тобто здатність нейтрофілів у момент загибелі до захоплення більшої кількості збудників хронічного пієлонефриту.

Уперше встановлено, що інтенсивність фагоцитозу й здатність до формування NETs з найбільшим умістом антигенів притаманна дітям з хронічним пієлонефритом, зумовленим *Enterococcus faecalis*, та дітям з вторинним пієлонефритом в активній стадії захворювання старшої вікової групи.

Доповнено наукові дані щодо апоптозу лейкоцитів при пієлонефритах у дітей: виявлено найвищу активність апоптозу лейкоцитів при первинному пієлонефриті в дітей вікової категорії 0–3 роки з гострою формою на ранній стадії, одночасно встановлено, що й у дітей з хронічною формою пієлонефриту показники кількості лейкоцитів, у тому числі й нейтрофілів, на ранній стадії апоптозу значно підвищено, що пояснюється поліетіологічністю захворювання та виникненням ускладнень.

У роботі уточнено наукові дані щодо зростання кількості апоптичних клітин при хронічній формі первинного пієлонефриту й при вторинному пієлонефриті на фоні гідронефрозу та встановлено, що в дітей середньої та

старшої вікової категорії ці показники достовірно збільшені при змішаній інфекції незалежно від етіологічного чинника.

Доведено, що втрата лімфоцитів через апоптоз є компонентом фізіологічних змін неспецифічного імунітету, що має місце при пієлонефритах у дітей середнього та старшого віку, особливо на фоні вродженого гідронефрозу.

На основі поглибленого вивчення імунологічних, мікробіологічних показників й аналізу фахової літератури було систематизовано дані про взаємозв'язок здатності до біоплівкоутворення провідними збудниками пієлонефритів у дітей і неспецифічної імунної реакції залежно від віку хворої дитини, клінічної форми й провідних збудників захворювання.

Практичне значення отриманих результатів

Результати дослідження є теоретичною основою для диференційованого підходу до оцінювання порушень апоптозу лімфоцитів, зокрема нейтрофілів, і дають можливість підвищити ефективність діагностики та проведення протирецидивної терапії.

На підставі проведеного дослідження запропоновано: спосіб пригнічення біоплівкоутворення збудниками гострих пієлонефритів у дітей, який включає визначення здатності до формування біоплівок патогенними мікроорганізмами та встановлення протимікробного ефекту препаратів нітрофуранового ряду (Патент України на корисну модель UA 139320, номер заявки u 2019 07222, дата пріоритету 26.12.2019. Публікація відомостей про видачу патенту 26.12.2019, Бюл. № 24. Спосіб пригнічення біоплівкоутворення патогенними мікроорганізмами, збудниками гострих пієлонефритів у дітей) і спосіб прогнозування ускладнень пієлонефритів у дітей на підставі дослідження стадій апоптозу та повної характеристики імунного статусу хворих на пієлонефрит дітей різного віку залежно від клінічної форми й етіологічного чинника захворювання (Патент України на корисну модель UA №144851. МПК G01N33/48 (2006.01), номер заявки u202003529, дата пріоритету 11.06.2020. Публікація відомостей про видачу

патенту 26.10.2020, Бюл. № 20. Спосіб оцінки імунного статусу дітей з пієлонефритами різних форм за станом апоптозу нейтрофілів венозної крові).

Результати дисертації впроваджено в наукову роботу кафедри мікробіології, вірусології та імунології ім. проф. Д. П. Гриньова Харківського національного медичного університету, кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного фармацевтичного університету (м. Харків), кафедри загальної та клінічної імунології й алергології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.

Особистий внесок здобувача

Дисертанткою самостійно проаналізовано наукову літературу за темою дисертаційної роботи, проведено патентно-інформаційний пошук, разом з науковим керівником визначено мету і завдання дослідження, обґрунтовано та сформульовано основні висновки роботи. Самостійно обрано методологічні підходи, згідно з якими виконано дослідження щодо виділення ізолятів з визначенням здатності збудників пієлонефритів формувати біоплівки. Авторкою самостійно проведено дослідження з вивчення стану неспецифічної резистентності хворих на пієлонефрит дітей. У співавторстві з науковим керівником д. мед. н., професоркою Мішиною М. М. та д. мед. н., професоркою Макеєвою Н. І. було розроблено спосіб пригнічення біоплівкоутворення патогенними мікроорганізмами, збудниками гострих пієлонефритів у дітей і спосіб прогнозування ускладнень пієлонефритів у дітей різного віку залежно від форми пієлонефриту й етіологічного чинника; у співавторстві з д. б. н., професором Бабійчук Л. О. було вивчено стадії апоптозу лімфоцитів при пієлонефритах у дітей на проточному цитофлуориметрі. У співавторстві з к. ф.-м. н. провідним науковим співробітником кафедри експериментальної фізики фізичного факультету Дукаровим С. В. та доцентом кафедри клінічної імунології та алергології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна Маланчук С. Г. було визначено етапи формування біоплівок збудниками пієлонефритів у дітей за допомогою конфокальної мікроскопії.

Дисертанткою проведено лабораторні дослідження самостійно та за консультативною допомогою наукового керівника д. мед. н., проф. Мішиної М. М. Авторкою проаналізовано й узагальнено всі отримані лабораторні результати та статистично оброблено отримані результати. Самостійно написано всі розділи дисертації, сумісно з науковим керівником сформульовано висновки і практичні рекомендації. За основними положеннями виконаної роботи підготовлено доповіді на конференціях, наукові праці до друку, дисертацію до захисту.

Апробація результатів дисертації

Матеріали дисертації оприлюднено на Міжнародній конференції з вірусології, бактеріології та інфекційних хвороб (м. Рим, Італія, 2018); на 4-й Міжнародній конференції з медицини та природничих наук EUSER (м. Амстердам, Нідерланди, 2019); на Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальні питання сучасної мікробіології та імунології», присвяченій 90-річчю акад. А. Я. Циганенка (м. Харків, 2019); на конференції «Актуальні проблеми мікробіології, вірусології та імунології», присвяченій 100-річчю з дня заснування кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного медичного університету ім. О. О. Богомольця МОЗ України (м. Київ, 2019); на Всесвітній конференції з імунології й інфекційних хвороб та на щорічній конференції з нефрології та хвороб нирок (м. Дубай, ОАЕ, 2019); на конференції ISIC-2019 (м. Харків, 2019); на Міжвузівській конференції молодих вчених та студентів «Медицина третього тисячоліття» до 215-ої річниці утворення Харківської вищої медичної школи (м. Харків, 2019); на конференції «Медицина III тисячоліття» (м. Харків, 2020); на Міжнародному конгресі з клінічної мікробіології (м. Париж, 2020), на Міжнародній науково-практичній конференції «Медичні та фармацевтичні науки: аналіз сучасності та прогноз майбутнього» (м. Дніпро, 2020).

Публікації

За матеріалами дисертації опубліковано 21 наукову працю, серед яких 4 статті, з них 2 статті – у наукових фахових виданнях, 1 стаття – у журналі, внесеному до міжнародної наукометричної бази *Scopus*, 1 стаття – у журналі, що належить до наукометричної платформи *Web of Scienc*; 14 тез доповідей у збірниках матеріалів науково-практичних конференцій, конгресів; 2 патенти України на Корисну модель, 1 монографія. Перелічені публікації достатньо повно відображають запропоновані в роботі теоретичні та практичні вирішення.

Структура та обсяг дисертації.

Дисертацію викладено українською мовою, загальним обсягом 222 сторінки машинописного тексту, з яких 139 сторінок займає основний текст. Дисертація складається зі змісту, переліку умовних скорочень, вступу, огляду літератури, опису матеріалу та методів дослідження, чотирьох розділів власних досліджень, аналізу й узагальнення результатів дослідження, висновків, практичних рекомендацій, списку використаної літератури. Бібліографія містить 148 джерел, з яких 67 позицій – кирилицею і 81 – латиницею. Роботу ілюстровано 4 таблицями та 105 рисунками.

РОЗДІЛ 1

**СУЧАСНИЙ ПОГЛЯД НА ПРОБЛЕМУ ВИНИКНЕННЯ
ПІЕЛОНЕФРИТІВ У ДІТЕЙ ЗАЛЕЖНО ВІД ЕТІОЛОГІЧНОГО
ЧИННИКА З УРАХУВАННЯМ СТАНУ НЕСПЕЦИФІЧНОЇ
РЕЗИСТЕНТНОСТІ ОРГАНІЗМУ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)**

Пієлонефрит у дітей посідає одне з провідних місць серед проблем сучасної педіатрії. Високі показники його поширеності, тенденція до зростання кількості хворих на пієлонефрит дітей зумовлюють необхідність більш докладного вивчення цієї проблеми. Актуальність проблеми пієлонефриту пов'язана не тільки з його високою поширеністю серед дітей і великою варіабельністю клінічної картини захворювання, але й з частішим латентних форм, схильністю до рецидиву, рідкісним настанням повного вилікування. Досі існують труднощі діагностики даної патології [1, 139]. Схожість клінічної картини і лабораторної симптоматики пієлонефриту й патології нижніх сечових шляхів ускладнює діагностику захворювання, нерідко призводить до гіпердіагностики пієлонефриту і необґрунтованого тривалого застосування препаратів антибактеріальної дії [57, 65]. Успішне лікування й профілактика пієлонефриту неможливі без ретельного вивчення чинників, що сприяють формуванню та прогресуванню захворювання. Проте лише поодинокі роботи присвячено виявленню факторів ризику прогресування пієлонефриту в дітей [74, 110].

Лікування пієлонефриту залишається одним з найактуальніших завдань дитячої нефрології на сучасному етапі [81]. До сьогодні триває пошук оптимальних препаратів для лікування пієлонефриту, дискутуються питання з підбору оптимальних схем протирецидивної терапії та тривалості їх проведення [36, 121].

Але незважаючи на те, що на сьогодні існує багато препаратів із широким спектром антимікробної дії, проблема лікування пієлонефритів,

залишається досить актуальною. Це пов'язано зі збільшенням рівня резистентності мікроорганізмів до антибіотиків унаслідок нераціонального їхнього використання: широкого застосування в профілактичних цілях, емпіричного застосування без моніторингу антибіотикорезистентності та безконтрольного самолікування. Вагомим фактором у неефективності антибактеріальної терапії є також те, що при призначенні лікарських препаратів не враховується доза антибіотиків для знищення біоплівки полімікробного походження [132, 134]. З огляду на це є необхідність удосконалення відомих і пошуку нових методів лікування гнійно-запальних процесів.

1.1. Сучасні уявлення про етіологію пієлонефритів

Вивчення етіологічної структури пієлонефритів у дітей та ускладнень, резистентності виділеної мікрофлори до антимікробних препаратів є необхідним для розроблення схем раціональної антибіотикотерапії, використання яких дає можливість оптимізувати результати лікування хворих дітей і затримати зростання резистентності до антимікробних препаратів [6, 15].

Стійкість мікроорганізмів до протимікробних засобів на сьогодні виходить за межі суто медико-біологічної проблеми та має велике соціально-економічне значення [51].

Збудниками пієлонефритів у дітей є різні мікроорганізми, циркулювання яких завжди має місце в лікувально-профілактичних закладах, а також ті мікроорганізми, що є представниками флори самого пацієнта. При цьому спектр мікроорганізмів у кожному окремому стаціонарі різних лікувальних закладів варіює залежно від профілю стаціонару, певних циркулюючих внутрішньолікарняних штамів та їхніх властивостей [41, 64].

Останнім часом спостерігається посилення ролі родини *Enterobacteriaceae* як етіологічного чинника у виникненні пієлонефритів у

дітей з високим ступенем рецидування, що пов'язано з їхнім взаємним індукуванням факторів патогенності і переважанням полірезистентних до антибіотиків культур [119]. Циркулювання в лікувальних закладах різних умовно-патогенних мікроорганізмів зумовлює певний відсоток виникнення пієлонефритів у дітей, що потребує пошуку шляхів вирішення проблеми профілактики та лікування. Для цього слід здійснювати моніторингові дослідження [23, 62].

Серед структури збудників, які викликають пієлонефрит у дітей, переважає грамнегативна флора, при цьому близько 80–90%, за даними різних авторів, припадає на інфікування бактеріями *Escherichia coli*. Велике значення у виникненні пієлонефриту в дітей переважно раннього віку мають *Proteus mirabilis*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.* й *Pseudomonas spp.* Грампозитивні мікроорганізми представлено в основному ентерококами і стафілококами [26, 67].

Відомо, що гострий пієлонефрит є наслідком бактеріальної інвазії в ниркову паренхіму. На розвиток інфекції впливають фактори патогенності мікроорганізму та фактори імунного захисту макроорганізму.

Бактерії також можуть потрапляти до нирки гематогенним шляхом. Здатність бактерій паразитувати в нирках визначається комплексом властивостей, оскільки на різних етапах інфекційно-запального процесу від них вимагається експресія різних патогенетично значущих ознак та їх поєднань [97, 141].

Незважаючи на розроблення сучасних антибактеріальних препаратів та впровадження новітніх технологій для боротьби з патогенними мікроорганізмами, питання терапії пієлонефритів у дітей залишається відкритим, тому що труднощі в їх лікуванні виникають у зв'язку з надзвичайним зростанням антибіотикорезистентності мікроорганізмів, яку пов'язують з можливістю бактерій утворювати навколо себе захисну плівку [3, 118, 122].

1.2. Стан проблеми формування біоплівки мікроорганізмами – збудниками пієлонефритів у дітей

Дослідження механізмів розвитку інфекційного процесу повинні враховувати наявність особливого біологічного явища – формування бактеріальних біоплівок [49]. Вивчення біоплівок становить великий інтерес дослідників насамперед тому, що цей спосіб існування бактерій створює проблеми в медичній практиці [52, 132].

Установлено, що збудники пієлонефритів у дітей здатні утворювати біоплівки як при гострому періоді захворювання, так і при хронічному. Виявлено пряму кореляційну залежність між здатністю мікроорганізмів утворювати бактеріальні плівки і тривалістю захворювання [91].

Однією з причин тривалого перебігу пієлонефритів у дітей є наявність персистуючої інфекції та біоплівок мікроорганізмів. Біоплівка – це не хаотичний конгломерат мікробів, не пов'язаних між собою, а самодостатня, регульована система, яку можна назвати самостійною формою мікробіоти і найважливішим біотичним складником біосфери [11, 14, 28].

Численні дослідження останніх сорока років показали, що процес формування біоплівки є складним і багатостадійним. У життєвому циклі біоплівок виділяють п'ять основних стадій: адгезії, моношару, мікроколоній, дозрівання та розпаду. Усі п'ять з наведених стадій можна спостерігати при формуванні біоплівки будь-яким мікроорганізмом, кожна з них може бути мішенню для впливу нових антимікробних препаратів [79, 80, 109].

Клітини-резиденти біоплівки занурено в гідратований екзополімерний матрикс, компоненти якого синтезуються самими мікроорганізмами. Матрикс зазвичай містить поліцукриди, білки, нуклеїнові кислоти й ліпіди; він сприяє механічній стабільності біоплівок, опосередковує їхню адгезію до поверхонь й утворює компактну тривимірну полімерну структуру, яка забезпечує контакт між клітинами і їхнє транзиторне утримання в біоплівці.

Матрикс виконує різні функції для спільноти: від забезпечення структурної жорсткості і захисту від зовнішнього середовища до контролю генної регуляції та адсорбції поживних речовин [129].

У складі біоплівки умовно-патогенні бактерії набувають ознак підвищеної стійкості до антибіотиків та інших факторів довкілля. Сьогодні відомо, що всі збудники інфекційних захворювань формують біоплівки [121].

Біоплівкоутворення можна вважати одним з додаткових факторів патогенності мікроорганізмів. Так, здатність до утворення плівок штамми патогенних й умовно-патогенних мікроорганізмів лежить в основі збільшення антибіотикорезистентності [73, 114].

Проблема мікробних біоплівок в останні десятиріччя стає дедалі актуальнішою. Стандартна терапія здатна впоратися тільки з окремо існуючими планктонними клітинами, тоді як бактерії всередині біоплівки здатні розмножуватися і знову дисемінувати після завершення курсу лікування, що призводить до формування хронічних процесів і рецидивів захворювання [113]. Терапевтичний вплив на біоплівки може бути спрямований на механізми первинної адгезії бактерій до поверхні, блокування синтезу або руйнування полімерного матриксу, порушення міжклітинного обміну інформацією, у тому числі в поєднанні з власне бактерицидними агентами. Подібне лікування, що діє на структуру або функції біоплівок, може виявитися більш ефективним, ніж стандартна антибактеріальна терапія [115]. Сучасний рівень наукових знань дає змогу підвищувати ефективність терапії хвороб мікробної етіології. На сьогодні не тільки накопичено значні теоретичні знання в цій галузі, але й існує низка практичних досліджень. Проте ця проблема залишається досі не вирішеною.

Вивчення впливу антимікробних засобів на розвиток біоплівки патогенними й умовно-патогенними мікроорганізмами є необхідною умовою розуміння як біологічних основ формування біоплівки, так і пошуку препаратів, що ефективно пригнічують плівкоутворюючі бактерії, які спричиняють інфекційні ускладнення.

Незважаючи на прогрес у розробленні й удосконаленні наявних методів лікування пієлонефритів у дітей, ця проблема залишається пріоритетною в сучасній педіатрії. Спроба зробити акцент виключно на антимікробний компонент у комплексній програмі лікування даної патології виявилася недостатньо ефективною [15, 54].

З розробленням та впровадженням у клінічну практику сучасних високоефективних методів терапії з використанням новітніх технологій спостерігається значний прогрес у лікуванні пієлонефритів у дітей. Водночас можливості для вдосконалення методів лікування пієлонефритів у дітей ще не повністю реалізовано, що обумовлює доцільність продовження та поглиблення досліджень у цьому напрямку [7, 57].

Отже, проблема боротьби з біоплівковими формами існування збудників пієлонефритів у дітей протягом багатьох років залишається актуальною та на сьогодні це питання є не вирішеним. Багатьма науковцями в усьому світі проводяться дослідження щодо вивчення механізму формування біоплівок та пошуку засобів блокувати формування біоплівки. Вирішення цих проблем дасть змогу обґрунтувати нові підходи до діагностики пієлонефриту і вибору оптимальної тактики обрання профілактичних заходів до виникнення рецидивів пієлонефритів у дітей.

1.3 Сучасні уявлення про стан неспецифічної резистентності в дітей з пієлонефритами з визначенням функціонального значення нейтрофілів у патогенезі пієлонефритів

Рецидивний характер пієлонефриту в дітей, відсутність бажаного ефекту від етіотропної терапії пояснюються не тільки наявністю високовірулентної мікрофлори [76], а й складними патогенетичними механізмами [84, 136], у розвитку яких важливу роль відіграє імунна система [25, 48].

Роль імунних механізмів у патогенезі вторинних пієлонефритів у дітей набуває особливого значення з огляду на незрілість імунної системи і

недосконалість багатьох її функцій у дитячому організмі [8]. Важливим є також те, що вторинний пієлонефрит у дітей з уродженим гідронефрозом, виникає на тлі вже наявної імунологічної перебудови організму внаслідок порушення диференціювання тканин сечового тракту [70].

Дані проаналізованих літературних джерел свідчать про низький рівень місцевого імунного захисту сечового тракту, що створює сприятливі умови для вегетації бактерій [58, 94]. Виникнення запалення в сечовій системі обумовлено взаємодією двох основних чинників: особливостей імунітету дитини і патогенетичних особливостей збудника пієлонефриту [72].

Відомо, що розвиток і результат запального процесу залежить від стану вродженого й адаптивного імунітету, важливими складниками якого є клітинна та гуморальна ланки, цитокіновий баланс, система комплементу, фагоцитоз тощо. При прогресуванні бактеріального запалення в нирці та розвитку хронізації процесу розвивається імунологічна недостатність і виникають ускладнення, що залежить від перехресного антигенного впливу, зниження імунної резистентності, негативних ефектів тривалої антибактеріальної терапії на імунітет дитини.

При пієлонефриті в дітей унаслідок потрапляння чужорідних агентів, патогенних бактерій запальний процес індукується макрофагами вродженого імунітету, що є відповіддю на ушкодження мембран клітин нирки. При цьому транслокація мієлоцитів у вогнище запалення дає змогу організму дитини вирішити проблему локального дефіциту ефекторів. Потрапляння лейкоцитів в інтерстицій є необхідним компонентом реалізації вродженого імунітету на альтерацію [24, 35, 66]. Відомо, що фагоцитоз є одним з основних механізмів захисту організму від інфекції і залежить від функціональної активності нейтрофілів та ферментів. У багатьох роботах, присвячених вивченню імунної відповіді при пієлонефритах у дітей, відзначено порушення в складі фагоцитарної ланки, збільшення рівня лейкоцитів, гранулоцитів, зниження фагоцитарного показника і фагоцитарного числа [18, 30].

Істотну роль в активації та кооперації імунної відповіді при пієлонефритах у дітей відіграє дисбаланс у субпопуляції лімфоцитів: активно мігрують у зону запалення $CD8^+$ -лімфоцити, що мають супресивний ефект, але їхня кількість може бути недостатньою. При вкрай важких випадках хронічного пієлонефриту в дітей фагоцитарна функція пригнічується внаслідок зниження презентації макрофагами більшості інфекційних детермінант, що супроводжується істотним зменшенням експресії HLA-молекул, призначених для здійснення імунної відповіді [19, 29, 34, 37]. Отже, можна констатувати, що при пієлонефриті в дітей наявний складний дефект фагоцитарної ланки імунної системи, який полягає в порушенні як метаболічної системи фагоцитарних клітин, так і їхнього функціонального резерву, що приводить до недостатності цього компонента імунітету.

Одиним з важливих механізмів уродженого імунітету, який безпосередньо реагує на антигени збудників пієлонефритів, є система комплементу. При пієлонефриті в дітей спостерігається недостатній уміст основних компонентів комплементу, що вважається критерієм хронізації запального процесу [2]. При пригніченні антимікробної ефективності комплементу в нирковій паренхімі при запаленні додатково знижується фагоцитарна активність поліморфноядерних лейкоцитів. Ці порушення вродженого імунітету є основною причиною ускладнень, таких як бактеріємія і сепсис [38, 45].

Найбільш важливим для реалізації і регулювання імунного захисту при пієлонефритах у дітей є медіатори запалення, що виділяються моноцитами й макрофагами. Ці клітини секретують прозапальні цитокіни і є джерелом факторів визначення розвитку запальної реакції та участі в більшості реакцій уродженого імунітету. Захист на місцевому рівні відбувається шляхом розвитку запальної реакції у відповідь на потрапляння в тканини патогенних мікроорганізмів за участю прозапальних цитокінів, синтезованих у вогнищі запалення макрофагальними клітинами, активованими компонентами

клітинної мембрани патогенів, а також у відповідь на пошкодження тканин. При гострому процесі виявляється високий рівень у крові прозапальних й протизапальних цитокінів.

В імунопатогенезі пієлонефриту в дітей важливу роль відіграє порушенням механізмів адаптивного імунітету. Моніторинг імунологічних критеріїв продемонстрував зниження показників клітинної ланки імунітету: функціональної активності Т-лімфоцитів, абсолютної кількості Т-лімфоцитів ($CD3^+$), Т-хелперів ($CD4^+$), природних регуляторних клітин для виключення аутоагресії, Т-клітин із цитотоксичним ефектом ($CD8^+$). Унаслідок виникнення гострого пієлонефриту в дітей активну участь в імунній адаптивній відповіді беруть Т-лімфоцити, що мігрують з периферичного кровотоку в зону первинного запалення. Крім того, виявлено зміни в гуморальній ланці імунітету, які характеризувалися зниженням абсолютної кількості В-лімфоцитів, рівня IgG, A, при нормальному рівні IgM [44, 60].

В активній фазі пієлонефриту, саме при загостренні хронічного пієлонефриту, виявлено підвищення кількості В-лімфоцитів, рівнів Ig A, M, G, а також тенденція в окремих випадках до гіперсекреції IgA.

Наявний імунодефіцитний стан створює умови для прогресування пієлонефриту, стимулює патогенетичні фактори захворювання з посиленням імунологічної недостатності. Це пов'язано не тільки з персистуванням мікроорганізмів, їхніх факторів агресії, а також з виснаженням резервів імунної системи, негативними ефектами антибактеріальної терапії.

Отже, проведений літературний аналіз продемонстрував недостатню вивченість, суперечливість і дискутабельність таких питань, як інтенсивність фагоцитозу, роль апоптозу, характер цитокінової відповіді; також відсутні дані про фенотипування субпопуляцій Т- і В-лімфоцитів, їхні активації при пієлонефриті в дітей, особливо на тлі гідронефрозу.

1.4 Функціональне значення апоптозу нейтрофілів у патогенезі пієлонефритів у дітей

Апоптоз є генетично детермінованим процесом з імунномодулюючою формою клітинної загибелі клітини, який активується у відповідь на клітинний стрес або пошкодження [21, 68]. Доведено, що апоптоз відіграє важливу стабілізуючу роль у підтримуванні оптимальної кількості клітин у багатоклітинному організмі [92].

За допомогою апоптозу здійснюється ремоделювання тканини при нормальному зростанні й розвитку організму, а також регулюються лабільні клітинні популяції, зокрема нейтрофіли. Відомо, що апоптоз є регульованим, енергетично витратним процесом і може бути ініційований за допомогою різних механізмів. Дослідники припускають [123, 145], що мітохондріальний шлях апоптозу починається в клітині, коли токсичні ушкодження викликають зниження мембранного потенціалу, що призводить до відкриття отворів мітохондріальної мембрани і вивільнення цитохромів й інших субстанцій у цитоплазму. Зовнішній шлях ініціюється екстрацелюлярними чинниками через рецептори клітинної поверхні до фактора некрозу пухлини. Установлено, що хоч внутрішній апоптотичний шлях залучає ранню активацію каспаз-9, а зовнішній шлях опосередковується через каспазу-8, обидва вони призводять до активації каспаз-3, протеаз й ендонуклеаз [148]. Велика кількість цитоплазматичних білків клітини бере участь у детекції сигналів, які активують або сповільнюють процес апоптозу. Фахівцями встановлено, що ініціація інфекційно-запальних процесів, зокрема пієлонефритів, безпосередньо пов'язана з реактивністю клітин уродженого імунітету, що становлять першу лінію захисту від патогенів і забезпечують базовий рівень імунітету у відповідь на інфікування організму [116]. Деякі патогени є тригерами або інгібіторами апоптозу в еукаріотичній клітині з уникненням дії факторів імунної системи. З іншого боку, організм господаря може використовувати апоптоз як захист від мікроорганізмів. Клітини

вродженого імунітету, що беруть участь в ініціації інфекційного процесу і визначають захисні реакції організму в розвитку інфекційного процесу, мають провідне значення при пошкодженні клітин органів-мішеней. Тому апоптоз відіграє значну роль у клітинних взаємовідносинах макро- та мікроорганізмів, що залежить від факторів патогенності збудника інфекційного процесу, типу клітини-мішені й інтенсивності інфекційного процесу. Так, провідними збудниками пієлонефритів є бактерії з множинною лікарською стійкістю, які спричиняють апоптоз клітин через CD95-шлях. В експериментах *in vivo* було показано, що в цьому разі апоптоз відіграє роль у захисті клітин макроорганізму від бактеріальної інфекції [90].

Зазвичай збудники пієлонефритів після адгезії, колонізації та інвазії активують вивільнення клітинами імунного захисту цитокінів, що спричиняють як медіатори запалення системну відповідь і запускають процеси модуляції апоптозу для підтримання гомеостазу організму. Отже, апоптоз є особливо важливим процесом для нормальної роботи імунної системи. Як відомо, система вродженого імунітету людини ініціює гостре запалення на початку інфекції, однак подальше припинення індукованого інфекцією запалення є критичним для ушкодженої тканини. Вважають, що з цією метою апоптоз нейтрофілів сприяє завершенню запалення, викликаного активацією нейтрофілів. Тоді як макрофаги є важливими в опосередкуванні хронічного запалення при пієлонефритах, нейтрофіли необхідні в ініціюванні та реалізації гострої запальної відповіді при активації процесу. Як ефектори запалення нейтрофіли є провідними імунними клітинами в гострій стадії бактеріальних інфекцій. Таким чином, бактеріальні патогени можуть модулювати апоптоз, що ініціює розвиток інфекційного процесу [71].

За даними S. D. Kobayashi et al. [102], транскрипційна регуляція апоптичного процесу є маловивченою. Унаслідок багаторічних досліджень було виявлено гени, які обумовлюють загальну програму диференціювання апоптозу в нейтрофілах після фагоцитозу патогенних бактерій. На підставі проведених досліджень автори висловили гіпотезу, що існує два

фундаментальних результати взаємодії бактеріальних патогенів з нейтрофілами, а саме: фагоцитоз бактерій індукує програму апоптозу в нейтрофілах макроорганізму, що сприяє завершенню запального процесу, та фагоцитоз мікроорганізмів змінює програму диференціального апоптозу в нейтрофілах, що призводить до виживання патогенів і розвитку запального процесу. Як зазначено вище, апоптоз нейтрофілів модулюється збудниками інфекційного процесу. Оскільки програма експресії загального гена дає змогу припустити, що фагоцитоз мікроорганізмів індукує програмовану клітинну загибель у нейтрофілах макроорганізму, автори оцінили нейтрофільний апоптоз після фагоцитозу кожного збудника запального процесу й показали, що фагоцитоз усіх патогенів посилював апоптоз нейтрофілів.

Фахівці встановили, що саме стрептококи індукували швидкий апоптоз нейтрофілів, рівень якого був значно більшим, ніж такий, викликаний іншими збудниками. Дійсно, стрептокок-індукований апоптоз нейтрофілів уже через 90 хвилин був подібним до рівня апоптозу при інших бактеріях тільки через 6 годин. Автори показали, що вбиті прогріванням бактерії були нездатні індукувати апоптоз нейтрофілів. Це узгоджується з припущенням, що живі бактерії продукують чинники, які змінюють апоптоз у цих клітинах [137]. Незважаючи на те, що фагоцитоз й активні форми кисню вважаються індукторами апоптозу в нейтрофілах, можемо припустити, що мінімальні рівні активних форм кисню є необхідними, але недостатніми для ініціації апоптозу [147]. Авторами доведено, що живі стрептококи індукують виражений некроз нейтрофілів, не виявлений при фагоцитозі інактивованих прогріванням мікроорганізмів. Це підтверджує ключову роль репресії генів, що контролюють долю нейтрофілів, у патогенезі пієлонефритів, спричинених стрептококами. Отже, імунна функція нейтрофілів при інфекційних захворюваннях насамперед асоціюється з фагоцитозом і продукуванням цитотоксичних компонентів, у тому числі кисневих радикалів [100]. Порушення функціональної активності нейтрофілів може проявлятися внаслідок неконтрольованого апоптозу. Це явище може ініціюватися

позаклітинним впливом TNF α - або FAS-ліганд, а також внутрішньоклітинним шляхом, зокрема підвищеною кількістю кисневих радикалів [87].

Інші фахівці зауважують [125], що лімфоцити підлягають нерегульованому апоптозу при запальному процесі, який перебігає з розвитком сепсису з виникненням сильної імуносупресії, що характеризує тяжкий перебіг захворювання. У здоровому організмі безпосередньо доля лімфоцитів визначається постійним підсумовуванням потоку проапоптичних й антиапоптичних сигналів, які надходять з їхнього зовнішнього і внутрішнього оточення. Тому зрушення в бік початку апоптозу слід очікувати протягом ранньої фази запального процесу, коли бактерії або їхні побічні продукти стимулюють макрофаги до вивільнення медіаторів запалення. При цьому акумулюються продукти апоптозу лімфоцитів, які можуть діяти як протизапальне стимулювання, що сприяє імуносупресії.

Таким чином, можна дійти висновку, що клітинна загибель й інфекційний процес взаємопов'язані та впливові процеси, розвиток яких відіграє важливу роль як у макроорганізмі, так і в збуднику. Загибель клітин макроорганізму впливає на результат інфекції, опір уродженого захисного бар'єру, стан уродженого й адаптивного імунітету. Клітинна загибель макроорганізму, спричинена мікроорганізмами, реалізується різними шляхами залежно від типу клітини, стадії інфекції, патогенності та вірулентності збудників, а також фізіологічного стану клітини. Крім того, розуміння динаміки взаємодії між патогенами і вродженою захисною відповіддю господаря *in vitro* і *in vivo* іноді суперечливе. Проте подальші дослідження клітинної загибелі при взаємодіях макро- та мікроорганізмів сприятимуть глибшому розумінню механізмів, за допомогою яких клітини підлягають запрограмованій загибелі як механізму вродженої захисту від запальних процесів, спричинених мікроорганізмами [69].

Дослідження українськими вченими [55] стану маркерів апоптозу циркулюючих імункомпетентних клітин у дітей з хронічним пієлонефритом

показало, що TNF α , Fas/Apo, iNOs та AnnV значно активуються на тлі високої експресії в них білка Bcl:2. Визначається висока експресія диференційованих маркерів Т-лімфоцитів з переважанням CD8 над CD4. У лімфоцитах CD4 у межах контролю експресується INF γ , TNF α , iNOs і AnnV, але знижена експресія Fas/Apo, Вах і Bcl:2. У лімфоцитах CD8 встановлено значну активізацію експресії iNOs, Fas/Apo і AnnV при нормальному рівні експресії TNF α і Bcl:2 та зниженій експресії Вах і INF γ . Автори припускають, що основну елімінаційну функцію виконують цитотоксичні Т-лімфоцити при активізації апоптоза окисом азоту – опосередкованим шляхом. Фахівці стверджують, що при хронічному пієлонефриті в дітей роль маркерів апоптозу визначається участю в компенсаторних реакціях імунної системи при інфікуванні ниркової тканини та за рахунок посилення експресії гена Bcl:2 у мононуклеарах циркулюючої крові з одночасним зменшення експресії гена Вах у субпопуляціях CD4 і CD8.

Незважаючи на інтенсивне вивчення апоптозу дослідниками, до сьогодні біологічну сутність загибелі клітин при інфекційній патології висвітлено недостатньо. Роль апоптозу при різних інфекціях становить фундаментальний інтерес для розуміння патогенетичних процесів імунної системи, а також має прикладне значення для об'єктивного обґрунтування призначеної терапії.

У літературі неоднозначно представлено роль апоптозу при інфекційних захворюваннях, зокрема при пієлонефритах у дітей. Отже, подальші дослідження щодо визначення стану апоптичних процесів при пієлонефритах у дітей різного віку залежно від провідних чинників інфекційного процесу та клінічної форми захворювання нададуть можливість установити фактори впливу патогенних мікроорганізмів на механізми клітинної загибелі, що забезпечить розроблення нових наукових даних у патогенезі пієлонефритів у дітей.

Таким чином, аналіз літератури показав порушення у дітей з пієлонефритами провідних ланок імунної регуляції, що призводить до

виділення різних медіаторів запалення, які посилюють розвиток запальних змін у нирках. Безсумнівно, прозапальні цитокіни відіграють важливу роль у регулюванні функціональної активності імунних клітин при пієлонефриті, тому подальше вивчення ролі імунного та цитокінового стану з акцентом на особливості апоптозу нейтрофілів при пієлонефритах у дітей різних вікових категорій та клінічної форми перебігу залежно від властивостей етіологічного чинника необхідне для правильного обґрунтування провідних критеріїв діагностики пієлонефриту з метою запобігання виникнення рецидивів. Підсумовуючи, додамо: визначення факторів патогенності та стадій біоплівкоутворення доповнить уявлення про мікробіологічні особливості пієлонефриту в дітей, що є зараз доречним.

Усе викладене вище визначає актуальність обраної теми дослідження. Вирішення зазначених проблем дасть змогу обґрунтувати нові підходи до діагностики пієлонефриту й вибору оптимальної тактики проведення профілактики виникнення рецидивів пієлонефритів у дітей.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкти і матеріал досліджень

2.1.1. Загальна характеристика хворих на пієлонефрит

Основну групу досліджуваних становили діти з гострим або хронічним пієлонефритом у період загострення віком від 1 місяця до 18 років, яких обстежили та лікували в нефрологічному відділенні Харківської клінічної дитячої лікарні № 16, та діти з пієлонефритом унаслідок гідронефрозу, що перебували на лікуванні в хірургічному відділенні Харківської обласної дитячої клінічної лікарні № 1. Дітей госпіталізували в період з 1 жовтня 2018 року по 25 лютого 2019 року. Обстеження дітей з пієлонефритом проводилося в день госпіталізації перед початком лікування.

Критерії включення пацієнтів у терапевтичні групи:

- ✓ підпис інформованої згоди пацієнта або його батьків (опікунів) на участь у дослідженні;
- ✓ наявність пієлонефриту в стадії загострення;
- ✓ вік хворих від 1 місяця до 18 років.

Критерії виключення з дослідження:

- ✓ усі пацієнти та/або їхні батьки, що не дали письмової інформованої згоди;
- ✓ супутня патологія;
- ✓ біологічна терапія;
- ✓ інші гострі або хронічні запальні захворювання (гломерулонефрит, цистит).

Усіх пацієнтів було розподілено на 3 групи: I – діти з первинним пієлонефритом: усередині групи розподіл на 3 вікові підгрупи. У кожній підгрупі пацієнтів також розподілили за діагнозом: діти з гострим або хронічним пієлонефритом. 1-ша підгрупа включала дітей вікової категорії від

1 місяця до 3 років та 11 місяців ($n = 37$: ГПН $n = 26$ та ХПН $n = 11$); 2-га підгрупа – дітей від 4 до 7 років та 11 місяців ($n = 16$: ГПН $n = 10$ та ХПН $n = 6$); 3-тя підгрупа – дітей від 8 до 18 років ($n = 30$: ГПН $n = 16$ та ХПН $n = 14$). Діагноз, критерії тяжкості ПН, основна терапія визначалися відповідно до протоколу діагностики та лікування дітей з інфекціями сечовивідних шляхів із застосуванням стандартизованих й уніфікованих методів.

До II групи увішли діти з вторинним пієлонефритом, що розвився на фоні гідронефрозу ($n = 24$): у кожній віковій підгрупі по 8 пацієнтів. III група – контрольна (10 клінічно здорових дітей різного віку).

2.1.2. Матеріал дослідження

Матеріалом для імунологічних досліджень та визначення апоптозу нейтрофілів слугувала периферична кров, забрана з ліктьової вени вранці натщесерце в кількості 3 мл у стерильну пробірку з EDTA.

Матеріалом для мікробіологічного дослідження була сеча, катетери та венфлони. Зразки для дослідження забирали й постачали в лабораторію згідно з вимогами взяття і доставки матеріалу для мікробіологічних лабораторій, запропонованих Медичною академією післядипломної освіти ім. П. Л. Шупика, м. Київ [4]. Усі зразки виділяли із сечі пацієнтів при надходженні до лікарні до початку антибактеріальної терапії.

2.2. Методи дослідження

2.2.1. Мікробіологічний метод.

Виділення й ідентифікація мікроорганізмів. Мікробіологічне дослідження проводили [39] загальноприйнятими методами (наказ № 535) та за допомогою ідентифікаційних наборів «МІКРО-ЛА-ТЕСТ®», які призначено для проведення стандартної ідентифікації з використанням мікрометодів.

Приготування суспензій мікроорганізмів з визначеною концентрацією мікробних клітин здійснювалося за допомогою електронного приладу «Densi-La-Meter» («PLIVA-Lachema a.s.», Чехія) за шкалою McFarland згідно з інструкцією до приладу.

Оптичну щільність вимірювали за допомогою мікропланшетного рідера «Multiskan EX» (тип 355), що являє собою фотометр зі змінними фільтрами й здатен проводити стандартні фотометричні вимірювання.

Синхронізація періодичної культури шляхом селекції (метод Мітчисона і Вінсента). Синхронізація періодичних культур досліджуваних штамів проводилася після встановлення кінетики росту асинхронної культури. Визначався режим періодичного культивування таким чином, щоб протягом експоненціального росту клітинна маса збільшувалася від двох до п'яти разів:

1. Готувалося 500 мл стерильного середовища в кількох колбах.
2. Інкубували клітини в системі періодичного культивування до середини експоненційної фази. Швидко охолоджували культуру до 0–4 °С, занурюючи колби в крижану баню. Клітини збирали 10-хвилинним центрифугуванням на холоді при 10 000 g.
3. Осад клітин ресуспендували у 2 мл крижаного буфера (0,1 М калій-фосфатного буфера, рН 7,0) на гомогенізаторі типу «Vortex».
4. Наносили суспендовані клітини на стерильний охолоджений градієнт щільності фіколу.
5. Закриті кришками епендорфи з клітинами поміщали в рефрежераторну центрифугу і центрифугували 15–20 хв при 2500 g на холоді).
6. 0,5 мл найлегшої фракції клітин з епендорфу вносили в колбу з нагрітим ростовим середовищем.
7. Вимірювали оптичну щільність і визначали її поетапне збільшення, що свідчило про синхронне зростання культури.

Дослідження утворення біоплівки (метод O'Toole G.A.) здійснювали за допомогою визначення здатності штамів бактерій до адгезії на поверхні полістиролу в 96 лункових планшетах для імуноферментного аналізу [120]. Культури вирощували за загальноприйнятими в мікробіології методами на рекомендованих для кожної родини бактерій суспензійних середовищах (входять до комплектації ідентифікаційних наборів: поживне середовище для виділення ентеробактерій, до складу входять: пептон ферментативний – 10,0; гідролізат казеїну неглибокого ступеня розщеплення ферментативний сухий – 10,0; дріжджовий екстракт – 1,0; натрію хлорид – 3,4; натрію сульфід – 0,8;

натрію гідроортофосфат – 0,75; лактоза – 10,0; фуксин основний – 0,2; агар мікробіологічний – $10,5 \pm 2,5$; рН $7,3 \pm 0,2$; для виділення стафілококів: поживне середовище для виділення стафілококів – елективний сольовий агар: пептон сухий ферментативний – 15,0; гідролізат казеїну ферментативний неглибокого ступеня розщеплення – 10,0; екстракт кормових дріжджів для мікробіологічних поживних середовищ – 5,0; натрію гідроортофосфат – 0,5; натрію хлорид – 75,0; натрій вуглекислий – 0,1; агар мікробіологічний – $(10,5 \pm 2,5)$; рН від 7,0 до 7,4) і в рекомендованих умовах культивування. Здобуті культури змивалися суспензійними середовищами, індивідуальними для кожної родини бактерій. Вимірювання оптичної щільності початкової бактеріальної суспензії проводилося на «Densi-La-Meter» з доведенням концентрації відповідно до ступенів за McFarland за допомогою суспензійного середовища. Як негативний контроль вносилося 200 мкл поживного бульйону й суспензійного середовища. Кількість інокульованих планктонних клітин обчислювалася на фотометрі «Multiskan EX 355» (рис. 2.1) при довжині хвилі 540 нм і виражалася в умовних одиницях оптичної щільності.



Рисунок 2.1. Мутномер «Densi-La-Meter», фотометр «Multiskan EX 355», нативна та забарвлена генціанвіолетом біоплівка в чашках Петрі (якісний метод) та в планшетах (кількісний метод).

Після одержання бактеріальної суспензії з необхідною концентрацією мікроорганізмів у комірки планшета інокулювали по 200 мкл даної суспензії з відповідним поживним середовищем з подальшою інкубацією, згідно з умовами для кожної родини бактерій, у вологому контейнері під закритою кришкою планшета. Через 24 години інкубації проводили підрахунок кількості клітин на спектрофотометрі. З комірок панелі вилучали планктонні клітини і забарвлювали плівки. Для цього в лунку вносили 200 мкл фосфатного буфера й 15 мкл 1% спиртового розчину кристалвіолету й інкубували 45 хвилин при кімнатній температурі. Після триразового промивання фосфатним буфером у комірки для екстракції фарби з плівки додавали 250 мкл 96% етилового спирту й інкубували ще 45 хвилин при кімнатній температурі та вимірювали оптичну щільність цього розчину при довжині хвилі 540 нм [61]. При корегуванні оптичної щільності мікроорганізмів у початковій бактеріальній суспензії використовували суспензійне середовище. Як контроль використовували стерильні суспензійні поживні середовища без бактеріальної культури.

Визначення здатності до біоплівкоутворення за допомогою світлової, люмінесцентної і скануючої мікроскопії.

Для отримання біоплівки використовували стерильні полімерні чашки Петрі діаметром 40 мм. У кожну чашку поміщали по 4 мл бульйону Мюллера – Хінтона і вносили добову культуру ізолятів. Інкубували протягом 12–24 години при температурі +37°C. Після інкубації поживне середовище зливали, двічі промивали поверхню чашок розчином Хенкса (по 2 мл), фіксували 10% розчином формаліну на забуференній (рН = 7,2-7,4) дистильованій воді, висушували, фарбували 1% розчином кристалвіолету і промивали дистильованою водою.

Мікроскопія препаратів проводилася за допомогою мікроскопа «Granum» з масляною імерсією. Цифрові зображення бактерій і їхніх біоплівок отримували за допомогою відеокамери (відеоокуляра) (рис.2.2).

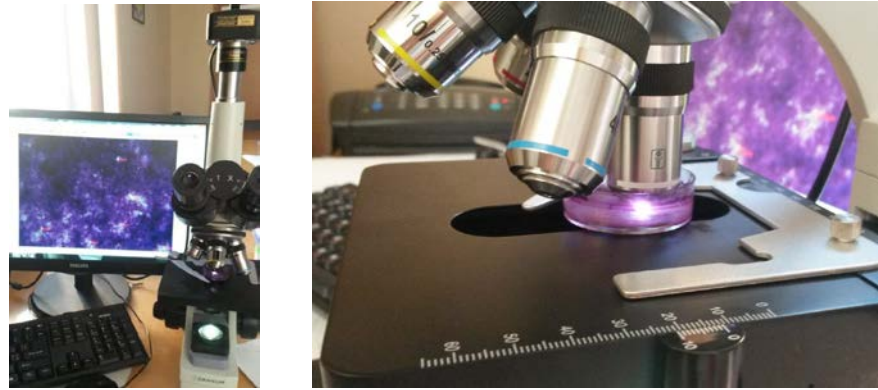


Рисунок 2.2. Мікроскопія біоплівки – мікроскоп «Granum» з масляною імерсією. Цифрові зображення бактерій і їхніх біоплівки – відеоокуляр «TourCam 3.1».

Для візуалізації морфологічної структури біоплівки у високій роздільній здатності використовували скануючу (кафедра експериментальної фізики фізичного факультету ХНУ імені В. Н. Каразіна) і люмінесцентну мікроскопію (для фарбування добових біоплівки використовували 200 мкл робочого розчину акридинового оранжевого (концентрація 2 мкг/мл). Облік проводили за допомогою люмінесцентного мікроскопа, збільшення 100x10x1,5 з використанням фільтрів, які забезпечують збудливе світло довжиною хвилі не більше 490 нм й емісію з довжиною хвилі 520 нм).



Рисунок 2.3. Мікроскопія біоплівки – конфокальний скануючий мікроскоп.

Вивчення адгезивної активності мікроорганізмів проводили за методикою В. І. Бриліс [5]. Для цього використовували еритроцити 0 групи крові резус-позитивної. До свіжої дефібринованої крові, розведеної фізіологічним розчином (рН=7,2) у співвідношенні (1:1), додавали суміш, що складалася з 20 мл 40% формаліну, попередньо адсорбованого активованим вугіллям, та 20 мл подвійного фосфатного буфера (рН=7,2). Усе ретельно перемішували й інкубували при температурі 37 °С упродовж 2 годин, обережно збовтуючи кожні 15 хвилин. Після інкубації еритроцити чотириразово відмивали фізіологічним розчином шляхом центрифугування при 1000 об/хв упродовж 10 хвилин. Після відмивання еритроцити ресуспензували в 400 мл буфера та ставили в холодильник при 4 °С на 48 годин. Надосадну рідину декантували, а осад ресуспензували в 400 мл буфера та знов ставили до холодильнику. Після повторного осідання з осаду еритроцитів готували 50% завись на буферному розчині, що містив 1% формаліну. Перед використанням еритроцити двічі відмивали 0,1 розчином фосфату натрію шляхом центрифугування при 1000 об./хв. На буфері готували завись еритроцитів, що мала концентрацію 10^8 клітин/мл. Для постановки дослідів до пробірок вносили по 0,5 мл зависі формалізованих еритроцитів та суспензію мікроорганізмів з концентрацією 10^9 КУО/мл.

Суміш інкубували при $t=37$ °С, час від часу збовтували, упродовж 30 хвилин. Після цього на знежиреному предметному склі готували мазок, який висушували при кімнатній температурі та фарбували за Романовським – Гімзою. Мікроорганізм вважали неадгезивним при $IAM \leq 1,75$; низькоадгезивним – при IAM від 1,76 до 2,5; середньоадгезивним – при IAM від 2,51 до 4,0; високоадгезивним – при IAM понад 4,0.

Чутливість ізолятів до антимікробних препаратів [42] вивчали за допомогою полістиролових планшетів одноразового використання [27], у лунки яких додавали антибактеріальні препарати порогових концентрацій, поживне середовище та бактеріальну суспензію, що розводили дистильованою водою за шкалою мутності McF, потім завись розводили в

10 000 разів. Здобутий інокулят (10^5 мікробних клітин в 1 мл) вносили по 0,05 мл у комірки планшета. Планшети закривали й інкубували при температурі 37°C протягом 18 год. Облік й оцінювання результатів проводили за допомогою автоматичного аналізатора «Multiskan EX» (тип 355) і «ВАСТ - програми».

2.2.2 Цитологічний метод.

Визначення апоптозу лімфоцитів [12]. Вимірювали відповідно до інструкцій виробника («BD Biosciences»). Оцінювання стадій апоптозу клітин проводили з одночасним унесенням до зразку маркерів Annexin V-FITC, CD45 PE і 7-AAD (7-аміно-актиноміцин D). Усі реагенти фірми «BD», США. До 50 мкл ресуспендованої в 1x розчині анексин V-зв'язуючого буфера цільної крові додавали 5 мкл Annexin V - FITC і по 10 мкл CD45 PE та 7-AAD, перемішували й інкубували протягом 15 хв за кімнатної температури ($20\text{-}25^{\circ}\text{C}$) у темряві. Вносили 400 мкл 1x розчину анексин V-зв'язуючого буфера в кожену пробу. Зразки аналізували на проточному цитофлуориметрі «FACS Calibur» («BD», США). Для мінімізації похибки в зразках аналізували 20000 CD45⁺ подій (CD45 позитивні клітини). Результати вимірювання оцінювали за допомогою програмного забезпечення «CELLQuestPro» («BD»). Аналіз на Dot plots отриманих даних дає змогу ідентифікувати чотири різних стани (тип, ступінь ушкодження) клітин: 1 – живі клітини (AnnexinV⁻7AAD⁻-клітини) – лівий нижній квадрант; 2 – клітини, що перебувають на початковій стадії апоптозу (AnnexinV⁺7AAD⁻-клітини) – лівий верхній квадрант; 3 – мертві клітини на стадії пізнього апоптозу / некрозу (AnnexinV⁺7AAD⁺) – правий верхній квадрант; 4 – мертві некротичні клітини (AnnexinV⁻7AAD⁺) – правий нижній квадрант. Вісі дот-блот – логарифм інтенсивності флуоресценції з мінімумом у точці « 10^0 » і максимумом у точці « 10^4 ». Статистичний аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення «Statistica» (StatSoft Inc., версія 9, 2009). Усі групи пройшли тест на нормальний розподіл. Для виявлення статистично значущих відмінностей

серед груп було використано методи множинних порівнянь, а саме one-way ANOVA.

2.2.3. Імунологічний метод [33].

Визначення субпопуляцій T- та B-лімфоцитів у периферичній крові проводили шляхом постановки реакції імунофлюоресценції (РІФ) з використанням моноклональних антитіл (МКАТ). Центрифугуванням у градієнті фікол-верографіну отримували суспензію лімфоцитів з периферичної крові. Розведену кров 1:2 із середовищем 199 (середовище для вирощування культур клітин) нашаровували на один об'єм градієнту, центрифугували при 400 g 25 хв., потім двічі відмивали клітини в середовищі 199. До 50 мкл клітинної суспензії додавали 50 мкл розведених МКАТ у фосфатному буфері з 0,1 % азотом натрію та 0,5 % сироваткового альбуміну. У контрольну пробірку замість МКАТ вносили 50 мкл фосфатного буфера. Зразки струшували, проводили інкубацію в холодильнику протягом 30 хв при 4 °С. Клітини один раз відмивали в 1 мл середовища 199 при 300 g 5 хв. Додавали 50 мкл люмінесцентної сироватки проти імуноглобулінів в експериментально підбраному розведенні (люмінесцентні сироватки розводили згідно з титром в ампулі). Перед дослідом люмінесцентні сироватки центрифугували при 12000–15000 об/хв протягом 20 хв. Струшування зразків проводили на вортексі й витримували в холодильнику при 4 °С 30 хв. Два рази відмивали в середовищі 199 (2 мл). Ресуспендували клітини в 0,1 мл середовища 199, осаджували на предметному склі 20 хв, відбирали середовище. Клітини висушували на холодному повітрі вентилятора, додавали краплину 50% гліцерину у фізіологічному розчині. Оцінювали відсоток клітин, що світяться, у люмінесцентному мікроскопі (об'єктив х90) при перегляді 200–300 клітин. Ідентифікацію лімфоцитів проводили методом фазового контрасту.

Фагоцитарну активність нейтрофілів досліджували за здатністю поглинати часточки полістирольного латексу: у пробірці змішували в рівних

об'ємах лейкоцитарну суспензію і часточки латексу й інкубували при 37 °С 30 хвилин для міграції нейтрофілів й адгезії часточок латексу, потім центрифугували 5 хвилин (1500 об/хв.) і з осаду виготовляли мазки, які висушували з фіксацією етанолом 15 хв., фарбували за Романовським – Гімзою 30 хв. (рН 7,2 - 7,4), промивали в проточній воді. Облік результатів проводили за допомогою імерсійного мікроскопу зі збільшенням 10×90 з визначенням показників активності фагоцитозу: фагоцитарного індексу (ФІ) та фагоцитарного числа (ФЧ).

Для визначення нейтрофільних пасток [17] ставили реакцію з використанням клітинної суспензії нейтрофілів периферичної крові, виділених на градієнтних розчинах фікол-верографіну, потім суспензію наносили на скло, висушували й фіксували 96% етиловим спиртом з додатковою фіксацією клітин на склі в 10% забуференому формаліні: ядерна речовина забарвлювалася в червоно-помаранчевий колір. Визначення вмісту нейтрофільних пасток здійснювали в такий спосіб: зависть нейтрофілів отримували з гепаринізованої крові, яку з метою осадження еритроцитів відстоювали в стерильній пробірці при температурі +37 °С протягом 30 хвилин. Нейтрофіли виділяли з лейкоцитарної суспензії на подвійному градієнті щільності стерильних розчинів фікол-верографіну. Щільність верхнього шару градієнта становила 1,075-1,077, а нижнього – 1,093-1,095. Обсяг кожного градієнта дорівнював 2 мл. Через 40 хвилин центрифугування при 1500 об/хв між градієнтами з'являлося кільце гранулоцитів з чистотою 98–100% (рис.2.4).



Рисунок 2.4. Виділення кільця нейтрофілів на градієнтних розчинах фікол-верографіну.

Кільце нейтрофілів акуратно збирали, переносили в стерильні центрифужні пробірки, тричі відмивали від градієнта стерильним фізіологічним розчином хлориду натрію центрифугуванням при 1500 об/хв протягом 10 хв і доводили до концентрації 5×10^6 клітин/мл.

Отриману суспензію клітин інкубували при температурі $+37^\circ\text{C}$ протягом 30 хв за наявності часточок латексу. Для фарбування нейтрофільних пасток використовували 200 мкл робочого розчину акридинового помаранчевого (концентрація 2 мкг/мл). Облік проводили за допомогою люмінесцентного мікроскопа «Люмам» при збільшенні $100 \times 10 \times 1,5$, використовуючи фільтри, що забезпечують збудливе світло з довжиною хвилі не більше 490 нм й емісію з довжиною хвилі 520 нм. Унаслідок застосування цього способу нейтрофільні пастки були представлені у вигляді тонких яскравих ниток, які в 3 рази перевершували діаметр нейтрофіла, а активатор мав яскраво-помаранчевий колір. Такий спосіб забарвлення дав змогу кількісно оцінити вміст пасток. Проводився підрахунок 100 структур різних груп, визначався відсотковий уміст кожної морфологічної одиниці. Цей спосіб забарвлення дав можливість оцінити ефективність фагоцитозу й нейтрофільної позаклітинної пастки. Для цього розраховували такі показники:

1. ФІ – кількість нейтрофілів із сегментованим ядром, що містять антиген у цитоплазмі, на 100 підрахованих клітин.
2. ФЧ – кількість антигенів у 100 підрахованих клітинах із сегментованим ядром у перерахунку на 1 клітину.
3. Уміст антигенів в NETs – кількість антигенів у 100 підрахованих пастках в перерахунку на 1 клітину.

Рівні цитокінів (IL-1 β , IL-6, TNF- α), IgA, IgM, IgG та компоненти комплементу визначено за допомогою ІФА (комерційні набори для імуноферментного аналізу (BioSource, Бельгія) і (Bender Medsystems, Австрія).

Статистичне оброблення результатів досліджень [31, 46, 50].

Використовували програми «Statistica 7», Microsoft Excel 2010.

РОЗДІЛ 3

ЕТІОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЗБУДНИКІВ МІКРОБНО - ЗАПАЛЬНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ НИРОК І СЕЧОВИХ ШЛЯХІВ У ДІТЕЙ ЗАЛЕЖНО ВІД ВІКУ ТА СТАТІ

За останні роки частота запальних процесів сечової системи в дітей зросла у 2 рази. У структурі ниркової патології мікробно-запальні захворювання сечової системи становлять 76–80%. Вивчення етіологічної структури пієлонефритів й ускладнень, резистентності виділеної мікрофлори до антимікробних препаратів необхідно для розроблення схем раціональної антибіотикотерапії, використання яких дає можливість оптимізувати результати лікування хворих дітей і затримати зростання резистентності до антимікробних препаратів.

Останнім часом спостерігається посилення ролі родини *Enterobacteriaceae* як етіологічного чинника у виникненні пієлонефритів. На особливу увагу заслуговують полімікробні септичні процеси, які в 10–15% випадків закінчуються летально. Це пов'язано зі взаємним індукуванням факторів патогенності асоціантів і переважанням полірезистентних до хіміотерапевтичних препаратів культур. Відомо, що більшість бактерій існують у природних екосистемах не як вільно плаваючі планктонні клітини, а у вигляді специфічно організованих і прикріплених до субстратів біоплівки, у яких бактеріальні клітини з'єднані складним міжклітинним зв'язком, що здійснює експресію генів у різних частках біоплівки, унаслідок чого популяцію бактерій у біоплівці можливо розглядати як функціональний аналог багатоклітинного організму.

Утворення біоплівки є однією з основних стратегій виживання бактерій у зовнішньому середовищі. Протягом останніх десятиріч накопичилася достатня кількість експериментальних даних, які свідчать про складну організацію мікробних спільнот у природних умовах проживання. На зміну

концепції єдиного мікробного збудника інфекційних захворювань прийшли теорії асоціації мікробних спільнот – біоплівок [53]. Великою проблемою є формування щільних біоплівок патогенами, які є факторами патогенності й колонізації, що утворюються на поверхні виробів медичного призначення та в організмі людини. Незважаючи на велику кількість робіт з дослідження функціонування біоплівок мікроорганізмів, на сьогодні залишається практично не вивченим питання утворення біоплівок збудниками пієлонефритів у дітей різних вікових категорій.

На сьогодні проблема бактеріальних інфекцій нирок і сечових шляхів у дітей, незважаючи на широкий спектр антибактеріальних препаратів, усе ще залишається актуальною. Найпоширенішим захворюванням є пієлонефрит, що являє собою мікробно-запальне захворювання нирок з переважним вогнищевим інфекційно-запальним ушкодженням тубулоінтерстиційної тканини, пов'язаним з інфекцією сечових шляхів, що потрапляє в нирки гематогенним, лімфогенним чи висхідним шляхом [138]. За даними багатьох дослідників, етіологічним фактором гострих і хронічних пієлонефритів здебільшого є монофлора; провідними мікроорганізмами – збудниками пієлонефритів у дітей є *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* [10, 146].

Попри успіхи в лікуванні пієлонефритів у дітей, багато питань етіотропної терапії залишаються невирішеними. Зокрема, однією з проблем останніх років є зниження ефективності антибактеріальної терапії хворих на пієлонефрит, пов'язане з ростом питомої ваги бактеріальних уропатогенів з високою резистентністю до широкого кола антибіотиків, що вимагає розроблення рекомендацій щодо їх застосування з урахуванням регіональних особливостей видової структури збудників захворювання. Неухильне зростання частоти мікробно-запальних захворювань нирок і сечових шляхів (МЗЗ НСШ), у тому числі й пієлонефритів, схильність до рецидивуючого перебігу з розвитком незворотних ушкоджень паренхіми нирок і

формуванням хронічного перебігу вимагають пильної уваги до цієї проблеми. Неоднозначні дані про структуру збудників пієлонефритів у дітей ускладнюють своєчасну постановку діагнозу пієлонефриту в дітей [140]. Отже, успішна антибактеріальна терапія пієлонефриту неможлива без ретельного вивчення складу чинників, що сприяють розвитку й прогресуванню захворювання, та оптимізації підходів до діагностики й лікування пієлонефриту в дітей. Тому вивчення етіологічних особливостей пієлонефритів у дітей залежно від вікової категорії та статі є вкрай необхідним.

3.1 Характеристика етіологічних чинників мікробно-запальних захворювань нирок і сечових шляхів у дітей залежно від віку та статі

Мікробіологічному обстеженню підлягало 100 дітей з МЗЗ НСШ, з них 52% випадків хворих дітей на гостру форму пієлонефриту (ГП), 31% – діти, хворі на хронічну форму (ХП), та 17% – діти з іншою мікробно-запальною патологією, а саме: інфекцією сечовивідних шляхів, дисметаболічною нефропатією, нейрогенною дисфункцією сечового міхура, вадами розвитку нирок, дисплазією нирок, токсико-метаболічною нефропатією, нейро-м'язовою дисфункцією сечового міхура тощо. Розподіл дітей, хворих на МЗЗ НСШ, за статтю наведено на рис. 3.1.

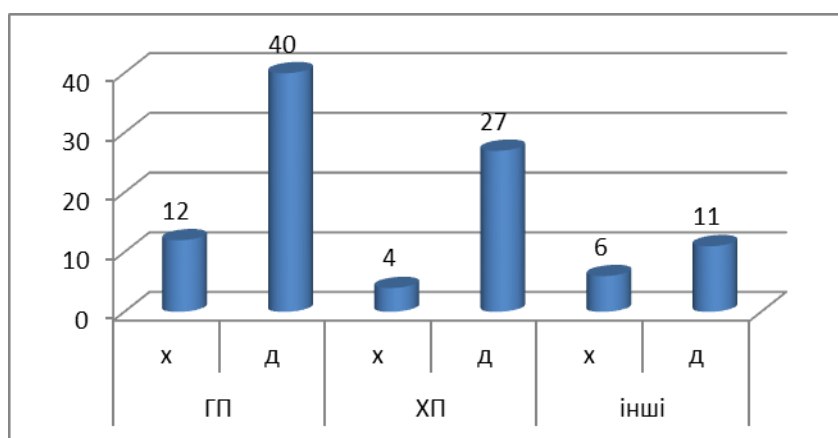


Рисунок 3.1. Розподіл дітей, хворих на мікробно-запальні захворювання нирок та сечових шляхів, за статтю.

Установлено, що найчастіше діти хворіли на мікробно-запальні захворювання нирок та сечових шляхів у ранньому віці (вікова категорія від 0 до 3 років) – 46 випадків, причому 26% – на гострий пієлонефрит, 11% – на хронічний пієлонефрит та 9% випадків – на інші мікробно-запальні захворювання нирок та сечових шляхів (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Співвідношення випадків мікробно-запальних захворювань нирок та сечових шляхів у дітей залежно від вікової категорії

Категорія	0–3 роки		4–7 років		8–18 років		Усього
	n=46		n=19		n=35		
Стать	х	д	х	д	х	д	
Гострий пієлонефрит	8 %	18 %	3 %	7 %	1 %	15 %	52 %
Хронічний пієлонефрит	1 %	10 %	1 %	5 %	2 %	12 %	31 %
Інше	4 %	5 %	-	3 %	2 %	3 %	17 %
Усього	13 %	33 %	4 %	15 %	5 %	30 %	100 %

Ці захворювання найчастіше виявлялися в дівчат: у віковій категорії від 0 до 3 років – 33% (серед них – ГП – 18%, ХП – 10%), дещо менше у віковій категорії від 8 до 18 років – 30% (серед них – ГП -15%, ХП – 12%). У віковій категорії від 4 до 7 років частота виникнення МЗЗ СВС становила 19 % (з них: у дівчаток – 15%, у хлопчиків – 4%), кількість випадків ГП – 10% (7% – у дівчаток, 3% – у хлопчиків), а ХП – 6% (5% – у дівчаток, 1% – у хлопчиків).

Середній вік дівчаток з ГП категорії від 0 до 3 років становив 1 рік 9 місяців, хлопчиків – 11 місяців; у дітей, хворих на ХП, відповідний показник у дівчаток був 1 рік 8 місяців, у хлопчиків – 8 місяців, тобто середній вік хлопчиків був нижчим за середній вік дівчаток, хворих як на гострий, так й на хронічний пієлонефрит. Для вікової категорії від 4 до 7 років – середній вік хворих на ГП дівчаток допівнював 4 р. 1 м., а хлопчиків – 5 р.; відповідно дітей, хворих на ХП: дівчаток – 5 р. 2 м., хлопчиків – 4 р. У віковій категорії від 8 до 18 років середній вік хворих на ГП дівчаток був

12 р. 8 м., а хлопчиків – 11 р.; відповідно дітей, хворих на ХП – дівчаток – 12 р. 9 м., хлопчиків – 8 р. (рис. 3.2).

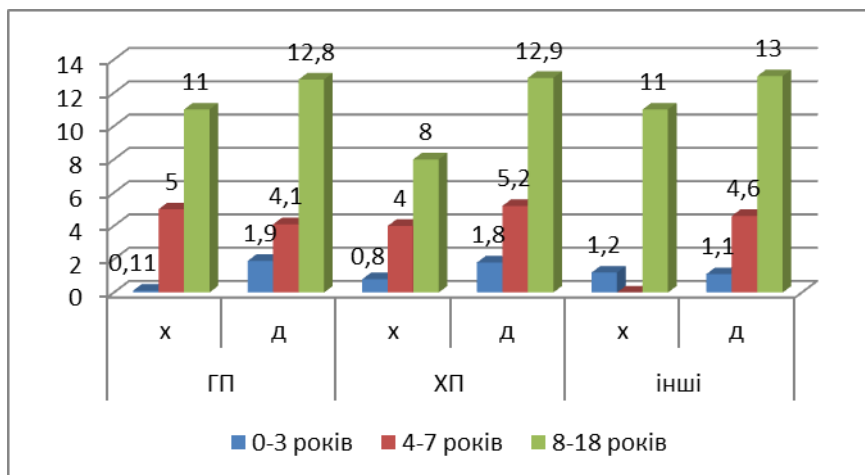


Рисунок 3.2. Середній вік дітей, хворих на мікробно-запальні захворювання нирок та сечових шляхів.

У результаті проведеного аналізу було виявлено 149 штамів мікроорганізмів (у дітей з ГП – 82 штами; у дітей з ХП – 49 штамів, у дітей з іншими МЗЗ НСШ – 18 штамів) та встановлено (рис. 3.3), що основними збудниками МЗЗ НСШ у дітей були *Enterococcus faecalis* (35,6%), *Escherichia coli* (37,6%), *Klebsiella pneumoniae* (18,1%), *Proteus spp* (8,7%).

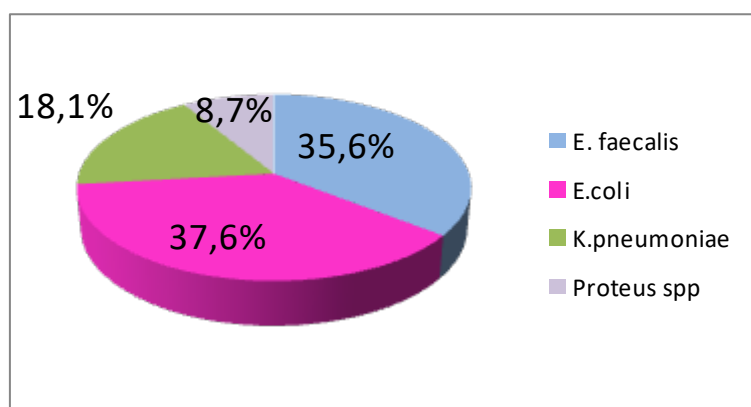


Рисунок 3.3. Етіологічний склад збудників МЗЗ НСШ у дітей.

Найбільший відсоток випадків МЗЗ НСШ, що зумовлені *Escherichia coli* (16,8%), було виявлено в дітей вікової категорії від 0 до 3 років (рис. 3.4), у дітей вікової категорії від 8 до 18 років найчастіше МЗЗ НСШ викликали *Escherichia coli* та *Enterococcus faecalis* (по 15,4%).

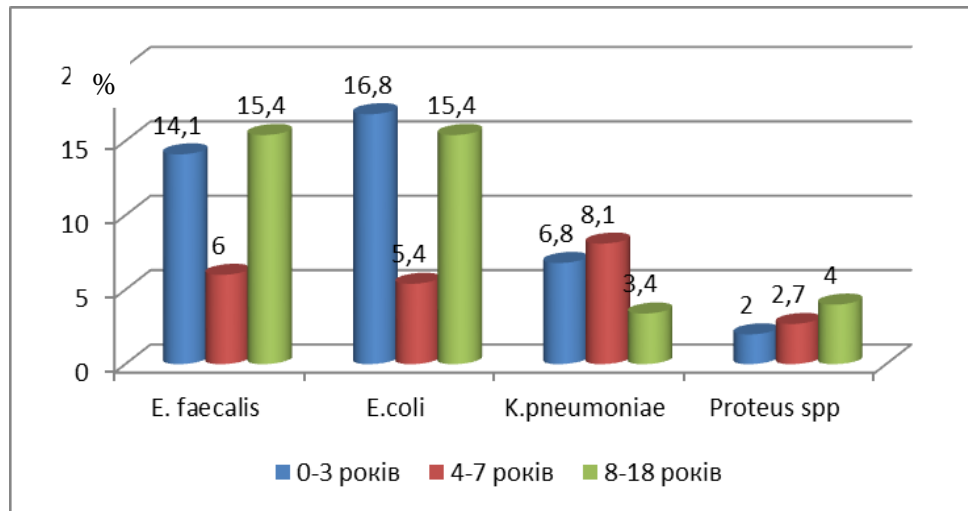


Рисунок 3.4. Частота виявлення збудників МЗЗ НСШ у дітей залежно від віку.

Найчастіше збудниками МЗЗ НСШ, зокрема інфекції сечовивідних шляхів (рис. 3.5), виступали *Escherichia coli* у дітей вікової категорії від 0 до 3 років та *Enterococcus faecalis* у дітей вікової категорії від 8 до 18 років (22,2%).

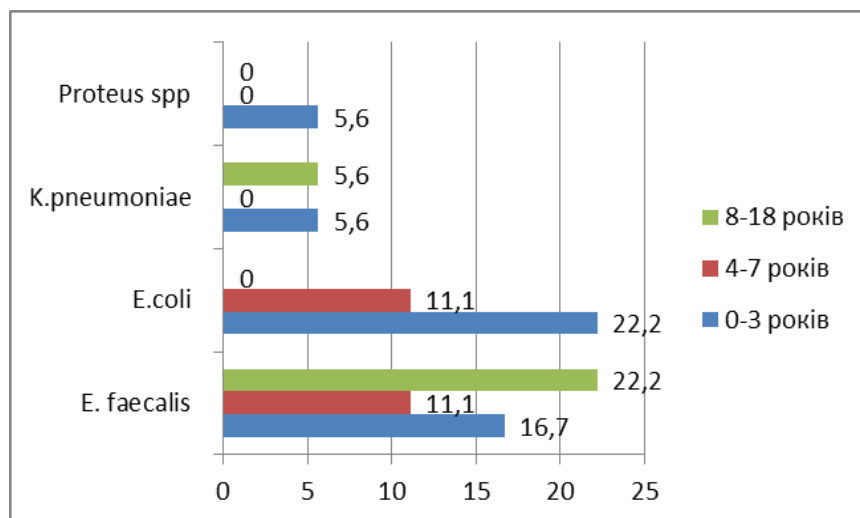


Рисунок 3.5. Частота виявлення збудників МЗЗ НСШ (інфекція сечовивідних шляхів) у дітей залежно від віку.

Основний відсоток МЗЗ НСШ становили діти з піелонефритами, тому в подальшому було проведено дослідження з мікроорганізмами, збудниками піелонефритів у дітей. Установлено (рис. 3.6), що найчастіше ГП викликали *Escherichia coli* у дітей вікової категорії від 0 до 3 років та від 8 до 18 років, а також *Enterococcus faecalis* у дітей вікової категорії від 8 до 18 років (17,1%).

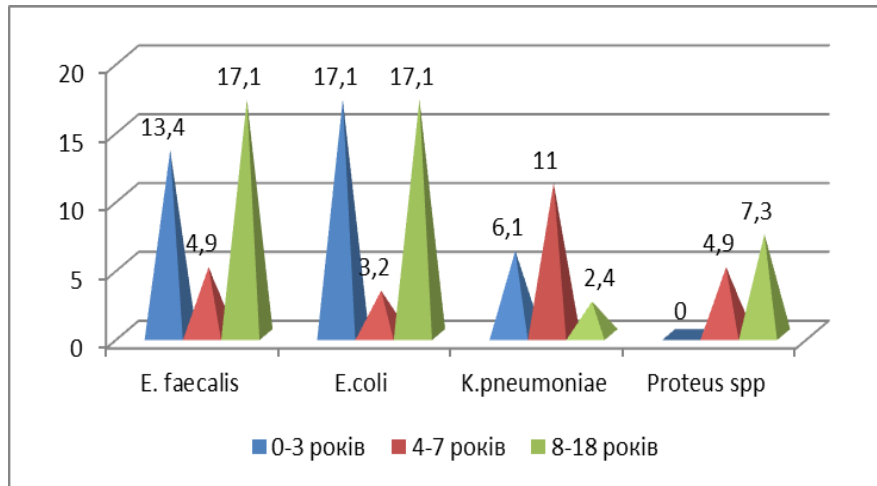


Рисунок 3.6. Частота виявлення збудників ГП у дітей залежно від віку.

Аналіз даних щодо встановлення основних патогенів (рис. 3.7), які зумовлюють виникнення ХП, виявив, що найчастіше ХП викликають *Enterococcus faecalis* й *Escherichia coli* (по 14,3%) у дітей вікової категорії від 0 до 3 років та *E. coli* (18,4%) у дітей вікової категорії від 8 до 18 років. У дітей вікової категорії від 4 до 7 років *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* викликали ХП з однаковою частотою (6,1%).

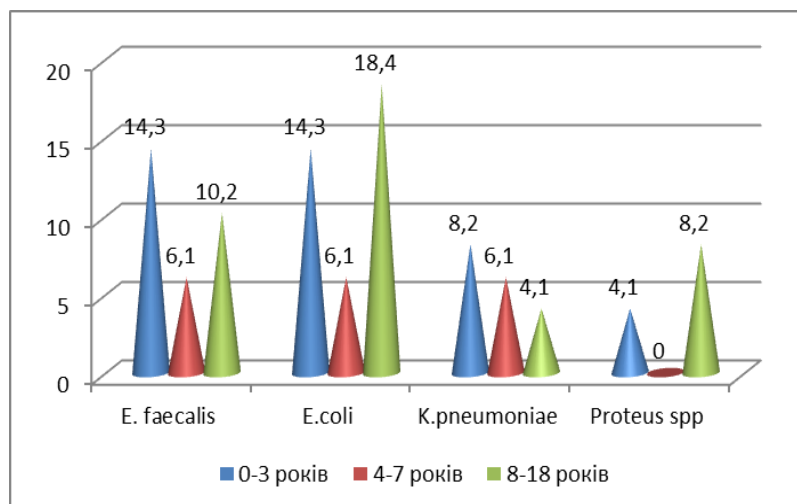


Рисунок 3.7. Частота виявлення збудників ХП у дітей залежно від віку.

Проведений аналіз показав, що частіше на МЗЗ НСШ хворіли дівчатка, причому випадки ГП у 3,3 раза частіші, ніж у хлопчиків; випадки ХП у дівчаток частіші, ніж у хлопчиків, у 6,8 раза, що пов'язано з анатомо-фізіологічними особливостями дівчат [40].

3.2. Характеристика збудників пієлонефритів на фоні гідронефрозів у дітей залежно від віку та статі

Уроджені обструктивні аномалії сечових шляхів у дітей залишаються актуальною проблемою дитячої нефрології [32, 89]. Найбільш поширеним серед них є гідронефроз, який нерідко ускладнюється інфекцією, що спричиняє виникнення гострого пієлонефриту і, як наслідок – хронізацію інфекційного процесу з частими випадками рецидивів. Відомо, що недостатня ефективність проведеного лікування бактеріального пієлонефриту певною мірою пояснюється наявністю в мікроорганізмів механізмів захисту від зовнішніх факторів, забезпечує виражену селективну дію на збудників пієлонефриту і сприяє відбору резистентних ізолятів. Тому було визначено провідні збудники пієлонефриту в дітей унаслідок гідронефрозу (рис.3.8).

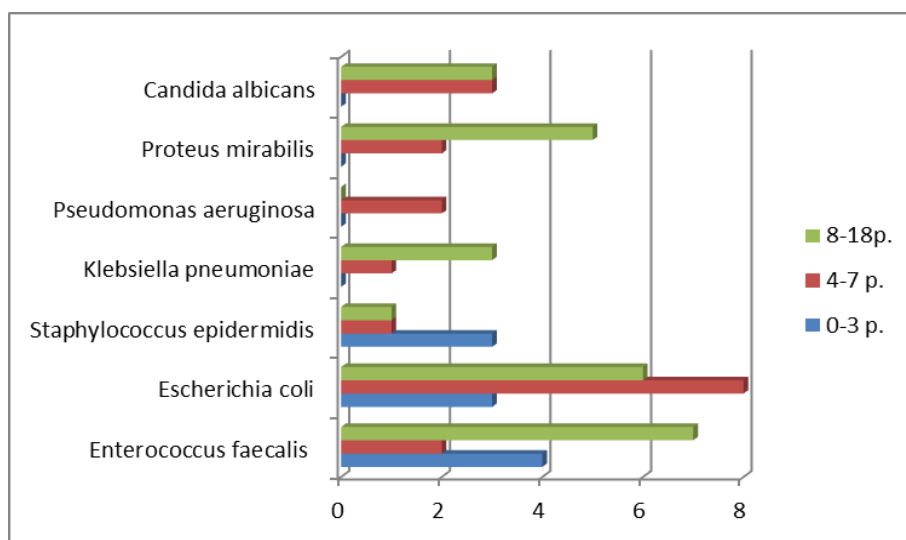


Рисунок 3.8. Провідні збудники пієлонефриту в дітей унаслідок гідронефрозу.

Установлено, що в дітей з уродженим гідронефрозом, ускладненим пієлонефритом, вікової категорії від 0 до 3 років збудниками пієлонефритів були *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* та *Escherichia coli*, причому в 75% випадків спостерігалася моноінфекція.

У дітей з пієлонефритом унаслідок вродженого гідронефрозу вікової категорії від 4 до 7 років у всіх випадках було виявлено збудники пієлонефритів в асоціаціях. У виникненні пієлонефритів як ускладнення вродженого гідронефрозу підвищилася питома вага родини *Enterobacteriaceae* (57,9%): 42,1% – *Escherichia coli* та по 5,3% – *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*.

Грампозитивні коки висівали в 15,8% випадків: 10,5% *Enterococcus faecalis* й 5,3% *Staphylococcus epidermidis*. Такий відсоток ізолятів виявлено і в *Candida albicans*. Привертає увагу поява *Pseudomonas aeruginosa*, питома вага якої становить 10,5% (рис.3.9).

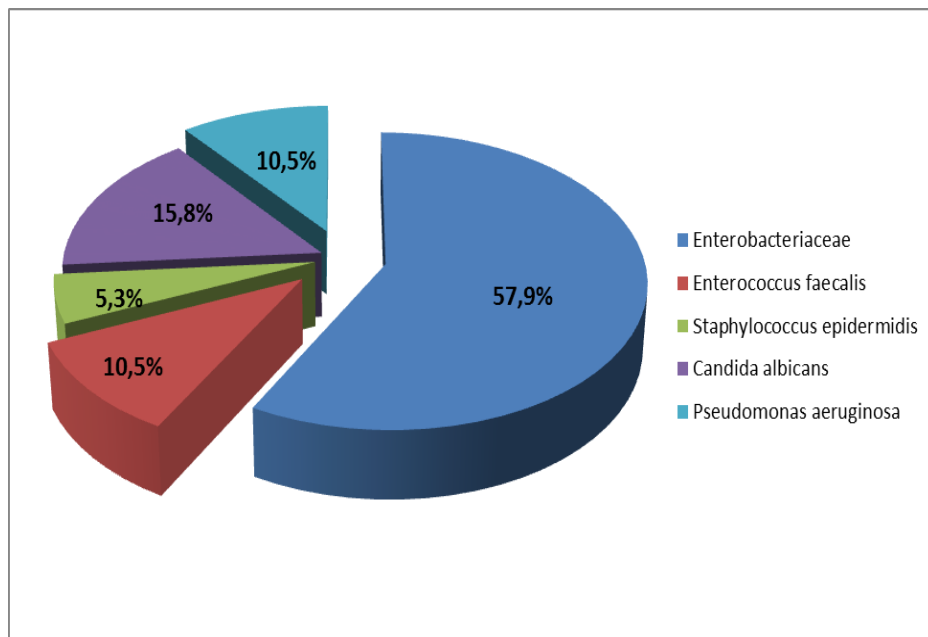


Рисунок 3.9. Питома вага провідних збудників пієлонефриту унаслідок гідронефрозу в дітей вікової категорії від 4 до 7 років.

У дітей вікової категорії від 8 до 18 років найбільш частими збудниками пієлонефритів унаслідок уродженого гідронефрозу були

представники родини *Enterobacteriaceae* (56%), які виявлялися в асоціаціях з *Enterococcus faecalis* та *Candida albicans* (рис.3.10).

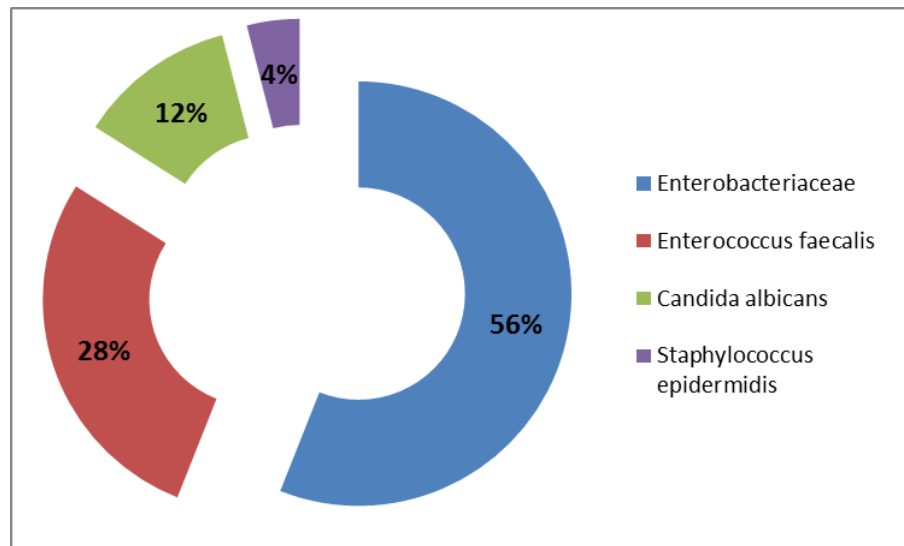


Рисунок 3.10. Питома вага провідних збудників пієлонефриту внаслідок гідронефрозу в дітей вікової категорії від 8 до 18 років.

Висновки до розділу 3.

1. Найчастіше діти хворіли на МЗЗ НСШ у ранньому віці (від 0 до 3 років), 26% – на гострий пієлонефрит, 11% – на хронічний пієлонефрит та 9% – на інші МЗЗ НСШ.
2. МЗЗ НСШ найчастіше фіксувалися серед дівчат вікової категорії від 0 до 3 років (33%).
3. Установлено, що основними збудниками МЗЗ НСШ у дітей були *Enterococcus faecalis* (35,6%), *E.coli* (37,6%), *Klebsiella pneumoniae* (18,1%), *Proteus spp.* (8,7%).
4. Установлено, що найчастіше ГП викликали *Escherichia coli* в дітей вікової категорії від 0 до 3 років та від 8 до 18 років, а *Enterococcus faecalis* – у дітей вікової категорії від 8 до 18 років (17,1%); ХП спричиняли *Enterococcus faecalis* й *Escherichia coli* (14,3%) у дітей вікової категорії від 0 до 3 років та *E.coli* (18,4%) – у дітей вікової категорії від 8 до 18 років.

5. У дітей з пієлонефритом на фоні вродженого гідронефрозу вікової категорії від 0 до 3 років виявлялася моноінфекція, зумовлена переважно *Staphylococcus epidermidis*, а в дітей з уродженим гідронефрозом, що ускладнений пієлонефритом, від 4 до 18 років збудниками захворювання були переважно представники родини *Enterobacteriaceae* у вигляді мікст-інфекції.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Мішина М.М. Марченко І.А. Макєєва Н.І. Головачова В.О. Етіологічна характеристика збудників мікробно – запальних захворювань нирок і сечових шляхів у дітей залежно від віку та статі. *Український журнал медицини, біології та спорту*. 2019. Т.4, №2(18). С.81-86.
2. Mishyna M., Marchenko I., Makeeva N., Mozgova Yu., Mishyn Yu. Etiologic Structure of Pyelonephritis in Children and Ability of Causative Agents to Form Biofilms. *International Conference on Virology, Bacteriology & Infectious Diseases*. November 26-28, 2018 Holiday Inn Rome, Aurelia, Italy. P.27.

РОЗДІЛ 4

ОСОБЛИВОСТІ ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВОК ПРОВІДНИМИ ЗБУДНИКАМИ ПІЄЛОНЕФРИТІВ У ДІТЕЙ ЗАЛЕЖНО ВІД КЛІНІЧНОЇ ФОРМИ ПЕРЕБІГУ ЗАХВОРЮВАННЯ

На сьогодні відомо, що бактерії здатні колонізувати й формувати біоплівки на будь-яких медичних субстратах [82, 106]. Це серйозна проблема в медичній практиці, оскільки при пієлонефритах у дітей, особливо на фоні вродженого гідронефрозу, широко використовуються різні інвазивні матеріали. Формування біоплівок в осередку запалення призводить до хронізації процесу та виникнення рецидивів [133].

Поширення мікроорганізмів у природі зі здатністю до колонізації різних екологічних ніш насамперед пов'язано з особливостями метаболізму, здатністю здійснювати міжклітинну комунікацію і формувати складні спільноти – біоплівки [22, 103]. Наразі відомо, що реалізація та передача факторів патогенності найбільш ефективно відбувається в біоплівках, які формуються на межі поділу фаз у вигляді складних за хімічним і видовим складом тривимірних структур як на різних субстратах, так і в макроорганізмі [82, 130]. У складі бактеріальних біоплівок є два основні компоненти – це біомаса бактеріальних клітин й екзополіцукридний матрикс, що рівномірно покриває прикріплені до поверхні субстрату клітини [13, 77]. Структурна організація бактерій у біоплівках забезпечується за рахунок синтезованого клітинами екзополіцукридного матриксу, що складається з полісахаридів, протеїнів, екзоферментів, нуклеїнових кислот. На сьогодні здатність бактерії до утворення щільних біоплівок відносять до факторів патогенності мікроорганізмів. Мікробні біоплівки є рухливими спільнотами, які захищають бактерії від зовнішніх впливів в організмі хворого й утворюються на поверхнях медичного призначення. З біоплівковими

інфекціями пов'язано багато хронічних захворювань – інфекції сечовивідних шляхів, у тому числі і пієлонефрити [89, 105].

Відомо, що планктонні бактерії можуть досягати нирок висхідним шляхом і здатні прикріплюватися до уроепітелію і ниркових сосочків у ниркових збірних системах. Бактеріальна адгезія є основним моментом у колонізації тканинних поверхонь організму-господаря [4]. Адгезія мікроорганізмів до уроепітелію дає їм можливість протистояти видаленню потоком сечі. Бактеріальна адгезія сприяє не тільки колонізації, але й інвазії мікроорганізмів, формуванню біоплівок та ушкодженню клітин господаря з розвитком пієлонефриту [88, 107, 131].

Біоплівки на поверхні уроепітелія легше підлягають ерадикації антимікробними агентами порівняно з біоплівками, утвореними на чужорідних об'єктах у сечовидільній системі. Чужорідні тіла в сечових шляхах, такі як катетери, стенти, дренажі, камені, стають осередком інфекції для організму, що призводить до розвитку ускладнених інфекцій сечовидільної системи [133]. Періодичне вивільнення планктонних форм бактерій з біоплівок у сечу є джерелом підтримання хронічного інфекційного і запального процесу в нирках.

Вивчення біоплівок на сьогодні становить великий інтерес дослідників насамперед тому, що цей спосіб існування бактерій створює проблеми в медичній практиці. Біоплівки є одним з патогенетичних чинників формування хронічних і рецидивуючих форм пієлонефритів [144]. Бактерії, що живуть у біоплівках, істотно відрізняються за своїми біологічними властивостями від планктонних форм. Найбільшу увагу привертає стійкість бактерій у біоплівці до антибіотиків і до атаки факторів імунної системи. Природа цієї стійкості наразі інтенсивно досліджується. Здатність бактерій формувати біоплівки на сьогодні вважаються фактором їхньої патогенності.

Таким чином, здатність біоплівкових бактерій виживати в присутності антибактеріальних препаратів у концентраціях, що набагато перевищують стандартні терапевтичні норми, створює труднощі при лікуванні

пієлонефритів у дітей, оскільки це обумовлює продукування полірезистентних планктонних клітин і, як наслідок – виникнення хронічної форми пієлонефриту й часте рецидивування [75].

Тому вивчення здатності до формування біоплівки провідними збудниками пієлонефритів у дітей за допомогою світлової, люмінесцентної та скануючої мікроскопії на сьогодні є дуже актуальним.

4.1 Особливості формування біоплівки збудниками гострого й хронічного пієлонефритів у дітей

Першим і найбільш важливим етапом у формуванні біоплівки є здатність бактерій до седиментації або адгезії. Вивчення факторів, що впливають на процес адгезії, дає змогу розробити профілактичні заходи, спрямовані на пригнічення ранніх етапів виникнення пієлонефритів у дітей. Адгезія як багатофакторний процес залежить від великої кількості умов з боку як бактерій, так і макроорганізму [83].

Установлення взаємодії між патогеном і клітинами організму дитини внаслідок бактеріальної адгезії є визначальною ланкою в ході виникнення та перебігу інфекційного процесу. Надійне прикріплення з подальшим розмноженням збудників пієлонефриту в дітей призводить до утворення щільних мікробних біоплівок, що забезпечує збудникам більш вигідні умови існування, які пов'язані з протидією механічному видаленню бактерій з макроорганізму і високою стійкістю до дії бактерицидних агентів зовнішнього середовища [86, 142]. Тому визначення адгезивних властивостей провідних збудників пієлонефриту в дітей є необхідним.

Відомо, що адгезія мікроорганізмів є початковим етапом будь-якого інфекційного процесу. Патогенетичні механізми пієлонефриту в дітей унаслідок уродженого гідронефрозу, зумовленого *Enterococcus faecalis*, пов'язані з особливостями збудника, який використовує декілька механізмів

для подолання протимікробного захисту макроорганізму: адгезію, інвазію, продукування ферментів патогенності.

Так, в *Enterococcus faecalis* механізм адгезії реалізується за допомогою поверхневих структур і факторів адгезії: полісахариди, білок ESP, тейхоєві та ліпотейхоєві кислоти, адгезивні молекули матриксу, агрегуюча субстанція [88]. Молекулярні механізми адгезії універсальні для грамнегативних паличок. Зокрема, для *Escherichia coli* та *Pseudomonas aeruginosa* спільними є глікопротеїни клітинної стінки, пілі, фімбрії.

Для *Escherichia coli* адгезія здійснюється завдяки пілям I типу, фімбріям, що несуть специфічний білок, адгезин FimH, здатний розпізнавати структуру рецепторів епітеліальних тканин і здійснювати з ними взаємодію. Найважливішими факторами адгезії *Pseudomonas aeruginosa* є пілі, фімбрії, білки джгутиків – флагелярні протеїни, ліпід А, який ініціює прикріплення ліпополіцукриду до поверхневих молекулах рецепторів клітин [131, 143].

При визначенні адгезивної властивості ізолятів при первинному пієлонефриті в дітей раннього віку було встановлено, що всі ізоляти мали високу адгезивну активність, але індекс адгезивної активності мікроорганізмів (ІАМ), збудників пієлонефриту в дітей з гострою та хронічною формами, відрізнявся в різних вікових категоріях хворих дітей.

Ізоляти *Escherichia coli*, вилучені при ХПН у дітей, проявляли високу активність: ІАМ становив 5,6 порівняно з аналогічним показником у дітей раннього віку. У дітей з ГПН ІАМ був 5,1 порівняно з іншими ізолятами: ІАМ для *Enterococcus faecalis* – 4,3 у дітей з ХПН та 3,6 – у дітей з ГПН; ІАМ для *Klebsiella pneumoniae* – 4,4 у дітей з ХПН та 4,1 – у дітей з ГПН; ІАМ для *Proteus mirabilis* – 5,2 у дітей з ХПН (рис.4.1).

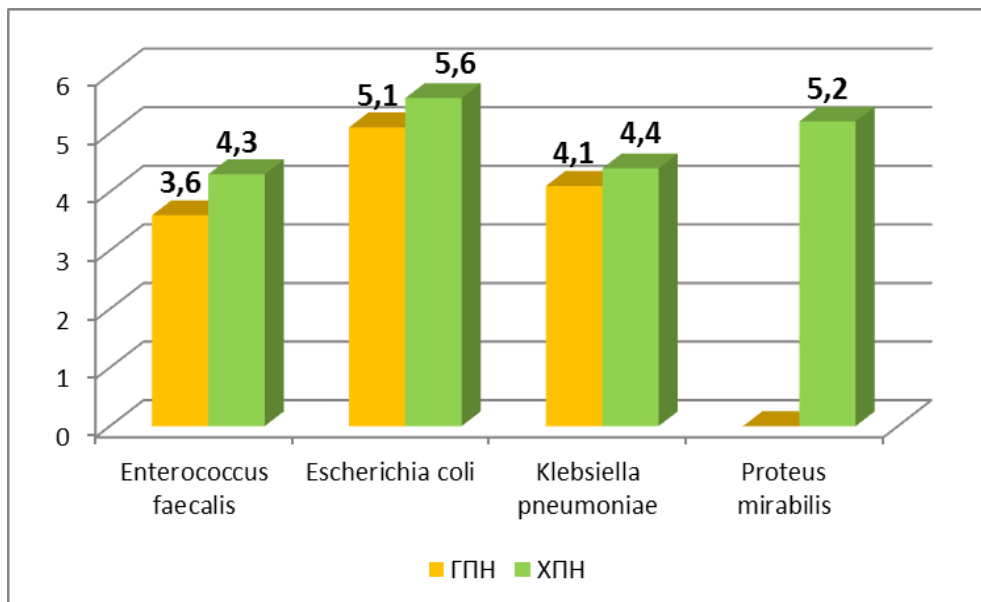


Рисунок 4.1. Адгезивна активність ізолятів – збудників первинного пієлонефриту гострої та хронічної формами в дітей раннього віку.

При виявленні здатності до формування біоплівки бактеріями – збудниками пієлонефритів у дітей раннього віку за допомогою світлової, люмінесцентної і скануючої мікроскопії було встановлено, що всі ізоляти утворювали біоплівки (рис.4.2 - 4.3).

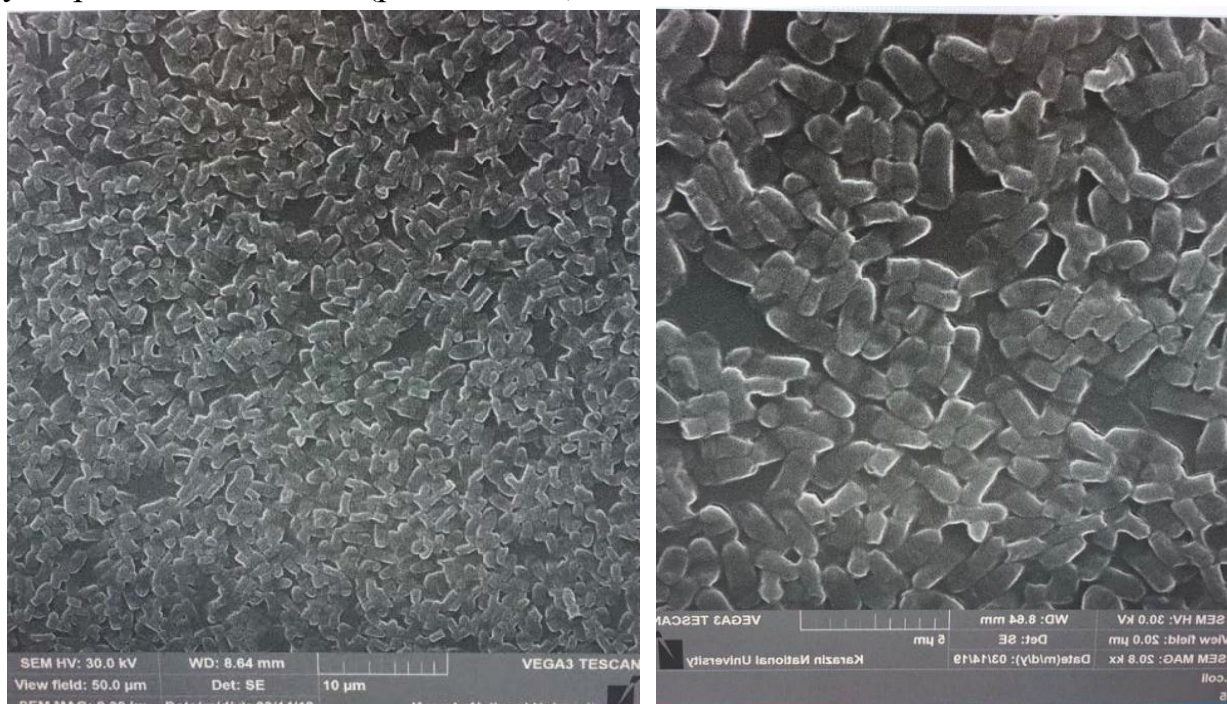


Рисунок 4.2. Формування біоплівки ізолятами *E. coli*; скануюча мікроскопія.

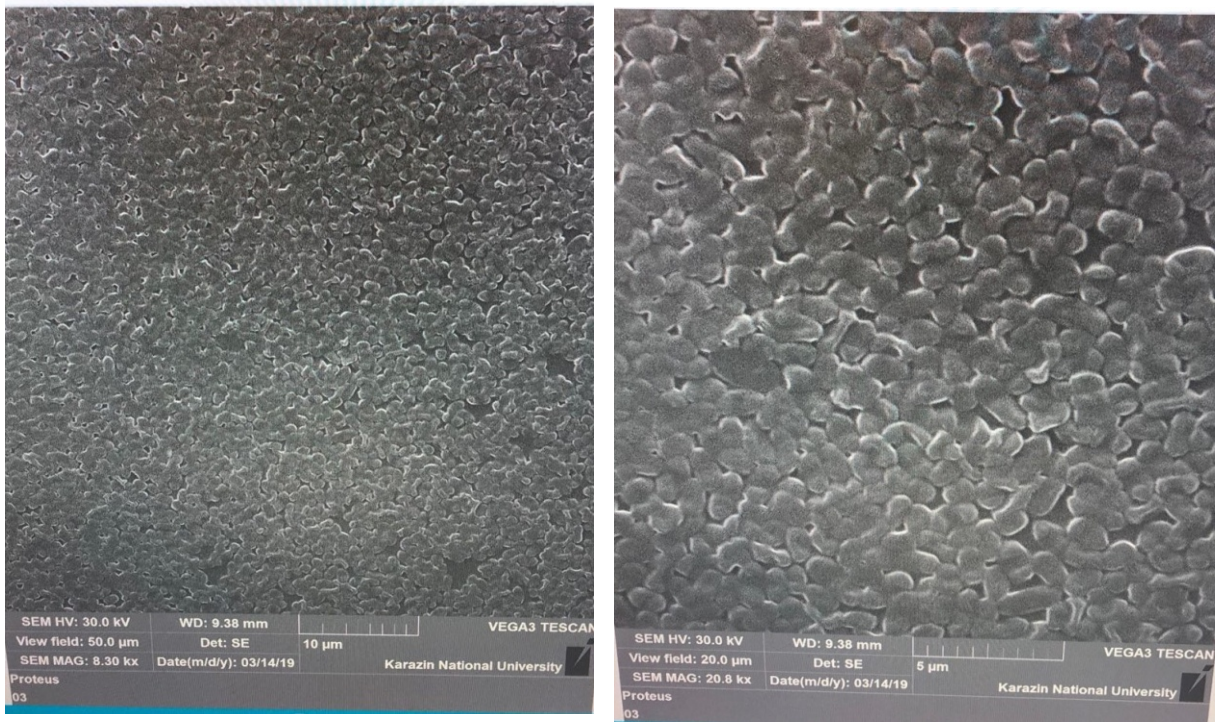


Рисунок 4.3. Формування біоплівки ізолятами *Proteus mirabilis*; скануюча мікроскопія.

На першій стадії відбувалася адгезія планктонних форм бактерій, на другому етапі – формування міжклітинної матриксу, на третьому – утворення біоплівки. При дослідженні препаратів ізолятів з використанням скануючої і світлової мікроскопії спостерігали впорядковане розташування бактерій у вигляді окремих структур або невеликого скупчення бактеріальних клітин, об'єднаних матриксом (рис.4.4).

Установлено особливості при формуванні біоплівки ізолятами: по-перше, при хронічному пієлонефриті щільність біоплівки була вищою за щільність аналогічних при гострій формі пієлонефриту в дітей раннього віку, по-друге, щільність біоплівки грамположитивних ізолятів *Staphylococcus epidermidis* та *Enterococcus faecalis* була значно вищою за щільність грамнегативних ізолятів родини *Enterobacteriaceae*, зокрема *Escherichia coli*, як при гострій, так і при хронічній формі пієлонефриту, хоч адгезивні властивості грамнегативних ізолятів були вищими за аналогічні грамположитивних бактерій (рис.4.4).

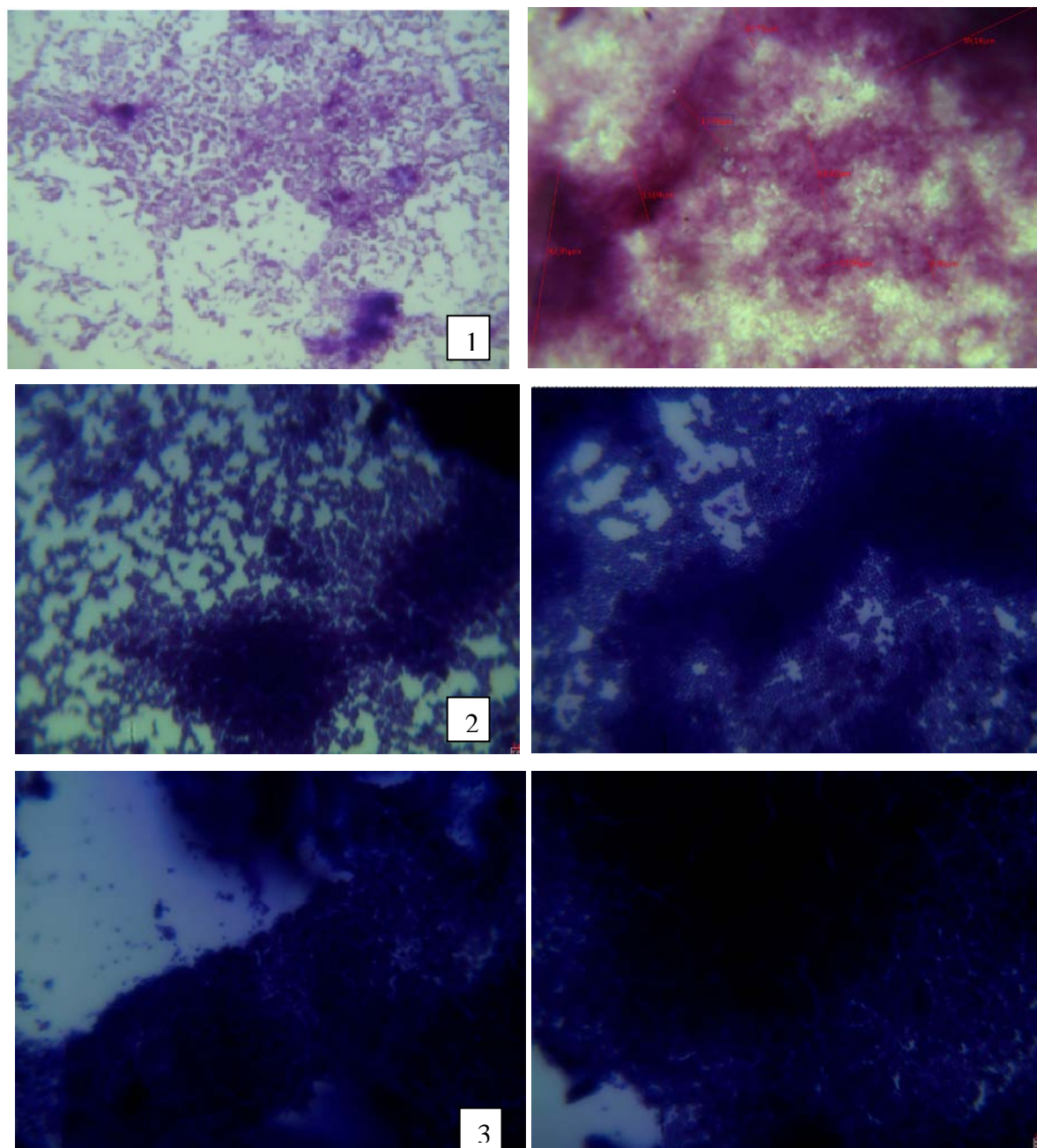


Рисунок 4.4. Формування біоплівки ізолятами: 1 – при гострій формі пієлонефриту, зумовленого *Escherichia coli*; 2 – при хронічній формі пієлонефриту, зумовленого *Staphylococcus epidermidis*; 3 – *Enterococcus faecalis*. Світлова мікроскопія.

При дослідженні здатності до формування біоплівки ізолятів *Pseudomonas aeruginosa* за допомогою скануючої мікроскопії встановлено, що адгезія окремих бактеріальних клітин відбувається з подальшим

формуванням конгломератів, оточених матриксом та утворенням біоплівки (рис.4.5).

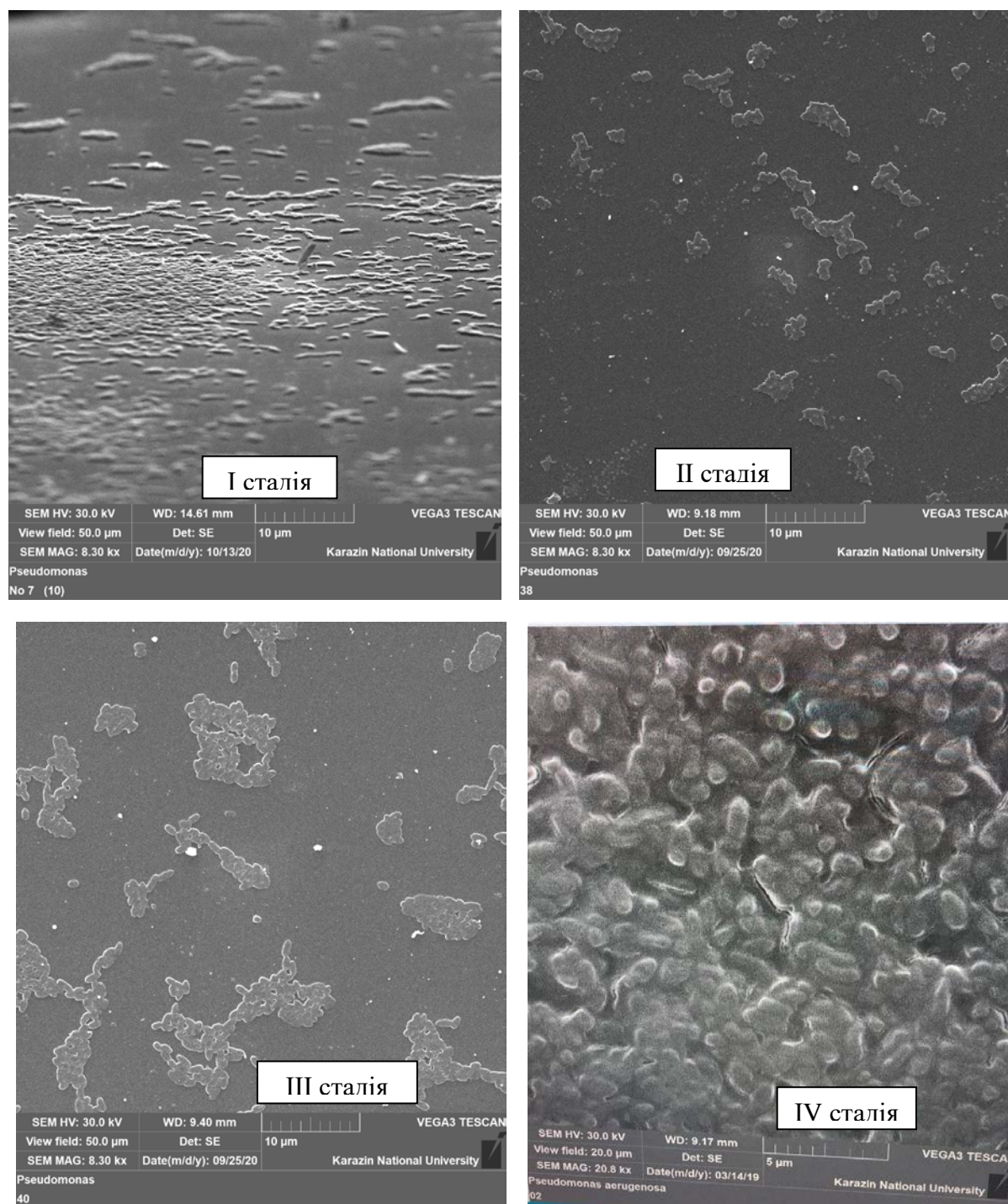


Рисунок 4.5. Формування біоплівки *Pseudomonas aeruginosa*: I стадія – адгезія ізолятів; II стадія – фіксація; III стадія – коагрегація; IV стадія – кластеризація.

Під плівкою проглядалися бактеріальні клітини, розташовані у вигляді щільних подовжених паличок. Установлено, що добові біоплівки ізолятів *Pseudomonas aeruginosa* мають щільну структуру у вигляді гелю.

За допомогою люмінесцентної мікроскопії виявлено ущільнені ділянки біоплівки, у якій зазначено скупчення клітин з високою люмінесценцією (рис.4.6).

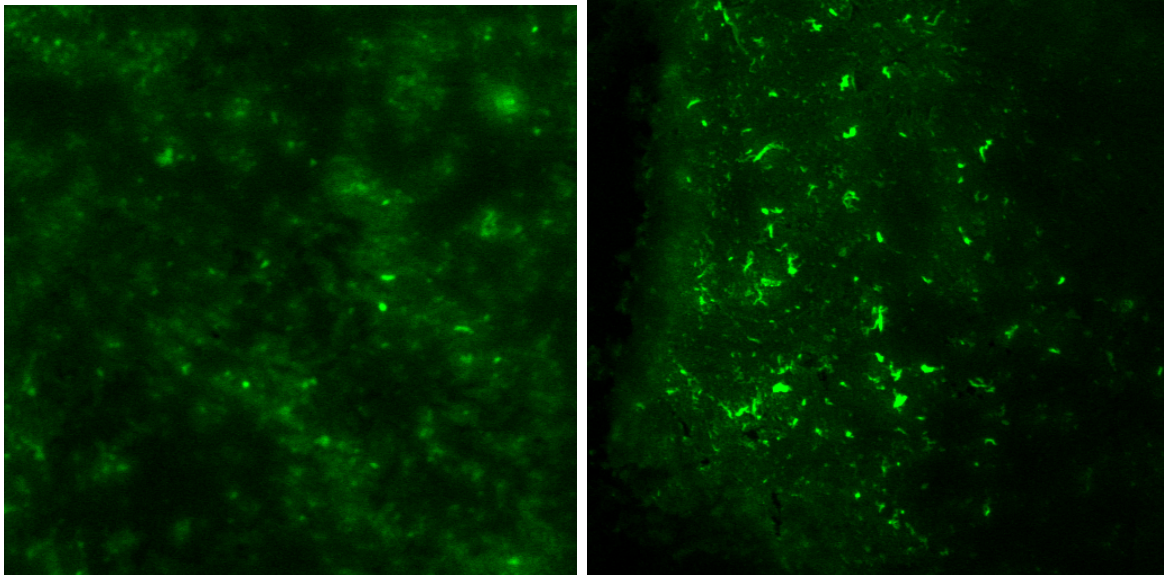


Рисунок 4.6. Здатність до утворення біоплівок *Pseudomonas aeruginosa*.

При дослідженні добових біоплівок ізолятів *Klebsiella pneumoniae* методами скануючої і люмінесцентної мікроскопії (рис.4.7) виявлено, що біоплівки *Klebsiella pneumoniae* покриті щільним матриксом і пронизані численними каналами у вигляді отворів, крізь які всередину біоплівки потрапляють поживні речовини. Екзополімерний матрикс біоплівок підтримує сприятливі умови для фізіологічного існування бактерій у біоплівках, є неоднорідним за морфологічною структурою. У сформованій біоплівці *Klebsiella pneumoniae* зафіксовано щільні осередки, через які відбувається дисемінація планктонних клітин. Показник адгезивної активності ізолятів *Klebsiella pneumoniae* є зниженим порівняно з аналогічним *Escherichia coli*, що можна пояснити відсутністю джгутиків, які

в *Escherichia coli* забезпечують хемотаксис і разом з адгезинами – прикріплення до поверхонь.

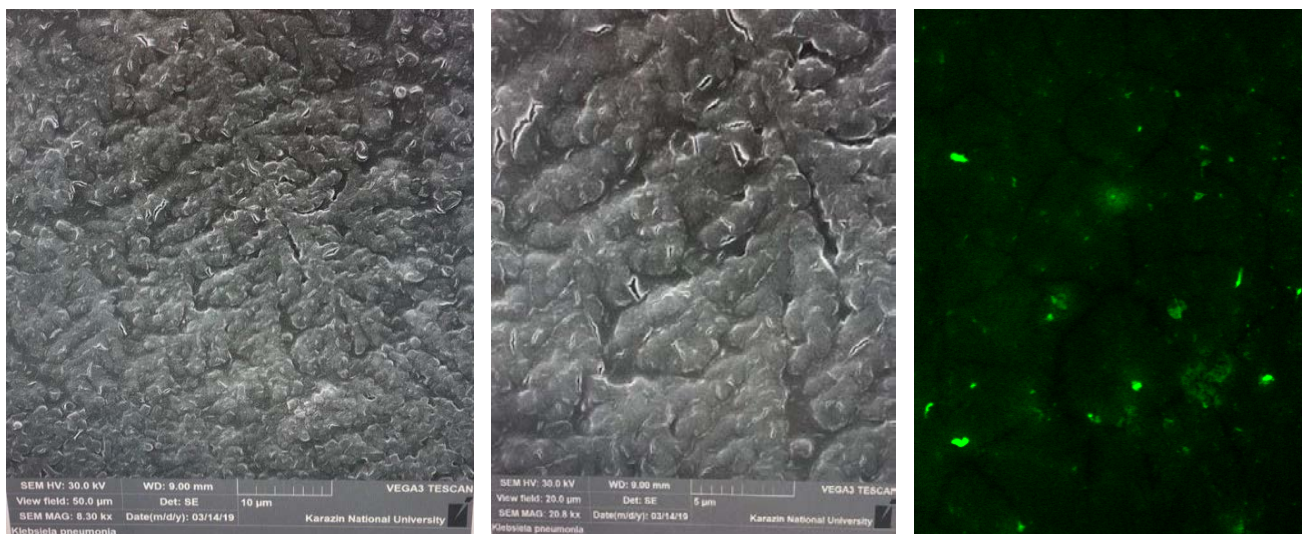


Рисунок 4.7. Формування біоплівки ізолятами *K.pneumoniae*.

При дослідженні морфологічних особливостей формування біоплівки ізолятами *Enterococcus faecalis* з використанням скануючої і люмінесцентної мікроскопії виявлено, що бактеріальні клітини щільно упаковано й об'єднано міжклітинним матриксом, під яким видно бактерії кулястої форми (рис. 4.8).

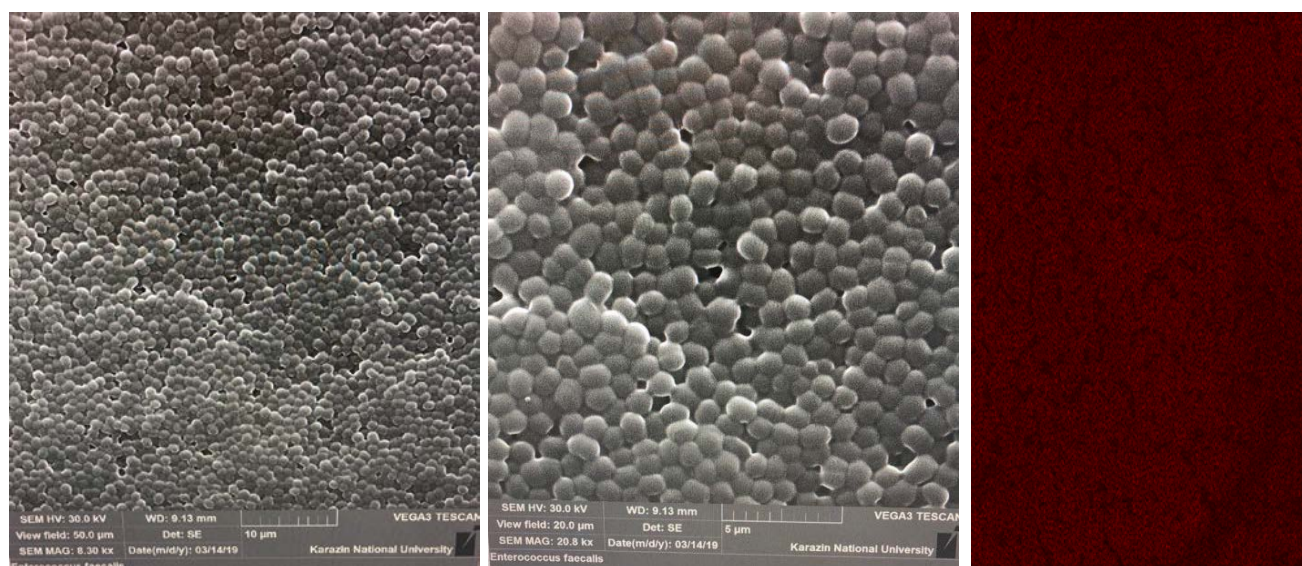


Рисунок 4.8. Формування біоплівки ізолятами *E. faecalis*.

Таким чином, на поверхні конгломератів, що складаються з бактеріальних клітин, формуються біоплівки, природа яких залежить від виду бактерій. Формуванням біоплівок пояснюються особливості перебігу та виникнення хронічної форми й рецидивів пієлонефриту в дітей.

Отже, під час дослідження динаміки процесу формування біоплівок провідними штамами пієлонефритів у дітей раннього віку було встановлено, що при гострій формі ізоляти здатні утворювати біоплівки за класичними стадіями: адгезія, прикріплення (рис.4.9), формування моношару й мікроколоній, стадія зрілої біоплівки (рис.4.10) та стадія руйнування (дисперсія).

Було виявлено такі особливості: формування зрілої біоплівки збудників гострих пієлонефритів у дітей молодшого віку відбувалося повільніше, на відміну від утворення первинної біоплівки збудниками хронічної форми пієлонефритів дітей; щільність біоплівки була меншою за щільність добових біоплівок у дітей з хронічною формою.

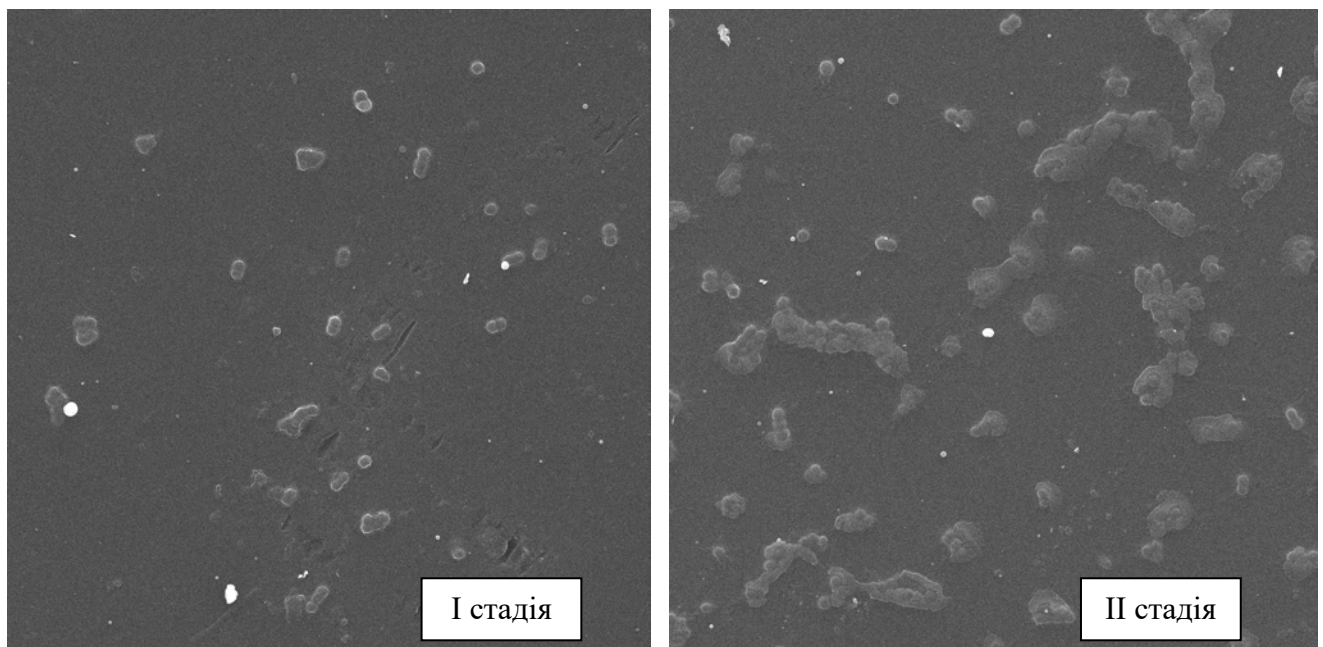


Рисунок 4.9. I стадія (адгезії) формування біоплівок *Enterococcus faecalis* у дітей раннього віку (1), II стадія – фіксація (2). Комфокальна мікроскопія.

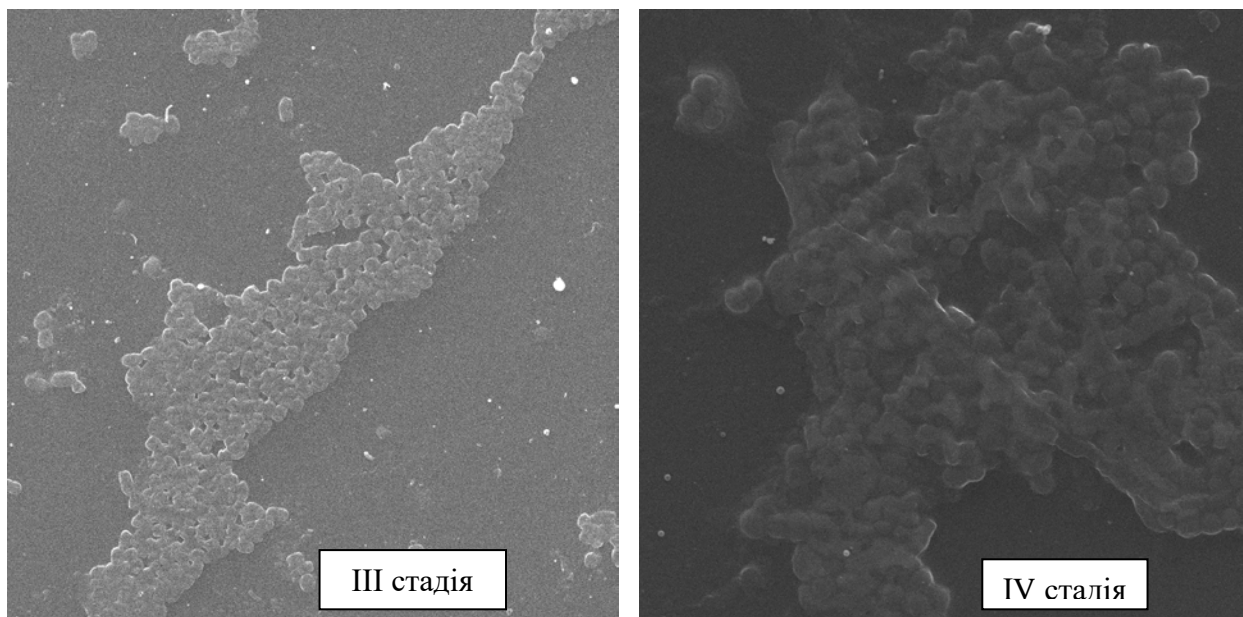


Рисунок 4.10. III стадія – формування моношару й мікроколоній (3), IV стадія – формування первинної біоплівки (4). Комфокальна мікроскопія.

При визначенні оптичної щільності добових біоплівок було виявлено, що всі ізоляти гострої форми пієлонефриту в дітей раннього віку утворювали біоплівки з такою щільністю: *Escherichia coli* – $2,34 \pm 0,14$ од.ощ.; *Klebsiella pneumoniae* – $3,21 \pm 0,27$ од.ощ.; *Enterococcus faecalis* – $2,19 \pm 0,21$ од.ощ. з активним продукуванням планктонних клітин (рис.4.11).

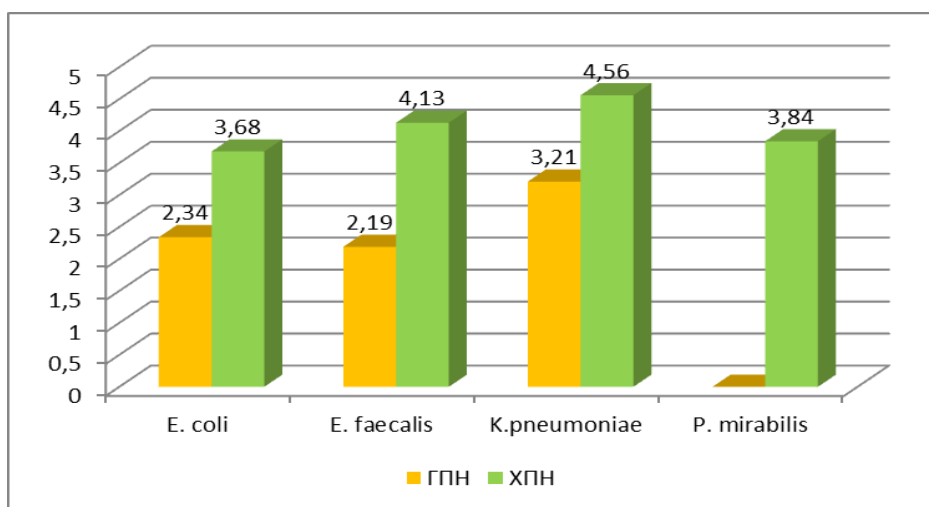


Рисунок 4.11. Щільність добових біоплівок провідних ізолятів у дітей молодшої вікової категорії з пієлонефритом.

Ізоляти хронічної форми пієлонефриту формували щільні біоплівки: *Proteus mirabilis* – $3,84 \pm 0,21$ од.ощ.; *Escherichia coli* – $3,68 \pm 0,19$ од.ощ.; *Klebsiella pneumoniae* – $4,56 \pm 0,28$ од.ощ.; *Enterococcus faecalis* – $4,13 \pm 0,26$ од.ощ.

Таким чином, виявлено здатність патогенів до формування щільних біоплівок, особливо при хронічному пієлонефриті, що є перешкодою для застосування протимікробної терапії.

Тому лікування пієлонефриту залишається однією з найактуальніших проблем дитячої нефрології на сучасному етапі, а пошук оптимальних препаратів для лікування пієлонефриту є постійно необхідним.

Дискутуються питання з підбору оптимальних схем протирецидивної терапії та тривалості їх проведення. Вирішення зазначених проблем дасть змогу обґрунтувати нові підходи до вибору оптимальної тактики лікування та профілактики пієлонефритів у дітей.

4.2. Особливості формування біоплівок збудниками гострого і хронічного пієлонефритів у дітей середньої та старшої вікової категорії

При визначенні адгезивної властивості ізолятів при первинному пієлонефриті в дітей середнього та старшого віку з гострою та хронічною формами було встановлено, що всі ізоляти мали високу адгезивну активність: ізоляти *Escherichia coli*, що були вилучені при пієлонефритах у дітей з гострою формою, проявляли найвищу активність у дітей старшої вікової категорії, де ІАМ становив 10,3, та в дітей середнього віку (ІАМ для *Escherichia coli* дорівнював 8,9, що вище в 1,8 та в 1,6 раза за аналогічний показник у дітей з ХПН раннього віку). У дітей середньої вікової категорії найбільш високоадгезивними штамами при ГПН були *Escherichia coli* – 7,8; *Klebsiella pneumoniae* – 6,7; *Proteus mirabilis* – 7,5 та *Enterococcus faecalis* – 6,5, а при ХПН – *Escherichia coli* – 8,9; *Klebsiella pneumoniae* – 8,1 та *Enterococcus faecalis* – 7,3 (рис.4.12).

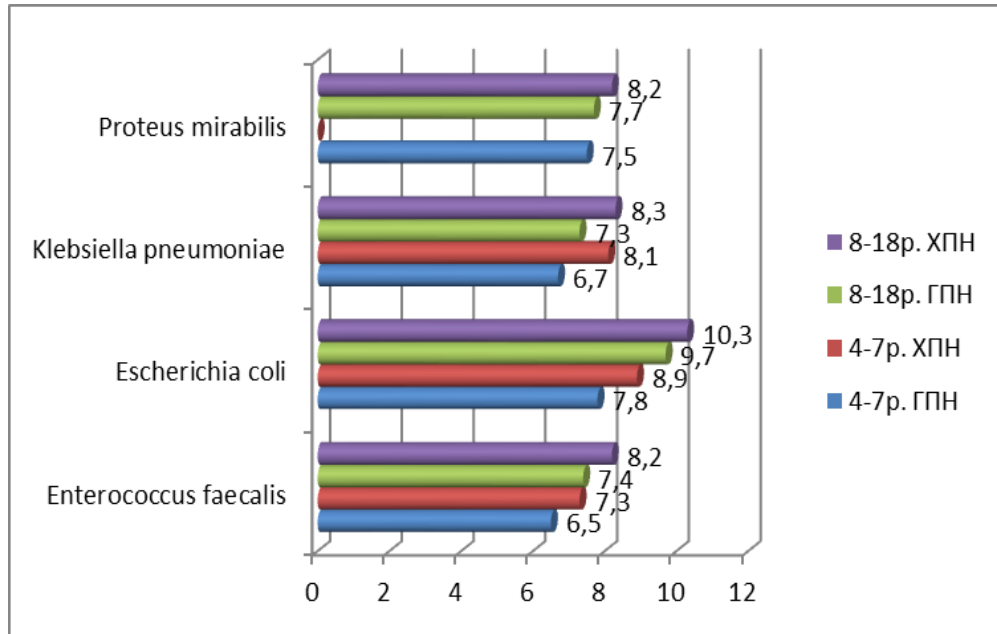


Рисунок 4.12. Адгезивна активність ізолятів – збудників первинного пієлонефриту в дітей середнього та старшого віку.

Кількість еритроцитів, залучених в адгезивний процес, для штамів *Escherichia coli* становила 88,3% та 97,4% у дітей з ГПН середнього й старшого віку та з ХПН – 92,3% та 93,7% відповідно. Для *Klebsiella pneumoniae* – 84,0% у дітей середнього віку та 88,5% – у дітей старшого віку з ГПН; 90,3% у дітей середнього віку та 91,5% – у дітей старшого віку з ХПН. Для ізолятів *Enterococcus faecalis* коефіцієнт участі еритроцитів в адгезії був таким: 82,0% і 86,4% у дітей з ГПН середнього та старшого віку відповідно; 86,3% у дітей середнього віку й 90,4% – у дітей старшого віку з ХПН. У штамів, виділених у дітей старшого віку з ХПН, показник СПА всіх ізолятів був достовірно вищим, ніж в ізолятів, виділених у дітей раннього віку.

Дослідження структурно-функціональних особливостей формування біоплівок провідними збудниками первинного пієлонефриту в дітей середнього та старшого віку дало змогу виявити низку особливостей: на першому етапі формування біоплівок ізолятами, що виділені в дітей як з ГПН, так і з ХПН, адгезія бактерій родини *Enterobacteriaceae* до субстрату

відбувалася швидше за кокоподібні бактерії, що можна пояснити високим індексом адгезії, тоді як час другого етапу – фіксації – сповільнюється для грамнегативних паличок і прискорюється для грампозитивних коків, що можна пояснити наявністю в складі клітинної стінки тейхоєвих та ліпотейхоєвих кислот: необоротна фіксація ізолятів *Enterococcus faecalis* відбувається протягом 10–12 годин у дітей з ГПН середнього віку та протягом 9–10 годин – у дітей старшого віку. У дітей з ХПН цей процес триває 8–9 годин для середнього віку та 4–6 годин – для старшого віку (рис. 4.13) Для *Escherichia coli* процес необоротної фіксації триває 14–16 годин у дітей з ГПН середнього віку та 12–14 годин – у дітей старшого віку, а в дітей з ХПН середнього й старшого віку час необоротної фіксації *Escherichia coli* становить 10–12 і 8–9 годин відповідно. Було виявлено відокремлені структури, що склалися з декількох клітин з формуванням тонкого покриву.

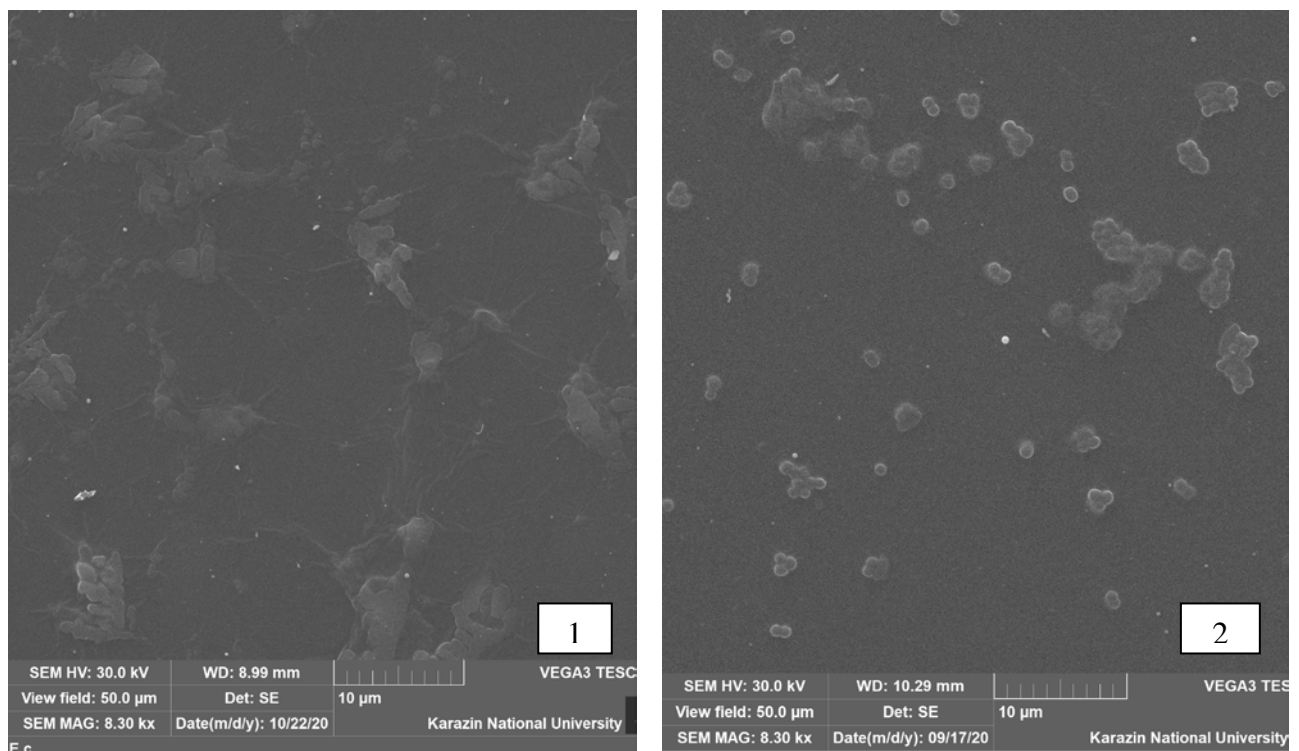


Рисунок 4.13. Стадія необоротної фіксації формування первинних біоплівок *Escherichia coli* (1) та *Enterococcus faecalis* (2), збудників ХПН пієлонефриту в дітей старшого віку (скануюча конфокальна мікроскопія).

Що стосується особливостей утворення біоплівок провідними збудниками первинного пієлонефриту в дітей старшої вікової категорії з ХПН, то було встановлено, що весь цикл утворення первинних і вторинних біоплівок грамнегативними бактеріями триває 28–36 годин, а грампозитивними – 26–34 години; у дітей старшої вікової категорії з ГПН – 32–38 годин, а грампозитивними – 30–36 години.

Найповільнішим є завершальний етап формування вторинної біоплівки, що триває в грампозитивних бактерій 8–10 годин (рис.4.14), а в грамнегативних – 12–13 годин (рис. 4.15) при ХПН у дітей середньої та старшої вікової категорії та 14–16 годин і 18–20 годин відповідно при ГПН у дітей старшого та середнього віку.

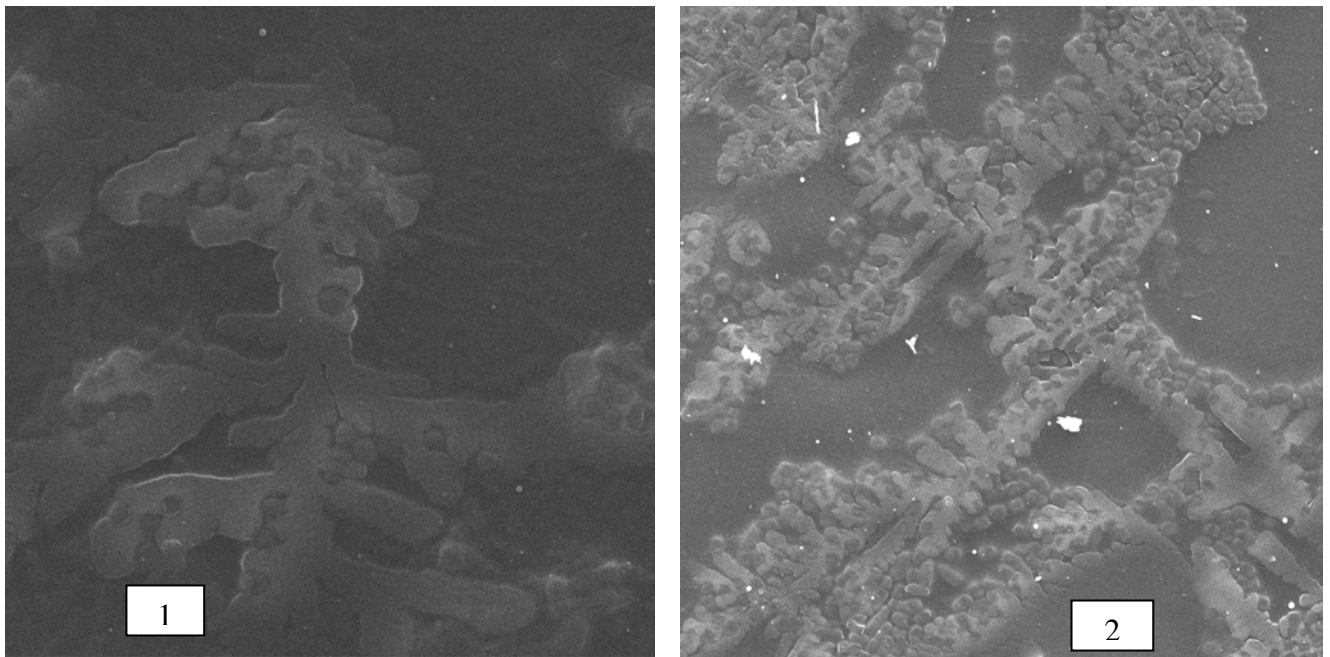


Рисунок 4.14. Формування первинної (1) та вторинної (2) біоплівок *Enterococcus faecalis* – збудника хронічного пієлонефриту в дітей старшого віку через 26–34 годин від початку адгезії, тривалість 8–10 годин (скануюча конфокальна мікроскопія).

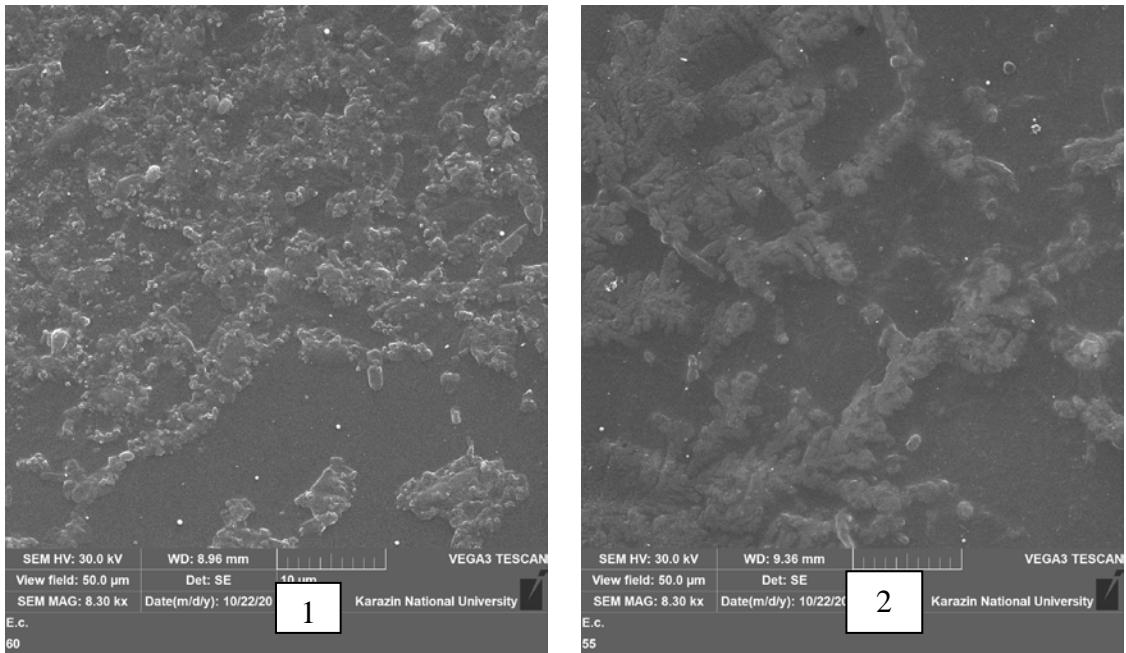


Рисунок 4.15. Завершальний етап формування первинної (1) та вторинної (2) біоплівки *Escherichia coli* – збудника гострого пієлонефриту в дітей середнього віку (скануюча конфокальна мікроскопія).

Винятком були ізоляти *Klebsiella pneumoniae*, у яких етап формування вторинної біоплівки триває 22–24 години через 32–38 годин від початку адгезії (рис.4.15).

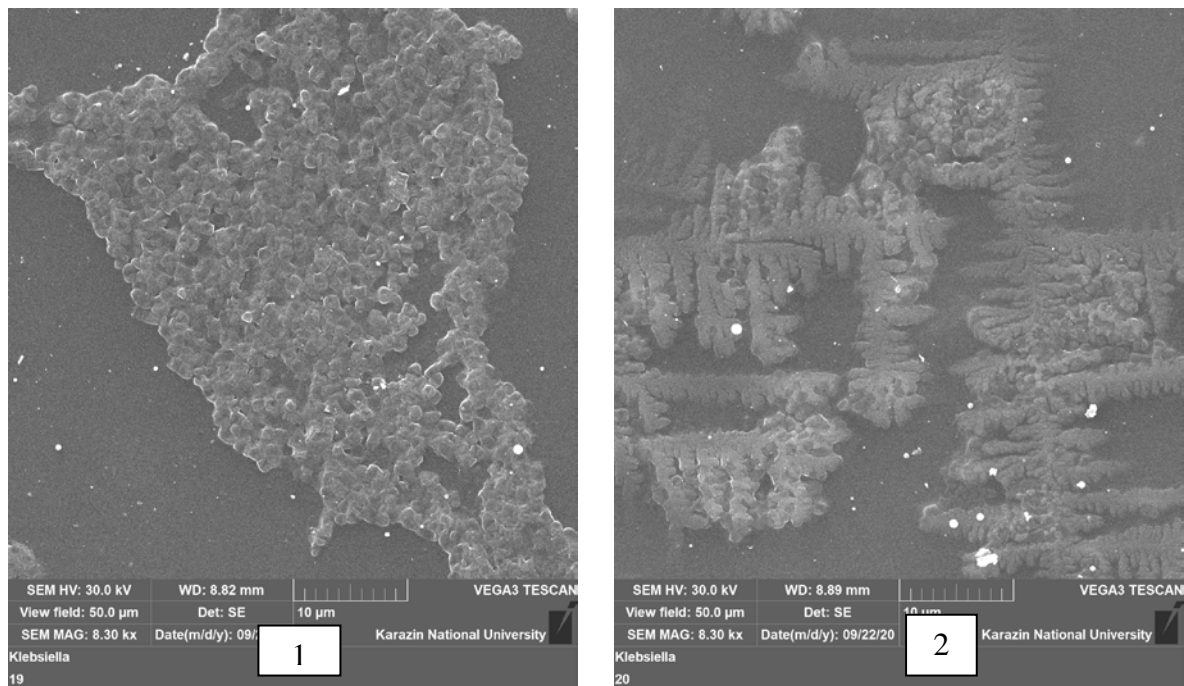


Рисунок 4.15. Завершальний етап формування первинної (1) та вторинної (2) біоплівки ізолятів *Klebsiella pneumoniae*.

При формуванні біоплівки збудниками первинних піелонефритів гострої форми в дітей старшого віку спостерігається утворення мікроколоній і кластерів з порами, крізь які вивільняються планктонні клітини. Тривалість етапу формування моношару (коагрегація) ізолятів *Escherichia coli* при утворенні первинних біоплівок становить 12–14 годин, а при утворенні вторинних біоплівок (реагрегація) – 8–10 годин і є одним з найповільніших серед усіх етапів формування як первинних, так і вторинних біоплівок *Escherichia coli* (рис.4.16).

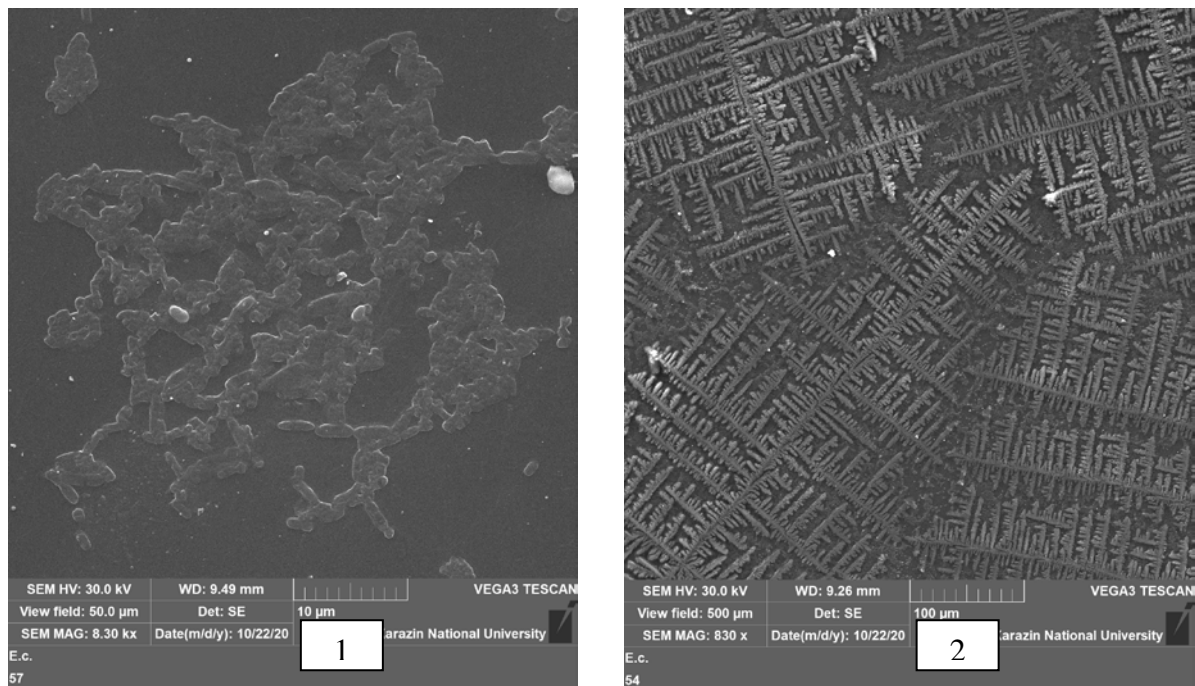


Рисунок 4.16. Завершальний етап формування первинної (1) та вторинної (2) біоплівок *Escherichia coli*.

Унаслідок кількісного аналізу проведеного дослідження було встановлено, що всі ізоляти були здатні формувати щільні біоплівки. У дітей середнього віку з ГПН та ХПН щільність біоплівок була: *Enterococcus faecalis* – $2,67 \pm 0,12$ од.ощ. й $4,29 \pm 0,23$ од.ощ. відповідно; *Klebsiella pneumoniae* – $3,37 \pm 0,14$ од.ощ. й $4,86 \pm 0,26$ од.ощ.; *Escherichia coli* – $2,49 \pm 0,18$ од.ощ. й $3,98 \pm 0,26$ од.ощ. та *Proteus mirabilis* – $3,59 \pm 0,28$ од.ощ. (рис. 4.17).

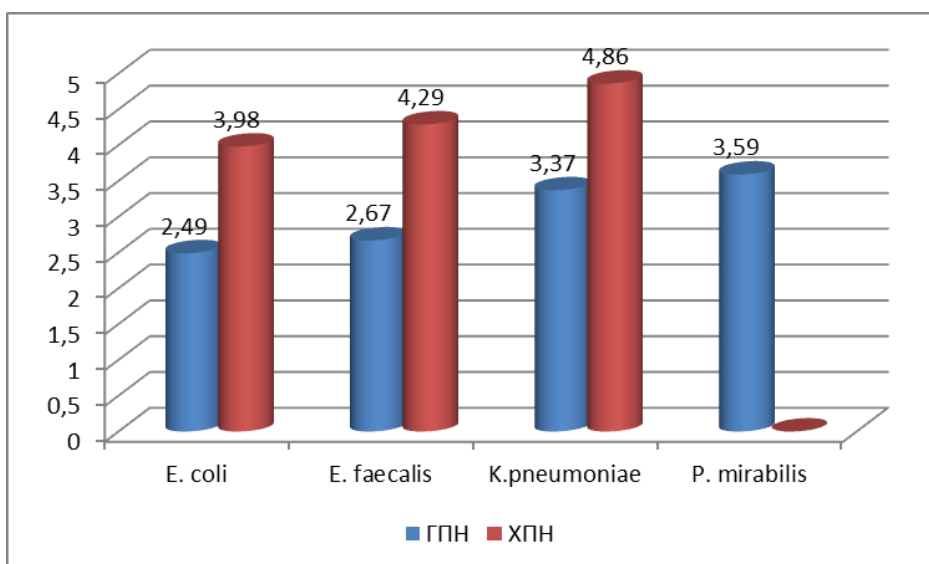


Рисунок 4.17. Щільність добових біоплівків провідних ізолятів у дітей середнього віку з первинним пієлонефритом.

У дітей старшого віку з ГПН та ХПН фіксуємо таку щільність біоплівків: *Enterococcus faecalis* – $2,89 \pm 0,16$ од.ощ. й $4,66 \pm 0,28$ од.ощ. відповідно; *Klebsiella pneumoniae* – $3,48 \pm 0,24$ од.ощ. й $4,94 \pm 0,22$ од.ощ.; *Escherichia coli* – $2,63 \pm 0,19$ од.ощ. й $4,18 \pm 0,24$ од.ощ. та *Proteus mirabilis* – $3,72 \pm 0,28$ од.ощ. й $4,29 \pm 0,26$ од.ощ. (рис. 4.18).

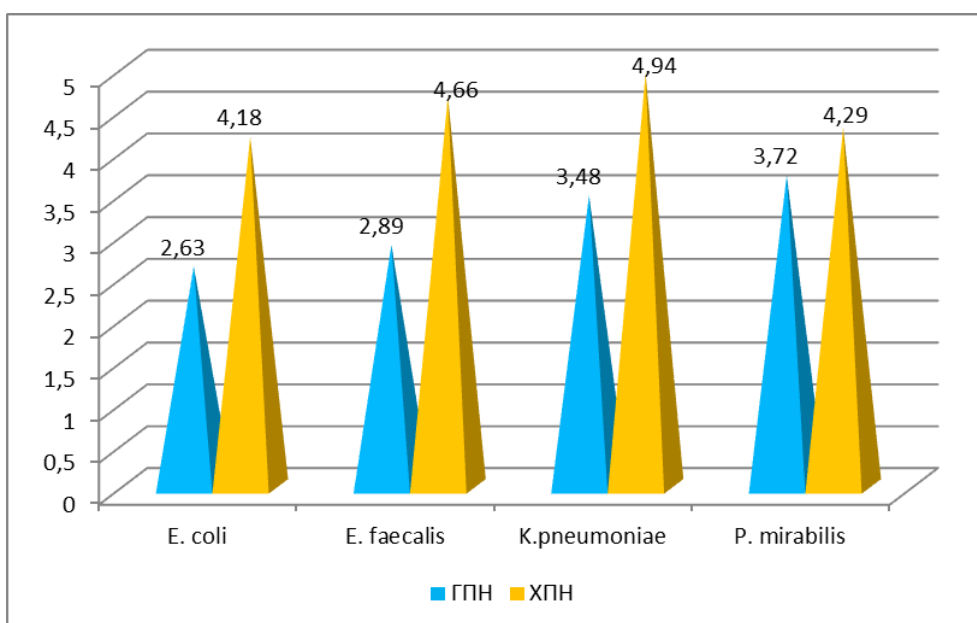


Рисунок 4.18. Щільність добових біоплівків провідних ізолятів у дітей старшого віку з первинним пієлонефритом.

Таким чином, виявлено здатність збудників пієлонефритів до формування щільних біоплівок у дітей (рис.4.19), особливо віком від 8 до 18 років, що є передумовою виникнення хронічної форми та рецидивів.

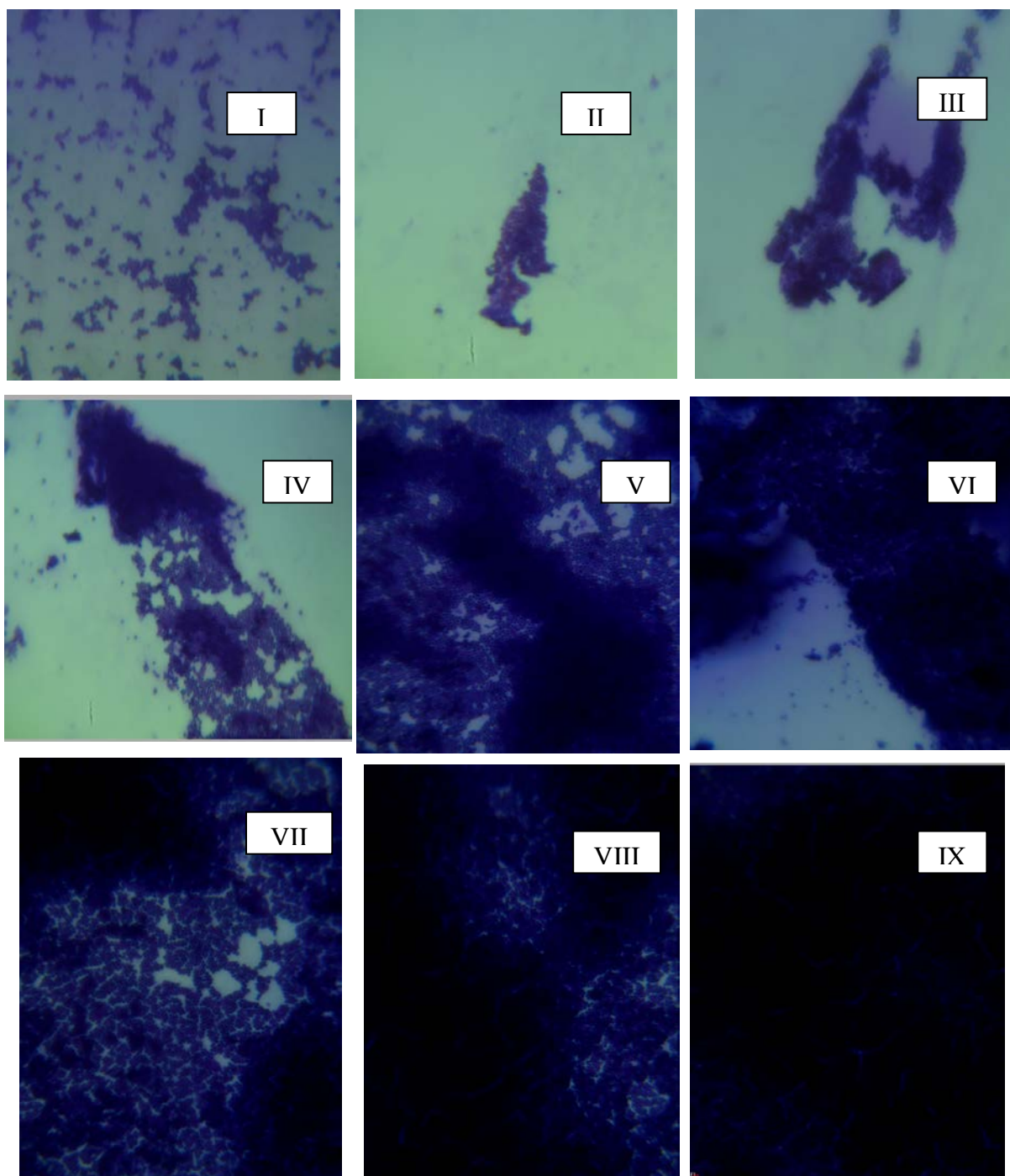


Рисунок 4.19. Стадії формування біоплівки *Enterococcus faecalis* у дітей з пієлонефритами: I – адгезія (1), II - фіксація (2), III – коагрегація, IV – кластеризація, V – дисперсія, VI – дисемінація, VII – реадсорбція, VIII – реагрегація, IX – формування вторинної біоплівки. Світлова мікроскопія.

4.3. Дослідження етапів формування біоплівки провідними збудниками пієлонефриту на фоні вродженого гідронефрозу в дітей залежно від віку

Основними видами бактерій, що утворюють біоплівки при пієлонефритах у дітей з уродженими гідронефрозами, є стафілококи, стрептококи, представники родини *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* та ін. Утворення біоплівки патогенними бактеріями сприяє виникненню інфекційних уражень нирок у дітей на фоні вродженого гідронефрозу.

Тому вивчення здатності до формування біоплівки збудниками пієлонефритів у дітей з уродженим гідронефрозом та визначення терміну тривалості кожної стадії утворення біоплівки ізолятами для підвищення ефективності застосованої протимікробної терапії є актуальним на сьогодні.

При визначенні адгезивної властивості ізолятів при пієлонефриті в дітей з уродженим гідронефрозом було встановлено, що всі ізоляти мали високу адгезивну активність, але індекс адгезивної активності збудників пієлонефриту в дітей з уродженим гідронефрозом відрізнявся в різних вікових категоріях хворих дітей.

Так, ізоляти *Escherichia coli*, що були вилучені при пієлонефритах у дітей з уродженим гідронефрозом, мали найвищу активність у дітей старшої вікової категорії, де індекс адгезивної активності (ІАМ) для *Escherichia coli* становив 10,6, та в дітей раннього віку – ІАМ для *Escherichia coli* був 6,6 порівняно з іншими ізолятами.

У дітей середньої вікової категорії найбільш високоадгезивними штамми були *Pseudomonas aeruginosa* – ІАМ дорівнював 10,8; *Escherichia coli* – 9,6; *Candida albicans* – 8,6; *Klebsiella pneumoniae* – 8,3 та *Enterococcus faecalis* – 8,0 (рис.4.20).

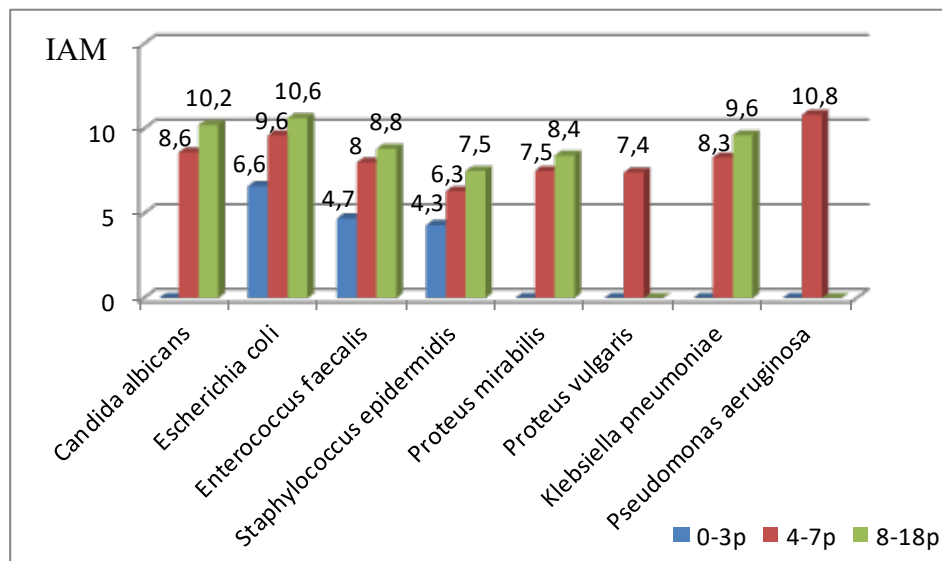


Рисунок 4.20. Адгезивна активність ізолятів – збудників пієлонефриту внаслідок вродженого гідронефрозу в дітей різного віку.

Кількість еритроцитів, залучених до адгезивного процесу, для штамів *Escherichia coli* становила 81,0%, 96,0% й 96,3% у дітей раннього, середнього та старшого віку відповідно. Для *Candida albicans* – 96,7% у дітей середнього віку та 97,7% – у дітей старшого віку. Для ізолятів *Enterococcus faecalis* коефіцієнт участі еритроцитів в адгезії був 75,3%, 93,5% та 94,1% відповідно для дітей різних вікових категорій.

Загалом у штамів, виділених у дітей старшого віку з пієлонефритом унаслідок уродженого гідронефрозу, показник СПА всіх ізолятів був достовірно вищим, ніж в ізолятів, виділених у дітей раннього віку.

На підставі отриманих даних можна стверджувати, що всі досліджувані штами мікроорганізмів володіли адгезивними властивостями. Розподіл за ступенем адгезивності є неоднаковим для дітей різних вікових категорій. Здатність до адгезії в грамнегативних бактерій була достовірно вищою порівняно з грампозитивними бактеріями, збудниками пієлонефриту в дітей унаслідок вродженого гідронефрозу. Штами *Pseudomonas aeruginosa*, що були виділені в дітей середньої вікової категорії, мали найбільшу адгезивну

активність, що можна пояснити особливостями будови поверхневих структур та їхньою здатністю контактувати з клітинами-мішенями. Адгезивний процес *Candida albicans* є основним за значенням етапом колонізації тропних клітин та визначальним у подальшому розвитку запального процесу, що зумовлено наявністю спеціалізованих білків – адгезинів [117]. Таким чином, грамнегативні бактерії та гриби *Candida albicans* характеризувалися високою адгезивною активністю в дітей з пієлонефритом унаслідок уродженого гідронефрозу в усіх вікових категоріях.

Дослідження структурно-функціональних особливостей формування біоплівок провідними збудниками пієлонефриту на фоні вродженого гідронефрозу в дітей залежно від віку виявило низку особливостей і закономірностей. При формуванні біоплівок ізолятами визначалися класичні етапи [108]: перший етап – адгезії (седиментації) – первинне прикріплення збудника ПН-ГН до субстрату, другий етап – фіксація – остаточне необоротне прикріплення клітин мікроорганізмів до поверхні, третій етап – коагрегація – утворення мікроколоній з подальшим синтезом полімерного матриксу, четвертий етап – формування кластерів та зрілої біоплівки (після злиття мікроколоній утворюється тримірна структура, що може змінювати розмір та форму), п'ятий етап – дисперсія – викид бактерій або втрата одиничних фрагментів, які поширюються організмом та прикріплюються до субстрату з формуванням нової біоплівки.

На етапі необоротної фіксації формування біоплівок ізолятами, виділеними в дітей вікової категорії 0–3 роки, було з'ясовано, що прикріплення кокоподібних бактерій до субстрату відбувається швидше за грамнегативні палички, а саме: *Enterococcus faecalis* – через 2–4 години (рис. 4.21А), *Staphylococcus epidermidis* – через 3–5 годин, а *Escherichia coli* – 6–8 годин. Було виявлено відокремлені структури, що склалися з декількох клітин з формуванням тонкого покриву.

Установлено, що найтривалішими етапами формування первинної біоплівки в дітей молодшого віку є етап коагрегації (рис. 4.21В), який

спостерігається в кокоподібних бактерій *Enterococcus faecalis* й *Staphylococcus epidermidis* (9 годин), та етап дисперсії, що триває 12 годин в ізолятив *Escherichia coli*.

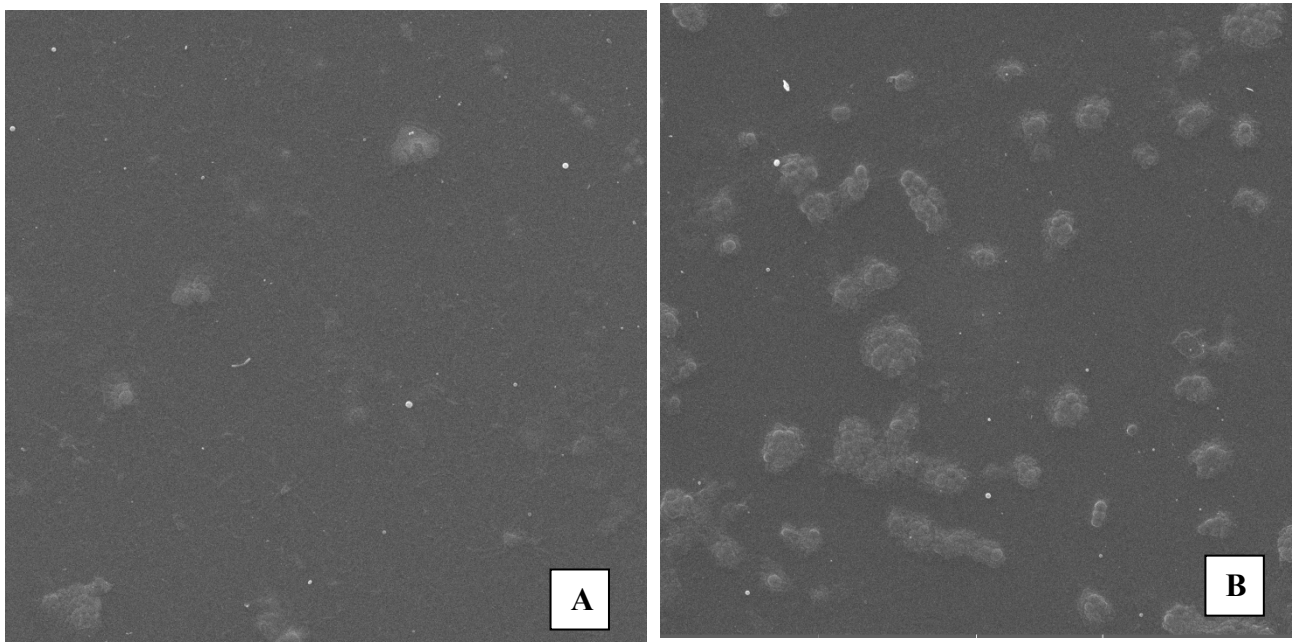


Рисунок 4.21. Формування первинної біоплівки *Enterococcus faecalis* у дітей молодшого віку: етап адгезії (А) та коагрегації (В).

Спостерігалось формування моношару ізолятами у вигляді ущільнених ділянок із скупченням клітин та утворення мікроколоній різних розмірів, що об'єднані міжклітинним матриксом клітин.

При визначенні здатності до колонізації ізолятів з формуванням вторинної біоплівки було встановлено, що найтривалішим етапом є етап реадсорбції в *Staphylococcus epidermidis* та в *Enterococcus faecalis* – 12 годин (рис. 4.22.А), тоді як найкоротшим є етап реагрегації (рис. 4.22.В) – 2 години в усіх виявлених збудників.

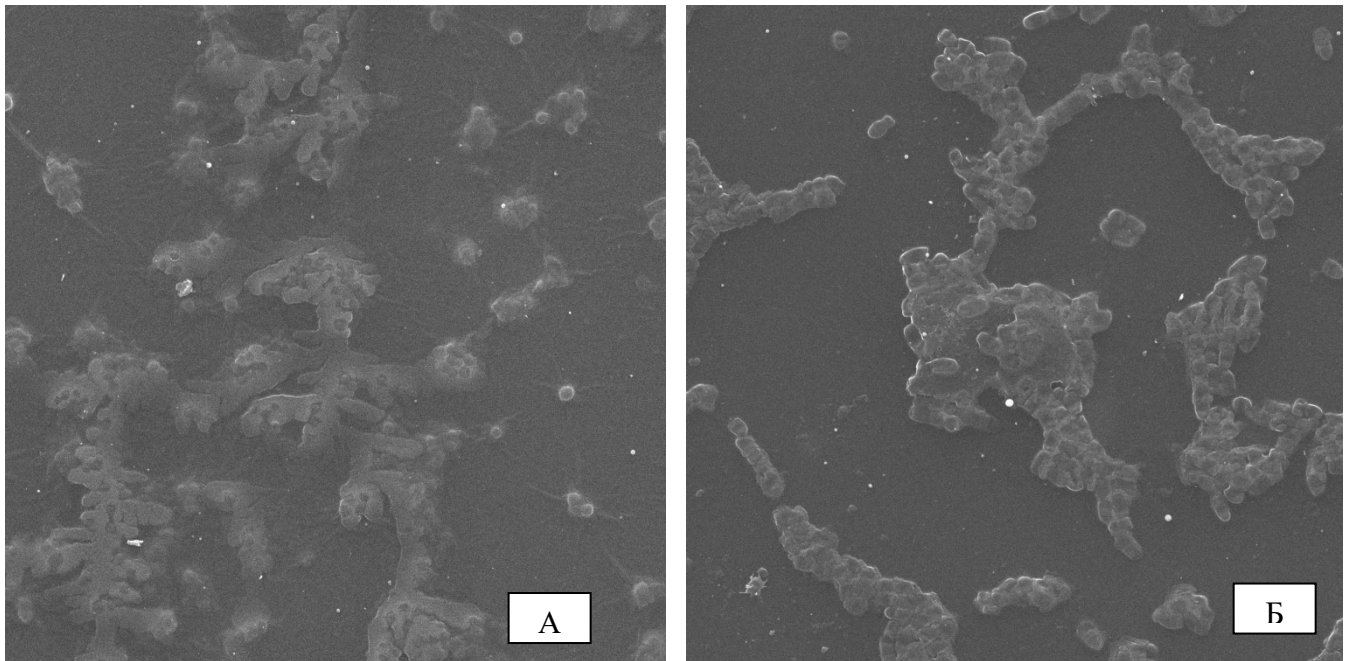


Рисунок 4.22. Формування вторинної біоплівки *Enterococcus faecalis* у дітей молодшого віку: етап реадсорбції (А) та реагрегації (Б).

У дітей середнього віку серед провідних збудників пієлонефриту, зумовленого вродженим гідронефрозом, було ідентифіковано *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans* і виявлено такі особливості: тривалість стадії адгезії мікроорганізмів до субстрату скорочувалася на 1–2 години порівняно з аналогічними показниками у дітей раннього віку.

Для *Candida albicans* тривалість стадії адгезії становила 2–6 годин (рис. 4.23).

За рахунок утворення міжклітинних зв'язків відзначалася іммобілізація планктонних клітин, формування вторинних мікроколоній, пов'язаних з первинними, й утворення мікропорожнин у матриксі, синтез якого зумовлено викидом екстрацелюлярних речовин у вигляді полімерних сіток, що забезпечують механічну стабільність сформованих біоплівок.

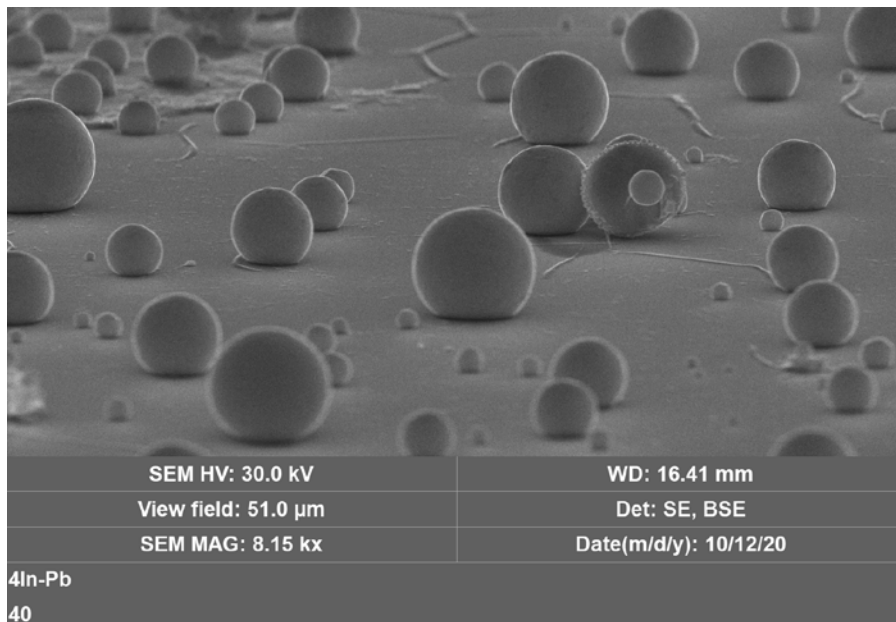


Рисунок 4.23. Перша стадія (адгезії) формування первинних біоплівок *Candida albicans* – збудника пієлонефриту на фоні вродженого гідронефрозу в дітей середнього віку (комфокальна мікроскопія).

Надалі було встановлено, що завершення формування біоплівок в ізолятів *Escherichia coli* відбувається на 4–6 години раніше за аналогічні показники в дітей раннього віку.

Така сама тенденція спостерігається і в ізолятів *Enterococcus faecalis* – на 12 годин, а у *Staphylococcus epidermidis* – на 8 годин, що є особливістю завершального етапу утворення біоплівок збудниками пієлонефриту в дітей з уродженим гідронефрозом.

Найтриваліший етап у формуванні вторинної біоплівки – етап реакрегації ізолятів *Candida albicans*, становив 14 годин (рис. 4.24).

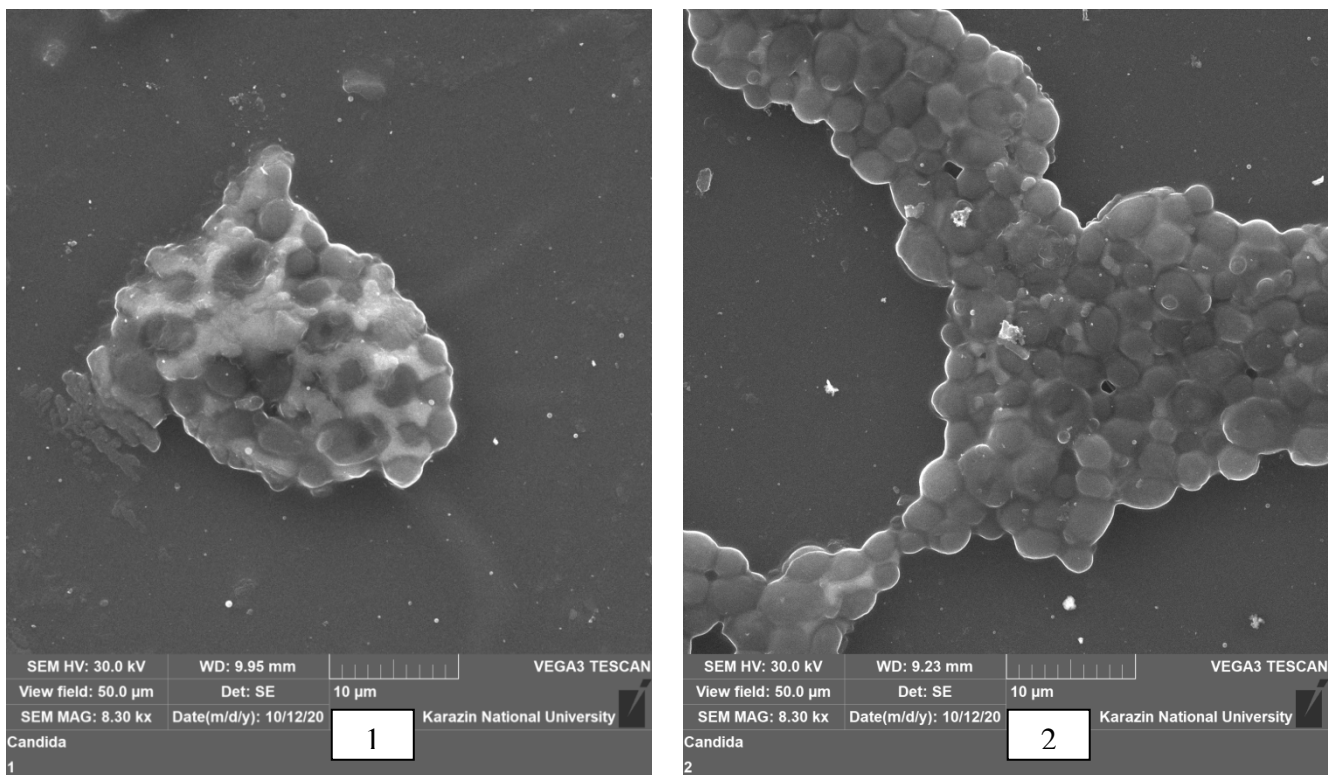


Рисунок 4.24. Формування вторинних біоплівки *Candida albicans*: 1 – початок етапу реагрегації (через 30 годин від початку формування біоплівки); 2 – реагрегація *Candida albicans* через 44 години (скануюча комфокальна мікроскопія).

Що стосується особливостей утворення біоплівки провідними збудниками пієлонефриту внаслідок вродженого гідронефрозу в дітей старшої вікової категорії, то було встановлено, що весь цикл утворення первинних і вторинних біоплівки грамнегативними бактеріями триває протягом 26–32 годин, а грампозитивними – 24–34 години. Тривалість кожного з етапів скорочується порівняно з групами дітей молодших вікових категорій. Найповільнішим етапом є завершальний етап формування вторинної біоплівки (рис.4.25), що триває в грампозитивних бактерій 4 години, а в грамнегативних – 6 годин, за винятком ізолятів *Klebsiella pneumoniae*, у яких етап формування вторинної біоплівки триває 8 годин.

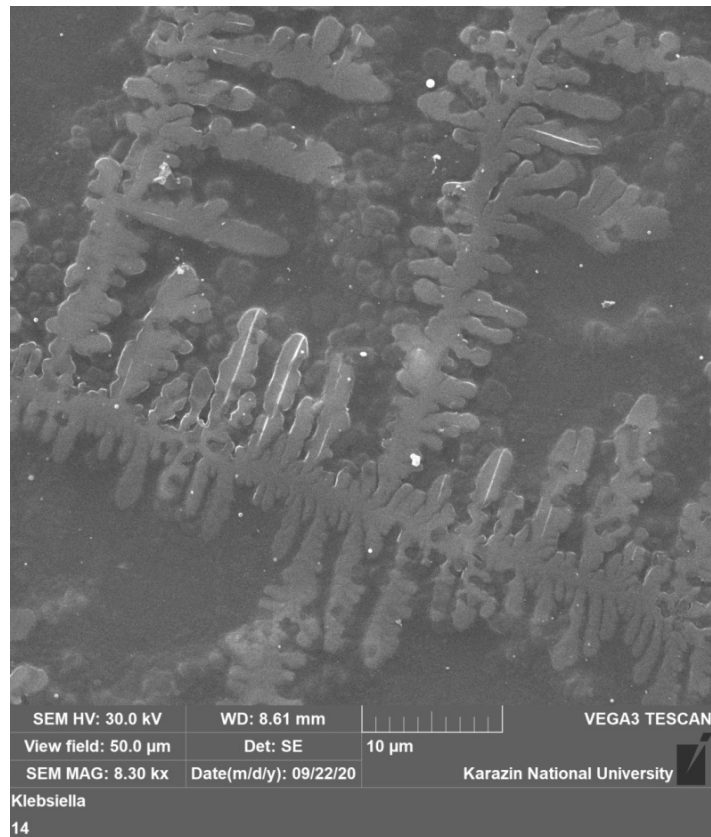


Рисунок 4.25. Завершальний етап формування вторинних біоплівок *Klebsiella pneumoniae* через 26–34 годин від початку адгезії – тривалість 8 годин (скануюча конфокальна мікроскопія).

Спостерігається повторне злиття мікроколоній з утворенням кластерів, на лініях формування яких виявляються пори й канали, оточені мембранними структурами. У центрі мікроколонії більш розвинені, ніж на периферії, а між клітинами виявляються довгі структури на зразок анастомозів та структури шароподібної форми, що беруть участь у формуванні нових мікроколоній шляхом колонізації вільних ділянок субстрату.

Привертає увагу етап коагрегації ізолятів при формуванні первинних біоплівок: хоча початок даного етапу зафіксовано раніше на 3-4 години від аналогічних показників у дітей молодшої вікової категорії, але тривалість даного етапу становить 10–11 годин, що є одним з найповільніших серед усіх етапів формування як первинних, так і вторинних біоплівок ізолятами.

Кількісний аналіз проведеного дослідження показав, що всі ізоляти були здатні формувати щільні біоплівки. У дітей раннього віку щільність біоплявок була такою: *Staphylococcus epidermidis* – $1,95 \pm 0,01$ од.ощ.; *Enterococcus faecalis* – $2,07 \pm 0,01$ од.ощ. та *Escherichia coli* – $1,76 \pm 0,01$ од.ощ. (рис. 4.26, рис. 4.27).

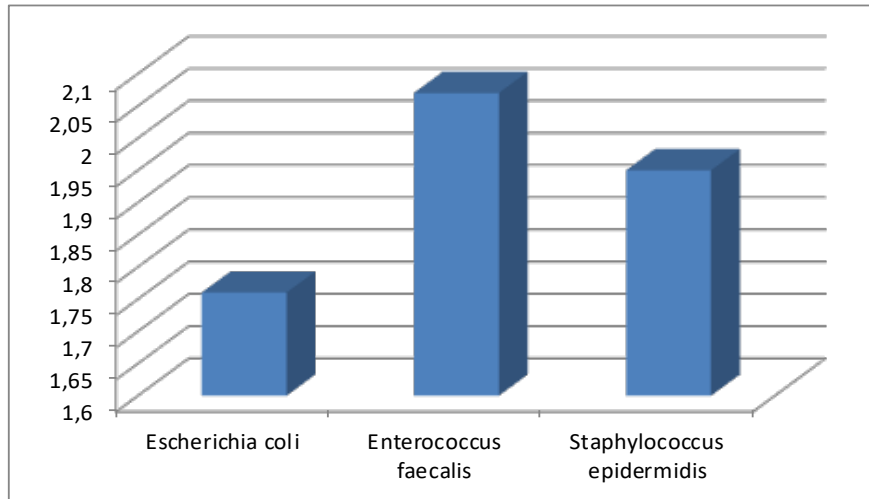


Рисунок 4.26. Щільність добових біоплівок провідних ізолятів у дітей раннього віку з пієлонефритом на фоні гідронефрозу.

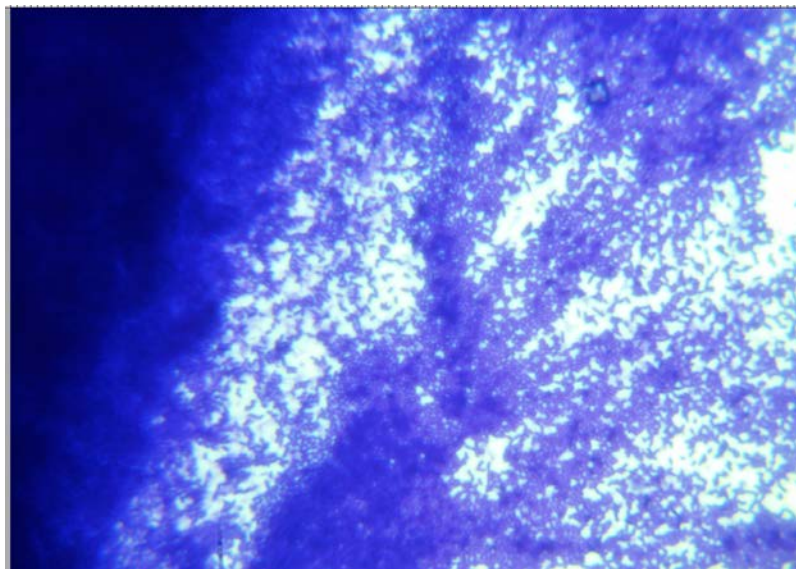


Рисунок 4.27. Утворення добових біоплівок ізолятами *Escherichia coli* в дітей раннього віку з пієлонефритом на фоні гідронефрозу. Фарбування Г-В, мікроскоп Amplival x200.

У дітей з пієлонефритом на фоні вродженого гідронефрозу вікової категорії від 4 до 7 років ізоляти утворювали біоплівки щільністю: *Enterococcus faecalis* – $2,29 \pm 0,015$ од.ощ.; *Escherichia coli* – $1,96 \pm 0,006$ од.ощ.; *Pseudomonas aeruginosa* – $2,47 \pm 0,014$ од.ощ. й *Candida albicans* – $3,61 \pm 0,02$ од.ощ. (рис.4.28, рис.4.29).

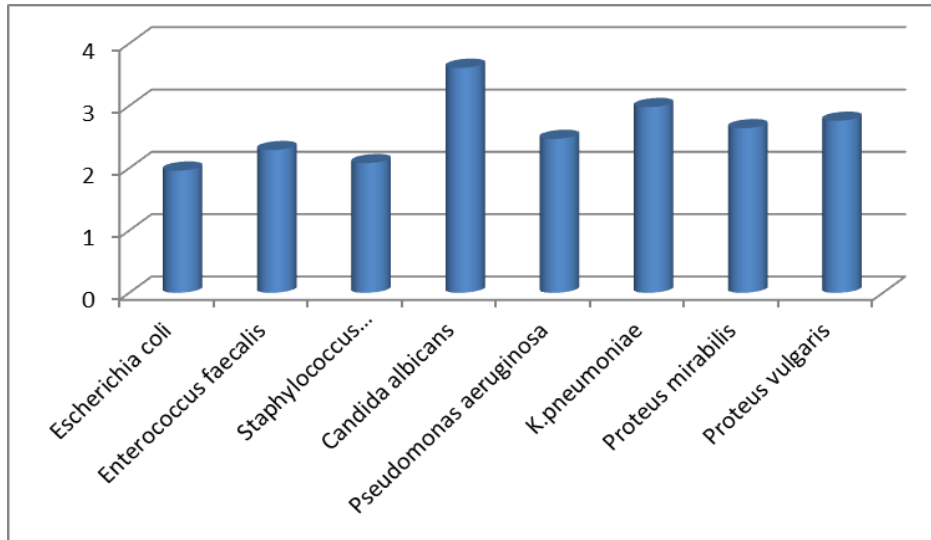


Рисунок 4.28. Щільність добових біоплівок провідних ізолятів у дітей середньої вікової категорії з пієлонефритом на фоні гідронефрозу.

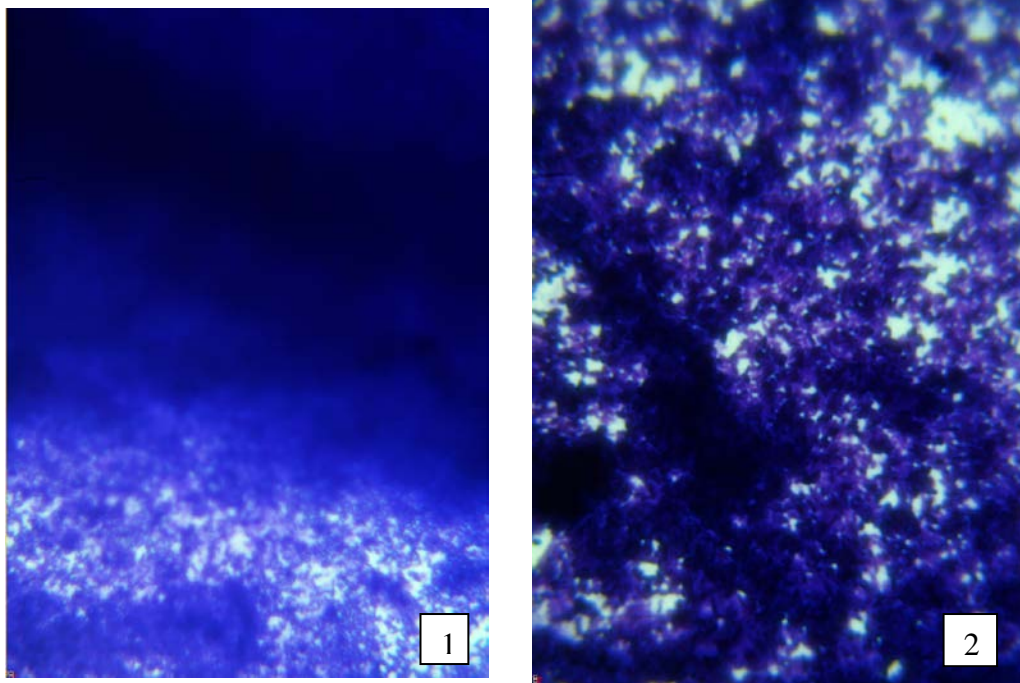


Рисунок 4.29. Утворення добових біоплівок ізолятами *E.coli* (1) та *K.pneumoniae* (2) у дітей середньої вікової категорії з пієлонефритом на фоні гідронефрозу. Фарбування Г-В, мікроскоп Amplival x200.

У дітей з пієлонефритом на фоні вродженого гідронефрозу вікової категорії від 8 до 18 років ізоляти утворювали біоплівки щільністю: *Escherichia coli* – $2,51 \pm 0,017$ од.ощ.; *Proteus mirabilis* - $2,73 \pm 0,066$ од.ощ.; *Enterococcus faecalis* – $2,82 \pm 0,011$ од.ощ.; *Klebsiella pneumoniae* - $3,14 \pm 0,012$ од.ощ. та *Candida albicans* – $4,05 \pm 0,018$ од.ощ. (рис. 4.30, рис. 4.31).

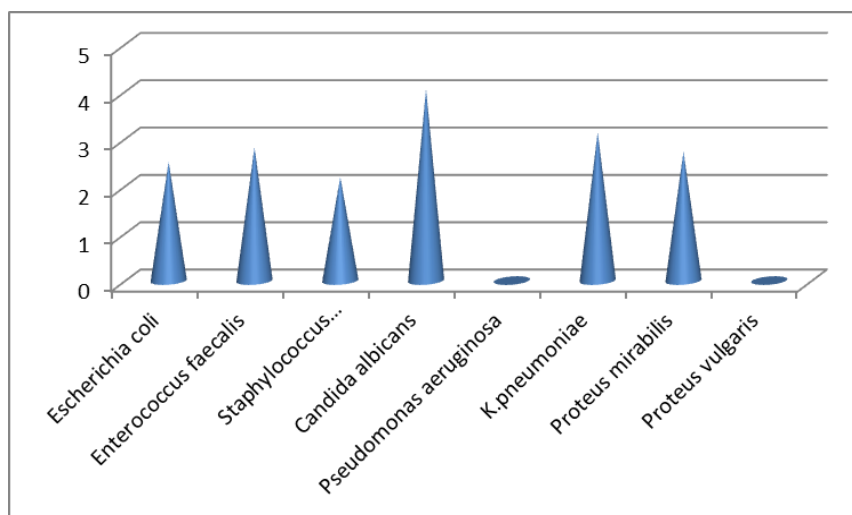


Рисунок 4.30. Щільність добових біоплівок провідних ізолятів у дітей старшої вікової категорії з пієлонефритом на фоні гідронефрозу.

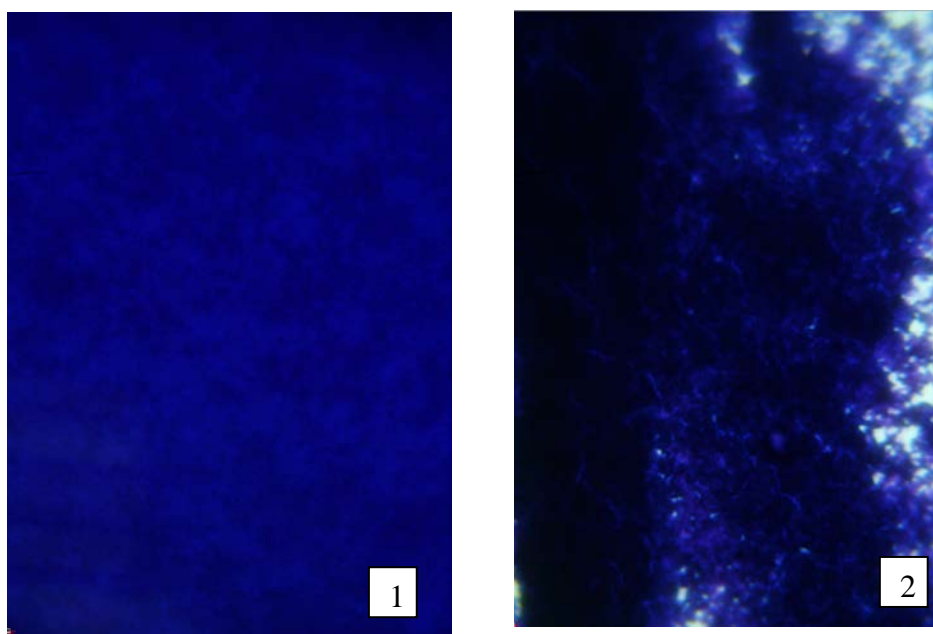


Рисунок 4.31. Утворення добових біоплівок ізолятами *Escherichia coli* (1) та *Klebsiella pneumoniae* (2) у дітей старшого віку з пієлонефритом на фоні гідронефрозу. Фарбування Г-В, мікроскоп Amplival x200.

Таким чином, виявлено здатність збудників пієлонефритів у дітей до формування щільних біоплівок, особливо у віці від 8 до 18 років, що є передумовою виникнення хронічної форми та рецидивів. Застосування конфокальної мікроскопії дало змогу встановити не тільки те, що біоплівки мікроорганізмів, збудників пієлонефритів у дітей з уродженим гідронефрозом, мають складну тримірну структурну організацію, а й те, що після формування первинної біоплівки ізолятами відбувається активне продукування планктонних клітин, які колонізують організм дитини; після повторної незворотної адгезії популяція збудників починає інтенсивно зростати й формувати багатоклітинні шари із синтезом щільного екзополімерного матриксу, що є одним з ключових моментів утворення вторинних біоплівок. Причому клітини в слизовому екзополімерному матриксі розташовуються структуровано у вигляді багатоклітинних кластерів, що нагадують стовпи або дерева, мають порожнини та поділені каналами. Клітини мікроорганізмів у складі біоплівки мають поліморфну організацію: виявляються клітини зі зміненою морфологією, зокрема в *Enterococcus faecalis* спостерігалися подовжені або витягнуті клітини. Отримані в роботі результати не суперечать провідним дослідженням у цьому напрямку та доповнюють наукові дані щодо стадій формування біоплівки мікроорганізмами, збудниками пієлонефритів у дітей.

4.4. Вплив похідних нітрофуранів на здатність мікроорганізмів, збудників пієлонефритів у дітей, утворювати біоплівки

У сучасному суспільстві зростає кількість дітей, хворих на рецидивуючий перебіг інфекції сечовивідної системи на тлі порушення уродинаміки, яка обумовлена як органічними, так і функціональними причинами. Рецидування інфекції сечовивідної системи, зокрема пієлонефриту, обумовлено збільшенням резистентності до антибактеріальних препаратів. У сучасній педіатрії, зокрема в дитячій нефрології, посилюється

інтерес до бактеріальних плівок та процесу біоплівкоутворення [63, 78]. Саме мікробні біоплівки відповідальні за етіологію та патогенез багатьох гострих і хронічних бактеріальних хвороб, до них також належать інфекції сечовивідної системи, а саме пієлонефрит, цистит. Утворення біоплівок підвищує виживання бактерій у навколишньому середовищі, у тому числі в дитячому організмі. Відмінними особливостями біоплівки порівняно з колоніями мікроорганізмів є позаклітинний матрикс, наявність у бактерій генів, що контролюють біоплівкоутворення, складна архітектурна структура [95].

Поширення і збільшення відсотка застосування катетерів, дренажів з одночасним призначенням антибактеріальних препаратів, до яких виявлено резистентність патогенів, призводять до розвитку біоплівкової інфекції [101, 106]. Періодичне вивільнення планктонних форм бактерій з біоплівок у потік сечі є джерелом розвитку і підтримання хронічного інфекційного і запального процесу в нирках.

Збільшення резистентності до антибактеріальних препаратів пояснюється порушенням проникнення антибактеріального препарату через матрикс біоплівки. Неухильне зростання резистентності мікроорганізмів до застосовуваних антибіотиків, збільшення кількості хворих на інфекції сечовивідної системи, зміна структури уропатогенів й утворення біоплівок є основними проблемами в лікуванні пієлонефритів у дітей. Для розвитку біоплівок, сформованих уропатогенами, характерно декілька етапів: адегезія планктонних форм бактерій до поверхні з подальшим поділом клітин, формуванням матриксу, утворенням самої біоплівки та відокремленням нових планктонних мікроорганізмів. Біоплівкоутворення вважається одним з факторів патогенності мікроорганізмів, а здатність до утворення біоплівок уропатогенами лежить в основі антибіотикорезистентності, що зумовлює необхідність активного пошуку антимікробних препаратів для пригнічення формування біоплівки мікроорганізмів.

Успішні лікування і профілактика пієлонефриту неможливі без ретельного вивчення чинників, що сприяють формуванню і прогресуванню захворювання. Лікування пієлонефриту залишається одним з найактуальніших завдань дитячої нефрології на сучасному етапі. Тому відкритим залишається питання щодо підбору оптимальних схем протирецидивної терапії та тривалості їх проведення. Вирішення цих проблем дасть змогу обґрунтувати нові підходи до вибору оптимальної тактики лікування та профілактики пієлонефриту в дітей. На сучасному етапі залишаються недостатньо вивченими механізми взаємодії між бактеріями всередині біоплівки.

Тому вивчення здатності основних уропатогенів до утворення біоплівки та вплив похідних нітрофуранів на первинні та вторинні біоплівки ізолятів є важливим.

Унаслідок проведеного дослідження виявлено, що всі уропатогенні мікроорганізми мали здатність утворювати добові біоплівки. Оптична щільність ізолятів у дітей, хворих на хронічний пієлонефрит, була вірогідно ($p < 0,05$) вищою, ніж у дітей, хворих на гострий пієлонефрит. Установлено також, що найбільш щільні добові біоплівки утворювала *Klebsiella pneumoniae* як при гострому, так і при хронічному пієлонефриті (табл. 4.1).

Виділені в дітей до 4 років, які лікувалися з приводу пієлонефриту, штами *Klebsiella pneumoniae* мали здатність утворювати добові біоплівки: ізоляти гострої форми пієлонефриту утворювали біоплівки з щільністю 3,21 (2,89; 3,67) опт.од., ізоляти *Klebsiella pneumoniae* хронічної форми – 4,56 (4,02; 4,87) опт.од. з активним продукуванням планктонних клітин (2,14 (1,86; 2,65) опт.од. та 3,06 (2,84; 3,31) опт.од. відповідно), що утворювали більш щільні вторинні біоплівки, які мають високу стійкість до протимікробних препаратів.

Таблиця 4.1.

Показники оптичної щільності біоплівки, що сформовані основними уропатогенами в дітей, хворих на гострий та хронічний пієлонефрит (од.ощ.)

Основні збудники пієлонефритів у дітей	Групи обстежених дітей з гострим та хронічним пієлонефритом	
	Гострий пієлонефрит (1 група, n=26)	Хронічний пієлонефрит (2 група, n=11)
<i>Proteus vulgaris</i>	2,89 (2,36; 3,01)	4,18 (3,95; 4,31)*
<i>Proteus mirabilis</i>	2,65 (2,33; 3,02)	3,84 (3,62; 3,95)*
<i>Escherichia coli</i>	2,34 (2,08; 2,65)	3,68 (3,52; 3,89)*
<i>Klebsiella pneumonia</i>	3,21 (2,89; 3,67)	4,56 (4,02; 4,87)*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,84 (2,51; 3,13)	4,12 (4,32; 4,67)*
<i>Enterobacter spp</i>	2,14 (1,81; 2,44)	3,47 (3,29; 4,11)*
<i>Morganella morganii</i>	2,08 (1,89; 2,31)	3,26 (3,04; 3,45)*
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,81 (2,63; 3,02)	4,09 (3,86; 4,25)*
<i>Streptococcus pyogenes</i>	2,97 (2,82; 3,15)	4,21 (4,01; 4,43)*

Примітка. * – вірогідність ознаки ($p < 0,05$) щодо показників дітей з 1-ої групи

Унаслідок проведеного дослідження виділено штами збудників *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, які утворювали щільні добові біоплівки. Однак, слід зауважити, що ізоляти гострої форми пієлонефриту утворювали біоплівки меншої щільності (рис.4.32), тоді як ізоляти хронічної форми утворювали більш щільні первинні біоплівки (рис. 4.33).

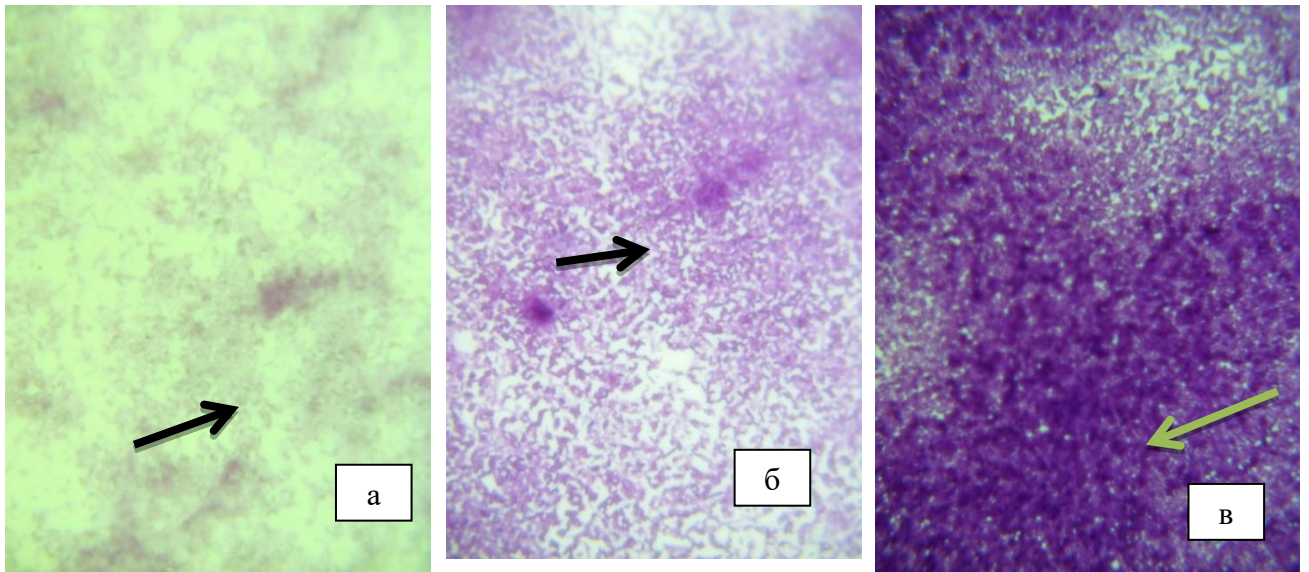


Рисунок 4.32. Мікроскопія біоплівки, що сформовані збудниками гострого пієлонефриту в дітей (мікроскоп Granum з масляною імерсією, окуляр WF 10x/18; об'єктив 100/1.25 160/0.17): а) через 12 годин інкубації; б) через 18 годин інкубації; в) через 24 години інкубації.

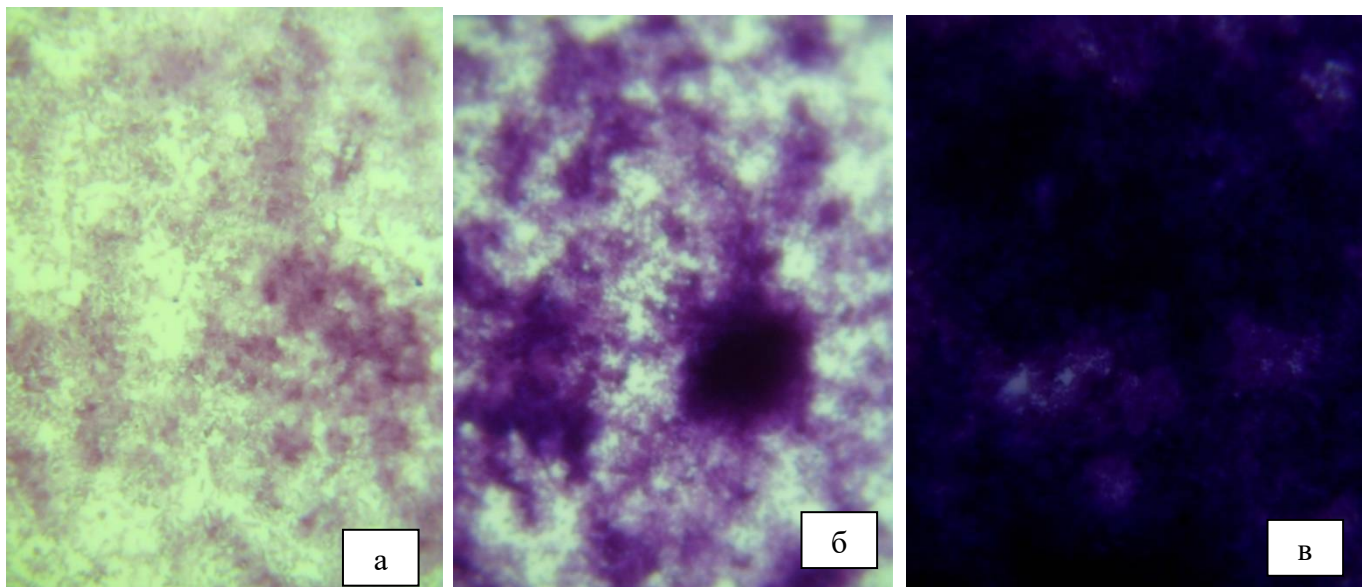


Рисунок 4.33. Мікроскопія біоплівки, що сформовані збудниками хронічного пієлонефриту в дітей (мікроскоп «Granum» з масляною імерсією, окуляр WF 10x/18; об'єктив 100/1.25 160/0.17): а) через 12 годин інкубації; б) через 18 годин інкубації; в) через 24 години інкубації.

Під час вивчення здатності ізолятів мікроорганізмів утворювати добові біоплівки за впливу похідних нітрофуранів у терапевтичній дозі було встановлено високу ефективність при дії на планктонні форми з низькою здатністю до утворення добових біоплівок мікроорганізмів, виділених при гострій формі пієлонефриту в дітей раннього віку: *Proteus vulgaris* – $0,09 \pm 0,003$ од.ощ.; *Proteus mirabilis* – $0,039 \pm 0,004$ од.ощ.; *Escherichia coli* – $0,036 \pm 0,008$ од.ощ.; *Klebsiella pneumoniae* – $0,048 \pm 0,006$ од.ощ.; *Pseudomonas aeruginosa* – $0,044 \pm 0,008$ од.ощ.; *Enterobacter spp.* – $0,042 \pm 0,006$ од.ощ.; *Morganella morganii* – $0,039 \pm 0,004$ од.ощ.; *Staphylococcus aureus* – $0,044 \pm 0,008$ од.ощ.; *Streptococcus pyogenes* – $0,046 \pm 0,004$ од.ощ.

Показники оптичної щільності біоплівок, що сформовані основними уропатогенами в дітей, хворих на гострий пієлонефрит, до та після дії похідних нітрофуранів в од. ощ. наведено в табл.

Таблиця 4.2

Показники оптичної щільності біоплівок, що сформовані основними уропатогенами в дітей, хворих на гострий пієлонефрит, за дії препаратів нітрофуранового ряду (од.ощ.)

Основні збудники пієлонефритів у дітей	діти (n=26) з гострим пієлонефритом до та після дії препарату нітрофуранового ряду	
	до дії похідних нітрофуранів	після дії похідних нітрофуранів
<i>Proteus vulgaris</i>	$2,89 \pm 0,23$	$0,09 \pm 0,003$
<i>Proteus mirabilis</i>	$2,65 \pm 0,18$	$0,039 \pm 0,004$
<i>Escherichia coli</i>	$2,34 \pm 0,14$	$0,036 \pm 0,008$
<i>Klebsiella pneumonia</i>	$3,21 \pm 0,27$	$0,048 \pm 0,006$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$2,84 \pm 0,21$	$0,044 \pm 0,008$
<i>Enterobacter spp</i>	$2,14 \pm 0,28$	$0,042 \pm 0,006$
<i>Morganella morganii</i>	$2,08 \pm 0,19$	$0,039 \pm 0,004$
<i>Staphylococcus aureus</i>	$2,81 \pm 0,16$	$0,044 \pm 0,008$
<i>Streptococcus pyogenes</i>	$2,97 \pm 0,28$	$0,046 \pm 0,004$

Проведене дослідження показало, що при застосуванні препаратів похідних нітрофуранів пригнічується біоплівкоутворення патогенними мікроорганізмами: *Proteus vulgaris* – у 32,1 раза; *Proteus mirabilis* – у 67,9 раза; *Escherichia coli* – у 65 разів; *Klebsiella pneumonia* – у 66,9 раза, *Pseudomonas aeruginosa* – у 64,5 раза, *Enterobacter spp* – у 51 раз, *Morganella morganii* – у 53,3 раза; *Staphylococcus aureus* – у 63,9 раза; *Streptococcus pyogenes* – у 64,6 раза.

За дії похідних нітрофуранів на первинні біоплівки ізолятів *P.mirabilis* та *S.aureus* встановлено, що утворені нові планктонні клітини не формували щільні вторинні біоплівки: при гострій формі пієлонефриту діаметр щілини біоплівки становив від 1,72 мкм до 6,17 мкм (рис. 4.34), а при хронічній формі пієлонефриту – від 4,47 мкм до 20,98 мкм (рис. 4.35).

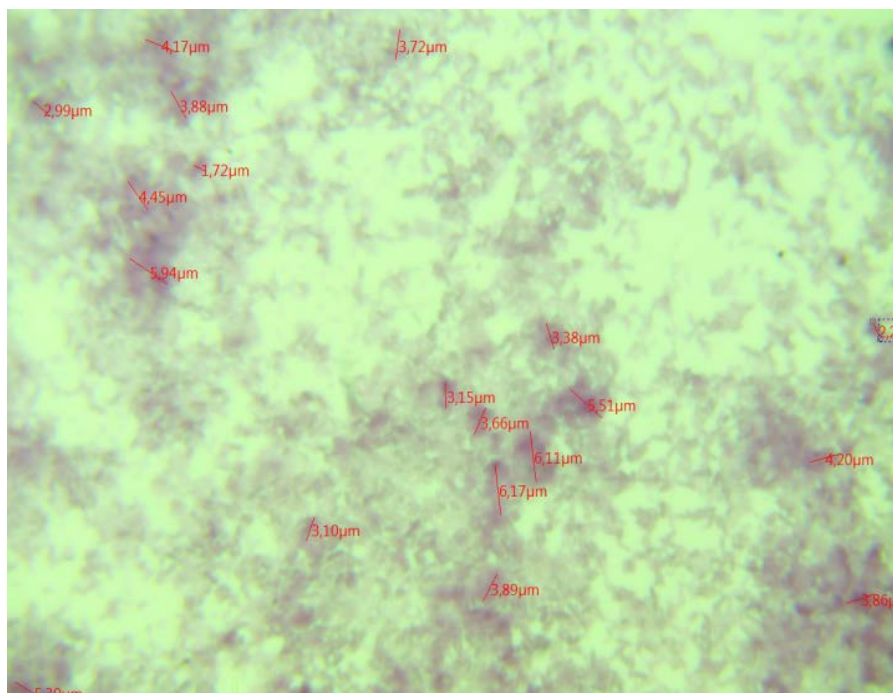


Рисунок 4.34. Здатність планктонних клітин мікроорганізмів (збудників гострих пієлонефритів у дітей), які продукуються первинними біоплівками після дії похідних нітрофуранів, утворювати вторинні біоплівки (мікроскоп «Granum» з масляною імерсією, окуляр WF 10x/18; об'єктив 100/1.25 160/0.17).

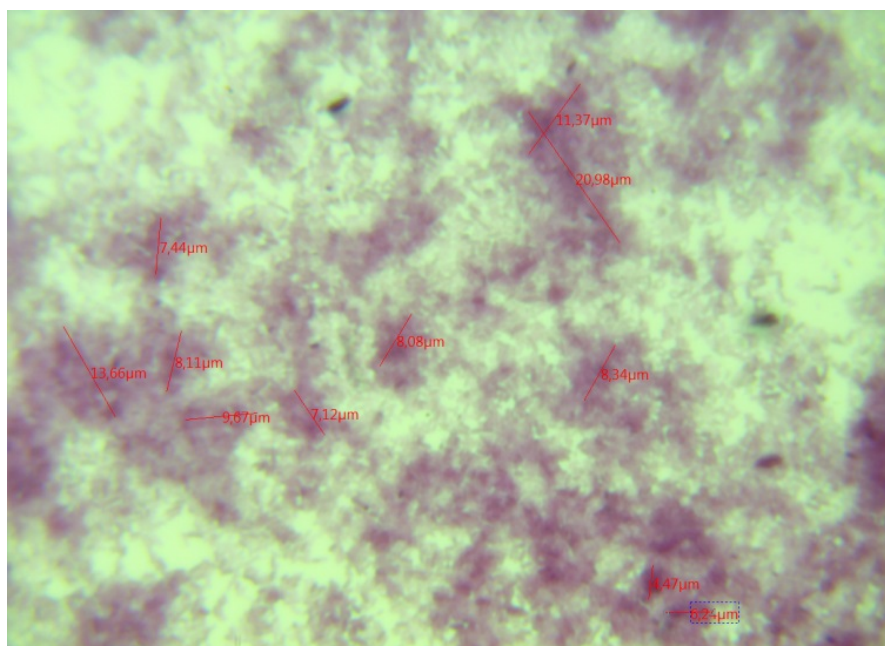


Рисунок 4.35. Здатність планктонних клітин мікроорганізмів (збудників хронічних пієлонефритів у дітей), які продукуються первинними біоплівками після дії похідних нітрофуранів, утворювати вторинні біоплівки (мікроскоп «Granum» з масляною імерсією, окуляр WF 10x/18; об'єктив 100/1.25 160/0.17).

При дослідженні дії похідних нітрофуранів на добові первинні біоплівки мікроорганізмів, збудників гострих (рис.4.36) та хронічних (рис.4.37) пієлонефритів у дітей, встановлено, що їхня оптична щільність практично не знижувалася, проте дані мікроскопії показують, що під впливом похідних нітрофуранів утворюються «пори-щілини» діаметром від 5,98 мкм до 21,66 мкм і більші, крізь які можливе потрапляння антибактеріальних препаратів у біоплівку і вплив на планктонні форми існування мікроорганізмів з наступною їхньою загибеллю або зниженням активної здатності утворювати щільні біоплівки, що попереджає розвиток рецидивів.

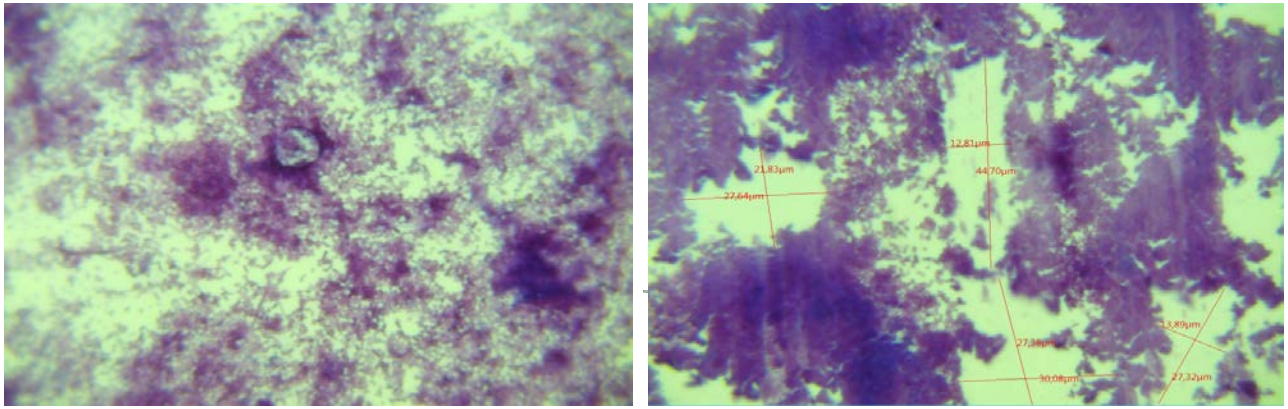


Рисунок 4.36. Дія похідних нітрофуранів на біоплівки мікроорганізмів – збудників гострих пієлонефритів у дітей раннього віку (мікроскоп «Granum» з масляною імерсією, окуляр WF 10x/18; об’єктив 100/1.25 160/0.17).

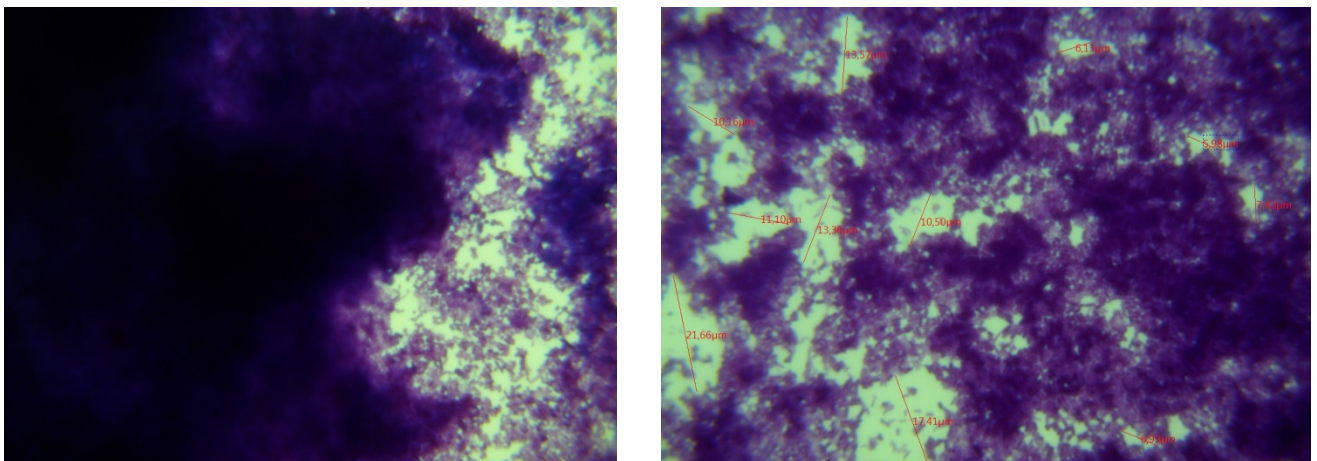


Рисунок 4.37. Дія похідних нітрофуранів на біоплівки мікроорганізмів – збудників хронічних пієлонефритів у дітей раннього віку (мікроскоп «Granum» з масляною імерсією, окуляр WF 10x/18; об’єктив 100/1.25 160/0.17).

4.5 Застосування озонованого фізіологічного розчину для підвищення ефективності антибактеріальної терапії пієлонефриту в дітей з уродженим гідронефрозом

Незважаючи на розроблення та впровадження новітніх технологій для боротьби з патогенними мікроорганізмами, питання терапії пієлонефриту в

дітей з уродженим гідронефрозом залишається відкритим. Труднощі в лікуванні пієлонефриту в дітей з гідронефрозом виникають у зв'язку з надзвичайним зростанням антибіотикорезистентності мікроорганізмів, яку пов'язують з можливістю бактерій утворювати навколо себе захисну плівку.

Дані про реакції збудників пієлонефритів, зокрема провідного *Escherichia coli*, у дітей з уродженим гідронефрозом на дію озонованого фізіологічного розчину практично відсутні, а їх одержання становить значний науковий інтерес і може мати прикладне значення.

Тому метою даного підрозділу роботи було вивчення дії озонованого фізіологічного розчину як антисептичного препарату для застосування в післяопераційному періоді в дітей з гідронефрозом, ускладненому пієлонефритом, що зумовлений *Escherichia coli*.

Проведені дослідження демонструють, що після дії озонованого фізіологічного розчину на суспензійну культуру *Escherichia coli* спостерігається зниження оптичної щільності біомаси ізолятів у 2,8 раза порівняно з контролем. При визначенні здатності до формування первинних біоплівок з'ясовано, що основу бактеріальної біомаси становили планктонні клітини ($0,735 \pm 0,05$ од.ощ.), які не формували щільної біоплівки ($0,086 \pm 0,002$ од.ощ.) порівняно з контрольними штамами, що свідчить про відсутність здатності до репродукції та стадії бактеріолізу. За результатами аналізу впливу озонованого фізіологічного розчину на добові біоплівки *Escherichia coli* встановлено, що щільність сформованих біоплівок зменшується у 18,5 раза (рис. 4.38) порівняно з позитивним контролем. Це свідчить про руйнівну дію озонованого фізіологічного розчину на екзоклітинний матрикс біоплівок. Здатність планктонних клітин, спродукованих первинними біоплівками, тобто здатність до колонізації, також оцінено за показниками оптичної щільності й показано, що за дії озонованого фізіологічного розчину здатність до формування нових біоплівок і до агрегації блокується.

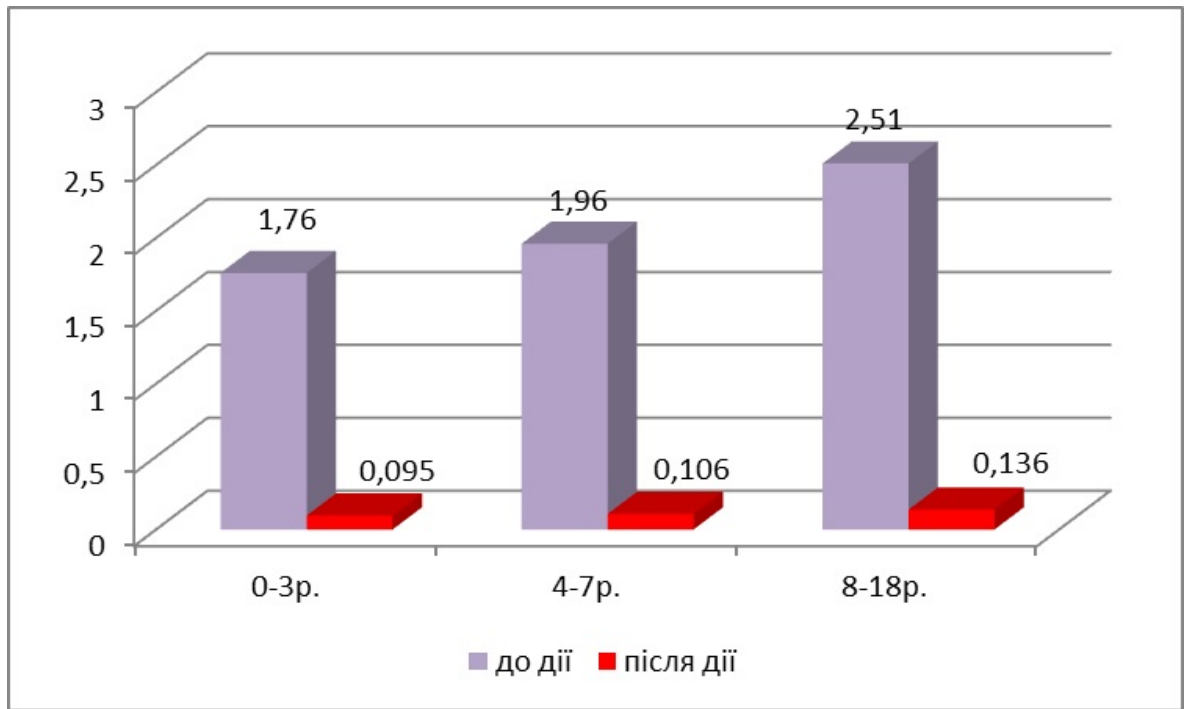


Рисунок 4.38. Дія озонованого фізіологічного розчину на добові біоплівки *Escherichia coli*, збудників хронічних пієлонефритів у дітей раннього віку.

Таким чином, для підвищення ефективності антибактеріальної терапії пієлонефриту, спричиненого *Escherichia coli*, у дітей з уродженим гідронефрозом необхідно застосовувати озонований фізіологічний розчин як антисептик у післяопераційному періоді.

Висновки до розділу 4:

1. Доповнено наукові дані щодо стадій формування біоплівок мікроорганізмами – збудниками пієлонефритів у дітей, а саме: до класичних 5 стадій (адгезія, фіксація, коагрегація, кластеризація, дисперсія) додано шостий етап – дисемінація планктонних клітин, що утворилися всередині первинної біоплівки і внаслідок дисперсії (розділення біоплівки на фрагменти з утворенням отворів); сьомий етап – реадсорбція планктонних клітин на субстратах (відбувається у 2–3 рази швидше, ніж у стадії фіксації); восьмий етап – реагрегація, що

включає формування не тільки моношару, а й біоматриксу в результаті угруповання бактеріальних клітин з наступною сегментацією бактеріальної вторинної біоплівки (дев'ятий етап).

2. Адгезія ізолятів при пієлонефритах у дітей з уродженим гідронефрозом відбувається швидше при формуванні вторинної біоплівки ізолятами пієлонефритів у дітей старшої вікової категорії, ніж при формуванні первинної біоплівки, що обумовлює можливість виникнення хронізації процесу та розвитку рецидивів.
3. Тривалість кожного з етапів формування біоплівок збудниками пієлонефритів у дітей з уродженим гідронефрозом залежить від віку дитини та властивостей мікроорганізмів.
4. У дітей молодшого віку формування зрілої біоплівки ізолятів проходило повільніше, на відміну від дітей середнього та старшого віку, а щільність біоплівки була нижчою за щільність добових біоплівок у дітей середнього й старшого віку.
5. Показники оптичної щільності біоплівок ізолятів у дітей, хворих на хронічний пієлонефрит, вірогідно вищі, ніж у дітей, хворих на гострий пієлонефрит.
6. Похідні нітрофуранів у терапевтичній дозі ефективно діють на планктонні форми уропатогенів в активній фазі гострого і при загостренні хронічного пієлонефриту, а також запобігають утворенню вторинних біоплівок.
7. За впливу похідних нітрофуранів утворюються «отвори», крізь які можливе проникнення антибактеріальних препаратів у біоплівку, що попереджає розвиток рецидивів.
8. Похідні нітрофуранів ефективно призначати з метою профілактики розвитку пієлонефритів і як протирецидивну терапію хронічних пієлонефритів у дітей різного віку.
9. Для підвищення ефективності антибактеріальної терапії пієлонефриту, спричиненого *E.coli*, у дітей з гідронефрозом необхідно

застосовувати озонований фізіологічний розчин як антисептичний засіб у післяопераційному періоді.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Mishyna M., Marchenko I., Malanchuk S., Makeeva N., Mozgova Yu.. Ability to form biofilms by pyelonephritis causative agents in children. *Georgian Medical News*. 2019. № 9 (294). 2019. P. 132-136.
2. Мішина М. М., Макеєва Н. І., Марченко І. А., Головачова В. О., Осолодченко Т. П. Формування біоплівки збудниками пієлонефритів у дітей раннього віку, як один з механізмів виникнення стійкості до антимікробних препаратів. *Український журнал медицини, біології та спорту*. 2020. Т.5, №2(24). С.104-111.
3. Mozgova Yu., Mishyna M., Malanchuk S., Marchenko I., Mishyn Yu. Primary and Secondary biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from patients with purulent inflammatory processes. *International Conference on Virology, Bacteriology & Infectious Diseases*. November 26-28, 2018 Holiday Inn Rome, Aurelia, Italy. P.25.
4. Mishyna M., Marchenko I., Makeeva N., Mozgova Yu., Mishyn Yu. Etiologic Structure of Pyelonephritis in Children and Ability of Causative Agents to Form Biofilms. *International Conference on Virology, Bacteriology & Infectious Diseases*. November 26-28, 2018 Holiday Inn Rome, Aurelia, Italy. P.27
5. Mishyna M., Marchenko I., Malanchuk S., Hololobova O. The effect of dnaase activity of *Pseudomonas aeruginosa*, causative agents of pyelonephritis, on the ability to form biofilms. *EUSER 4th International Conference on Medicine and Natural Sciences Published*, 2019 Amsterdam, 26-27 April 2019. P.40.
6. Мішина М.М., Марченко І.А., Маланчук С.Г., Макеєва Н.І., Головачова В.О., Мозгова Ю.А., Мішин Ю.М. Формування біоплівки

- грамнегативними бактеріями, збудниками пієлонефритів у дітей. *Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Актуальні питання сучасної мікробіології та імунології», присвячена 90-річчю акад. А.Я. Циганенка. 24-26 червня 2019 р., Харків. С. 64-65.*
7. Мішина М.М., Марченко І.А., Давиденко В.Б., Мозгова Ю.А., Дубовик О.С. Утворення біоплівки збудниками пієлонефритів у дітей з вродженим гідронефрозом. *Матеріали конференції «Актуальні проблеми мікробіології, вірусології та імунології», присвяченої 100-річчю з дня заснування кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця МОЗ України, 05 листопада 2019, м. Київ, Україна. С. 94-95.*
8. Патент на корисну модель № 139320.МПК (2019.01) А61К 45/00 А 61Р 31/00 Спосіб пригнічення біоплівкоутворення патогенними мікроорганізмами, збудниками гострих пієлонефритів у дітей. Власник ХНМУ, Макєєва Н.І., Мішина М.М., Марченко І.А., Вовк О.О., Мозгова Ю.А., Головачова В.А., Мішин Ю.М. № заяв.у2019 07222, опубл.26.12.2019, Бюл. №24.

РОЗДІЛ 5

ОСОБЛИВОСТІ ІМУННОГО, ЦИТОКІНОВОГО СТАНУ Й АПОПТОЗУ НЕЙТРОФІЛІВ ПРИ ПІЄЛОНЕФРИТАХ У ДІТЕЙ ЗАЛЕЖНО ВІД КЛІНІЧНОЇ ФОРМИ ПЕРЕБІГУ ТА ПРОВІДНОГО ЗБУДНИКА ЗАХВОРЮВАННЯ

В останні роки інтенсивно розробляється концепція важливості ролі імунної системи в розвитку гострого й хронічного пієлонефриту в дітей, однак багато аспектів імунопатогенезу пієлонефритів у дітей залишаються незрозумілими. Тому визначення стану адаптивного і вродженого імунітету залежно від вікової категорії дітей та етіологічного фактора пієлонефриту в них є досить актуальним.

5.1. Особливості змін імунної відповіді при первинних пієлонефритах у дітей залежно від клінічної форми, вікової категорії та збудника захворювання

Під час аналізу результатів проведених досліджень було виявлено, що провідними збудниками гострого та хронічного пієлонефриту в дітей раннього віку (до 3 років) були *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* та *Klebsiella pneumoniae*, а в дітей середнього (від 4 до 7 років) і старшого віку (від 8 до 18 років) – *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*.

Залежно від провідного збудника пієлонефритів у дітей різної вікової категорії було проведено аналіз параметрів клітинного імунітету та встановлено, що вони змінюються в дітей всіх вікових категорій. Так, показники субпопуляцій лімфоцитів з маркерами диференціювання CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD25⁺ та CD95⁺ знижуються в дітей раннього віку, водночас відзначається дисбаланс у клітинній ланці імунітету в дітей середнього та

старшого віку: достовірне підвищення CD95⁺ з одночасним зниженням CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD25⁺ (рис. 5.1).

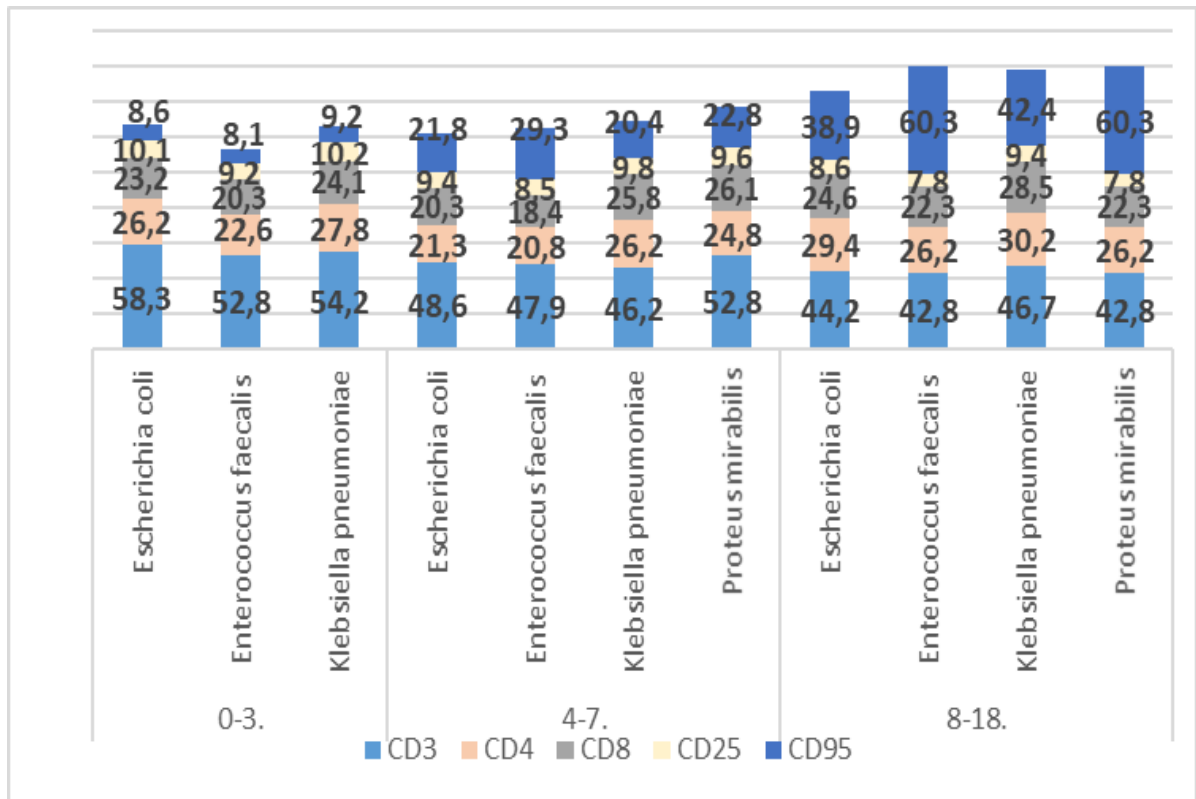


Рисунок 5.1. Параметри клітинної ланки імунітету в дітей з гострою формою пієлонефриту.

Причому найнижчі показники CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD25⁺ спостерігалися в дітей старшого віку, хворих на хронічний пієлонефрит, зумовлений *Enterococcus faecalis* та *Escherichia coli* (рис.5.2).

Аналіз рівнів імуноглобулінів у дітей з гострою формою пієлонефриту продемонстрував, що показник сироваткового IgA був на рівні референтних значень у дітей раннього віку, тоді як у дітей середнього та старшого віку виявлено тенденцію до пригнічення продукування цього імуноглобуліну. Спостерігаємо також тенденцію до підвищення показника IgM у дітей раннього віку; водночас у дітей старших груп цей показник був у межах референтних значень.

У дітей з хронічною формою пієлонефриту спостерігалось пригнічення рівнів IgA та IgM з помірним підвищенням показника IgG.

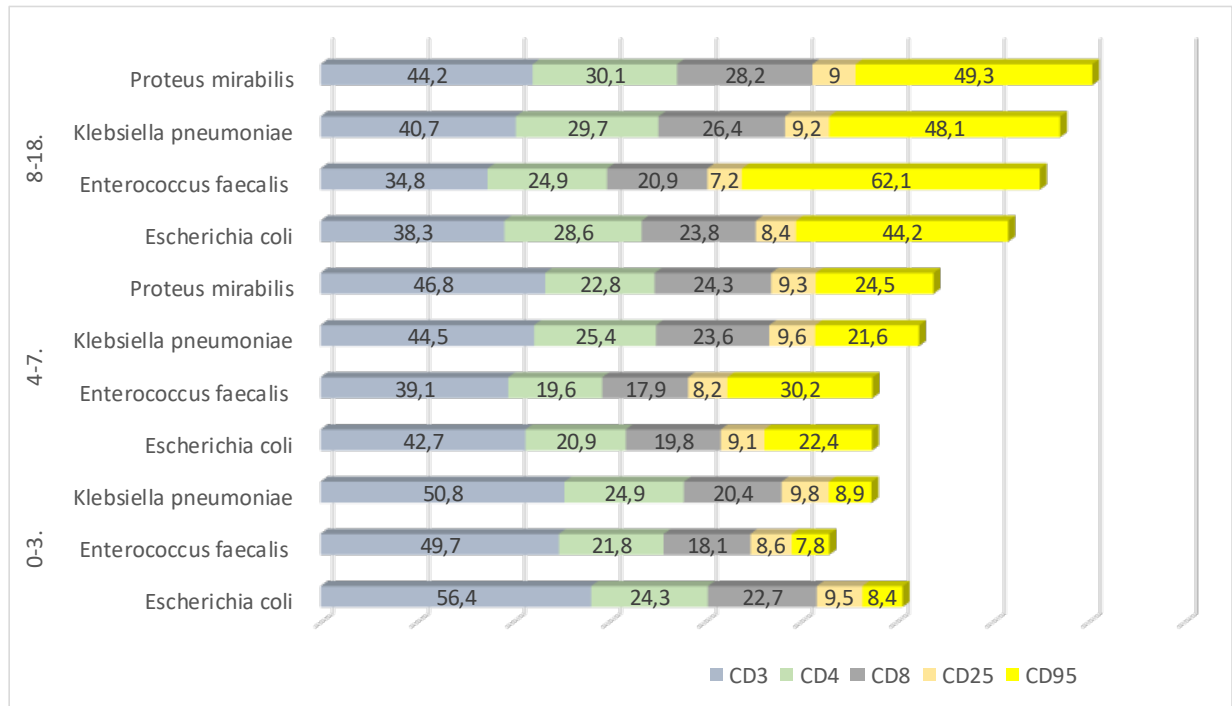


Рисунок 5.2. Параметри клітинної ланки імунітету в дітей з хронічною формою пієлонефриту.

Провідна роль в імунопатогенезі пієлонефриту належить медіаторам запалення, які утворюються в організмі у відповідь на вплив факторів агресії, що продукують мікроорганізми – збудники захворювання. Цитокіни здатні модулювати регуляторні й ефекторні функції клітин. У здоровому організмі існує баланс між цитокінами з прозапальною й протизапальною активністю. Імунна система, що нормально функціонує, перешкоджає безконтрольному виділенню медіаторів запалення й забезпечує адекватну реакцію макроорганізму на інвазію мікроорганізму.

Дослідження прозапального цитокінового статусу в дітей з гострою та хронічною формами пієлонефриту дали змогу виявити достовірне збільшення продукції $IL1\beta$, $IL6$ та $TNF\alpha$ порівняно з референтними значеннями в усіх групах дітей, незалежно від провідного збудника захворювання (рис.5.3).

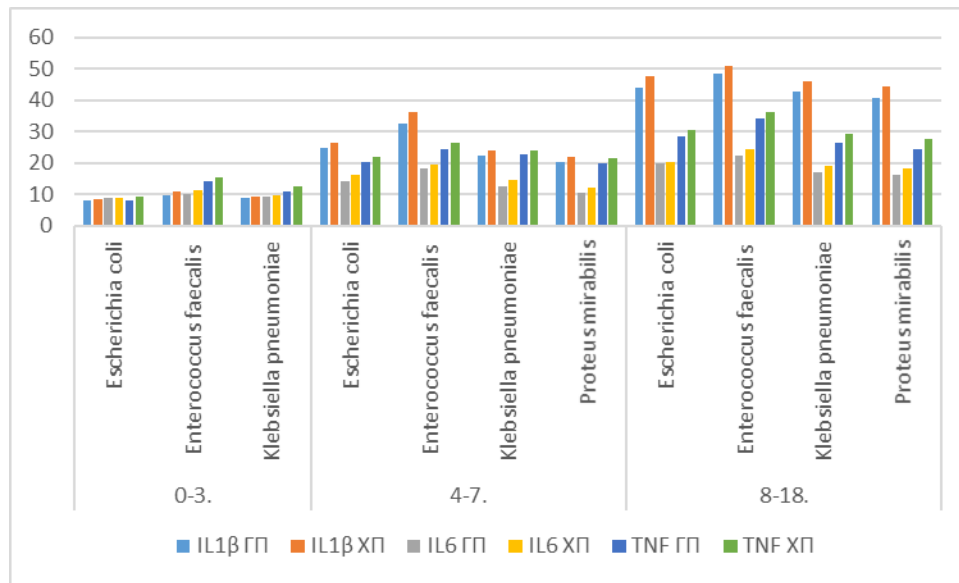


Рисунок 5.3. Параметри прозапального цитокінового статусу в дітей з гострою та хронічною формами пієлонефриту.

Таким чином, параметри цитокінового статусу за рівнями прозапальних цитокінів указують на активну стадію запалення, а тривале підвищення рівня $TNF\alpha$ призводить до розвитку аутоалергічних реакцій, що своєю чергою спричиняє виснаження клітинної ланки імунітету, інгібування процесів неспецифічного захисту організму. Ці процеси є вирішальними у формуванні імунопатологічних механізмів супресії клітинного імунітету на етапах диференціювання та проліферації Т-клітин.

5.2. Визначення стану вродженого й адаптивного імунітету в дітей з пієлонефритом у стадії загострення на тлі вродженого гідронефрозу

Провідними збудниками вторинного пієлонефриту на тлі вродженого гідронефрозу в дітей раннього віку (1-ша група – діти до 3 років) були *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* та *Staphylococcus epidermidis*; середнього віку (2-га група – діти від 4 років до 7) – *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*,

Enterococcus faecalis, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*; старшого віку (3-тя група – діти від 8 до 18 років) – *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans* (рис. 5.4).

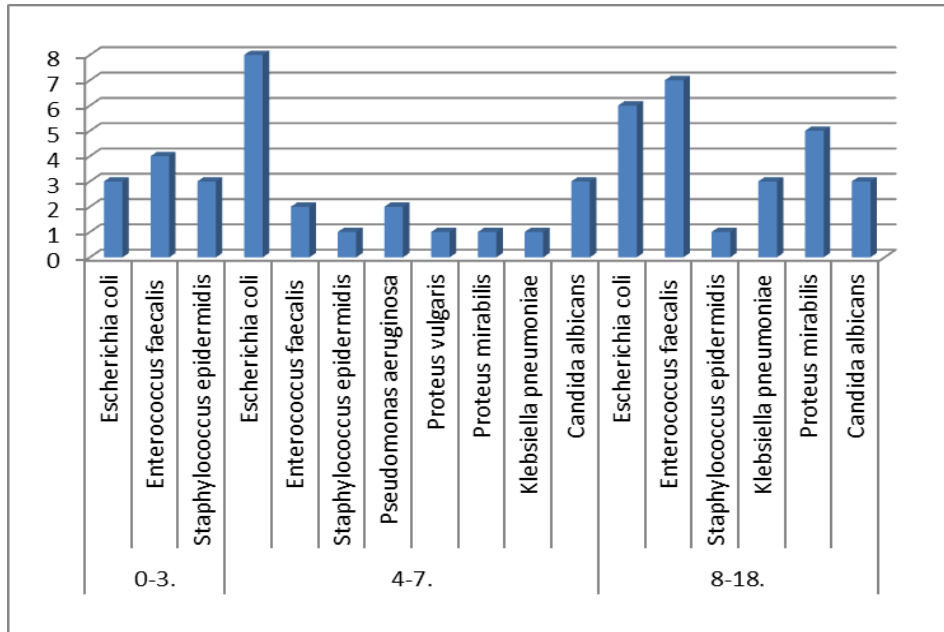


Рисунок 5.4. Провідні збудники пієлонефриту в дітей на фоні гідронефрозу в активній стадії захворювання.

Імунологічні дослідження в дітей з пієлонефритом на фоні вродженого гідронефрозу дали змогу встановити, порівняно з референтними значеннями, що параметри клітинного імунітету змінюються в дітей різних вікових категорій, а саме: статистично значущі зміни незалежно від віку дитини та збудника захворювання відзначаються за кількістю $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ та $CD25^+$, показники яких знижуються. Спостерігається зниження субпопуляції лімфоцитів з маркером диференціювання $CD95^+$ у дітей раннього віку та достовірне підвищення цього показника в дітей середнього та старшого віку (рис. 5.5). Аналіз рівнів імуноглобулінів у дітей з пієлонефритом на фоні гідронефрозу дав змогу встановити, що показник сироваткового IgA суттєво не відрізнявся від референтних значень у дітей раннього віку, а в дітей середнього та старшого віку було виявлено пригнічення продукування цього імуноглобуліну.

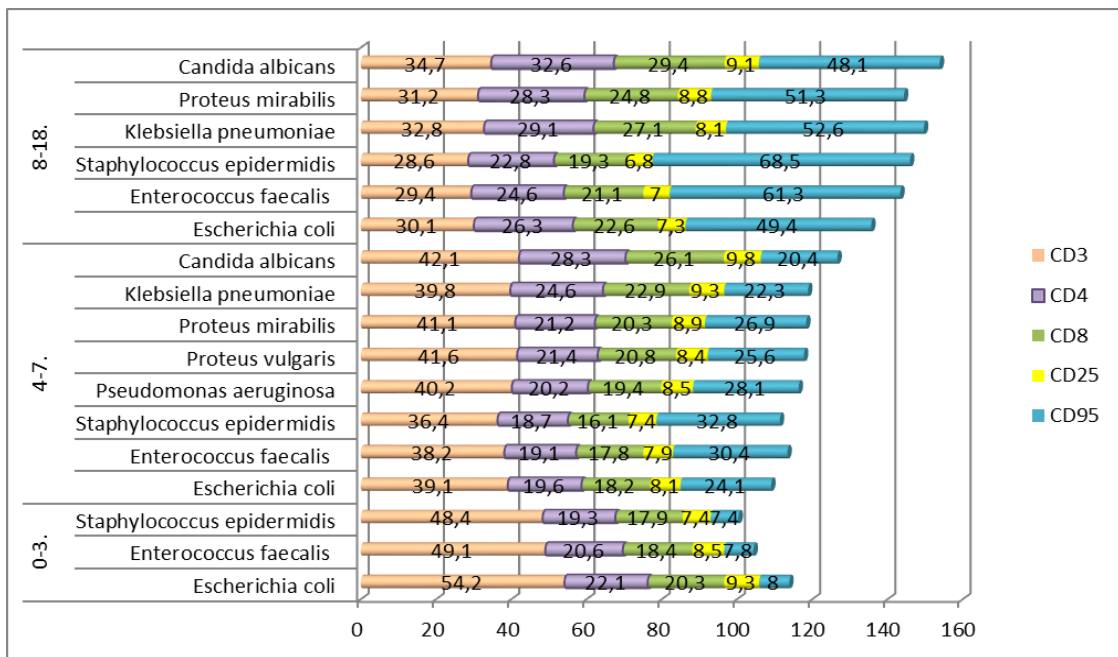


Рисунок 5.5. Параметри клітинної ланки імунітету в дітей з пієлонефритом на фоні гідронефрозу в активній стадії захворювання.

Спостерігається достовірне підвищення показника IgM у дітей 1-ї групи, у дітей 2-ї групи цей показник практично не відрізнявся від референтних значень, а в дітей 3-ї групи відзначалася тенденція до підвищення (рис. 5.6).

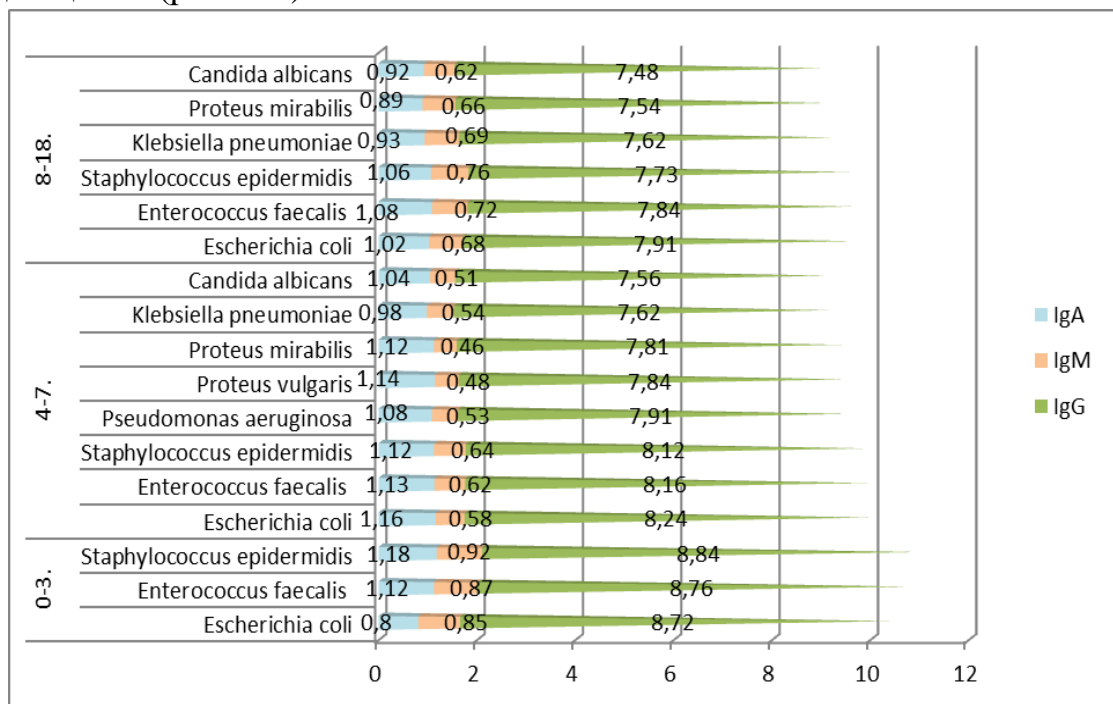


Рисунок 5.6. Параметри імуноглобулінів у дітей з пієлонефритом на фоні вродженого гідронефрозу в активній стадії захворювання.

Провідна роль в імунопатогенезі пієлонефриту на фоні гідронефрозу належить медіаторам запалення, які утворюються в організмі у відповідь на вплив факторів агресії, що продукують мікроорганізми – збудники захворювання. Цитокіни здатні модулювати регуляторні й ефекторні функції клітин. У здоровому організмі існує баланс між цитокінами з прозапальною й протизапальною активністю. Імунна система, що нормально функціонує, перешкоджає неконтрольованому виділенню медіаторів запалення і забезпечує адекватну реакцію макроорганізму на інвазію мікроорганізму.

Дослідження прозапального цитокінового статусу в дітей з пієлонефритом на фоні гідронефрозу дали змогу виявити достовірне збільшення продукування IL1 β , IL6 та TNF α порівняно з референтними значеннями в усіх групах дітей, незалежно від провідного збудника захворювання (рис.5.7).

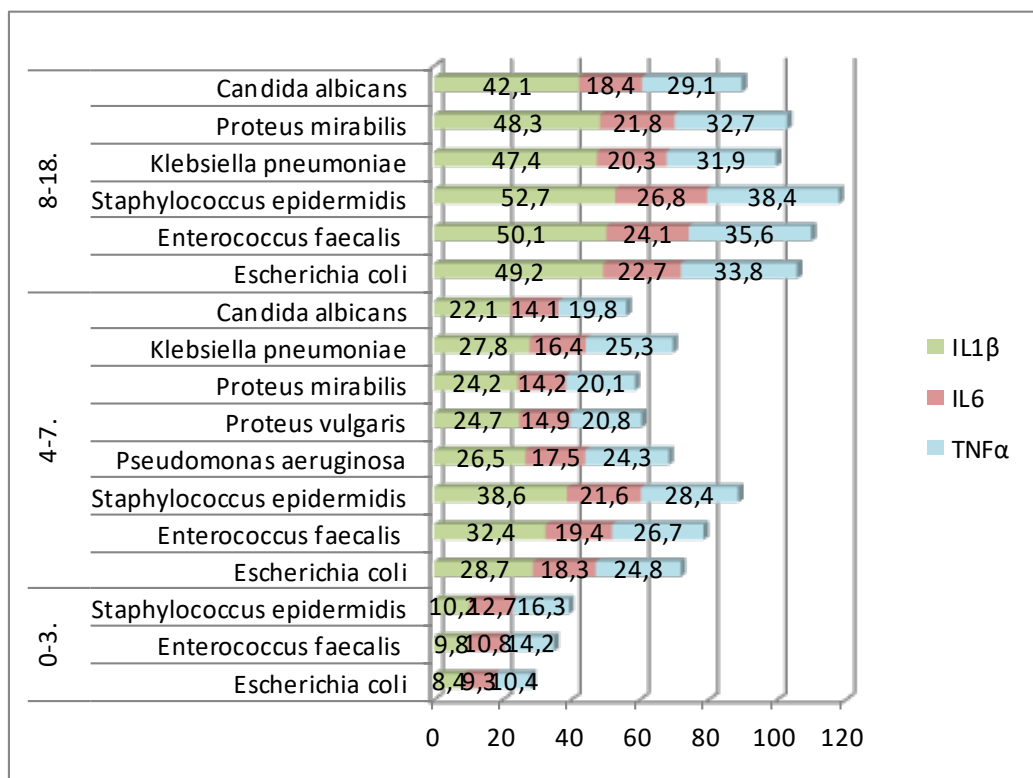


Рисунок 5.7. Параметри прозапального цитокінового статусу в дітей з пієлонефритом на фоні вродженого гідронефрозу в активній стадії захворювання.

Таким чином, параметри цитокинового статусу за рівнями прозапальних цитокінів вказують на активну стадію запалення, а тривале підвищення рівня TNF α на тлі зниженого рівня маркера CD25⁺ призводить до розвитку аутоалергічних реакцій, що своєю чергою спричиняє виснаження клітинної ланки імунітету, інгібування процесів неспецифічного захисту організму. Процеси, що обумовлюють роботу вродженого й адаптивного імунітету, є вирішальними у формуванні імунопатологічних механізмів супресії клітинного імунітету на етапах диференціювання та проліферації Т-клітин.

Одним з важливих параметрів неспецифічного імунітету, які забезпечують захисні властивості організму, є фагоцитоз. Вивчення стану фагоцитарного процесу дає змогу встановити якість імунної неспецифічної відповіді в дітей різного віку.

Унаслідок проведеного дослідження було встановлено, що фагоцитарна кількість нейтрофілів та їхня поглинальна здатність були нижчими від контрольних значень. Так, достовірні зміни відзначено у фагоцитарній активності нейтрофілів. Процент фагоцитуючих клітин у хворих різних груп був набагато нижчим за референтні значення, що свідчить про недостатність ефекторних функцій фагоцитозу в дітей, хворих на пієлонефрит на фоні гідронефрозу в активну стадію перебігу захворювання, та є одним з механізмів низької якості запальної реакції.

Виявлені зміни вказують на пригнічення захисних систем організму (фагоцитарного ланцюга), що може спричинити персистенцію інфекції (у тому числі внутрішньоклітинної), слабку імуногенність і відсутність напруженого імунітету, що клінічно відображується торпідністю перебігу захворювання та повторними захворюваннями (рис. 5.8).

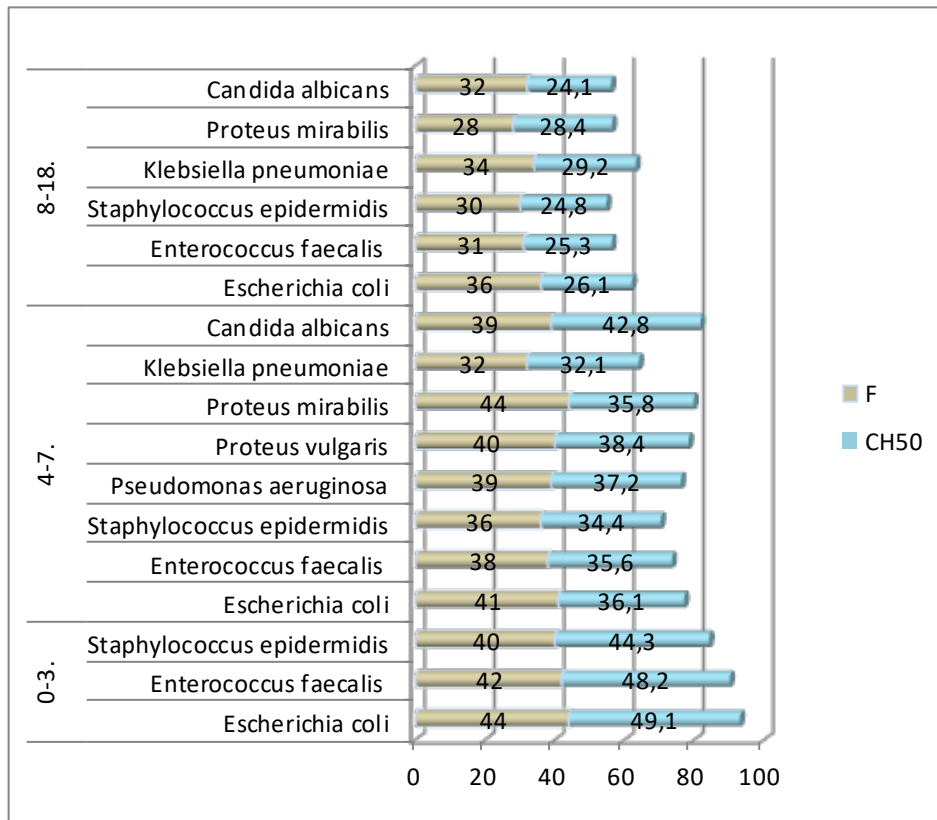


Рисунок 5.8. Показники фагоцитарного індексу та загального комплементу в дітей з пієлонефритом на фоні вродженого гідронефрозу в активній стадії захворювання.

Низька ефективність фагоцитозу може сприяти недостатній елімінації циркулюючих імунних комплексів (ЦІК), свідченням чого є достовірне підвищення рівня ЦІК сироватки крові в дітей з пієлонефритом на фоні гідронефрозу в усіх вікових групах незалежно від збудника захворювання порівняно з показниками дітей контрольної групи.

Найбільш високі показники виявлено в дітей, хворих на пієлонефрит на фоні гідронефрозу в активній стадії, у старшій групі, де провідними збудниками захворювання були переважно *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* та *Klebsiella pneumoniae* (рис. 5.9).

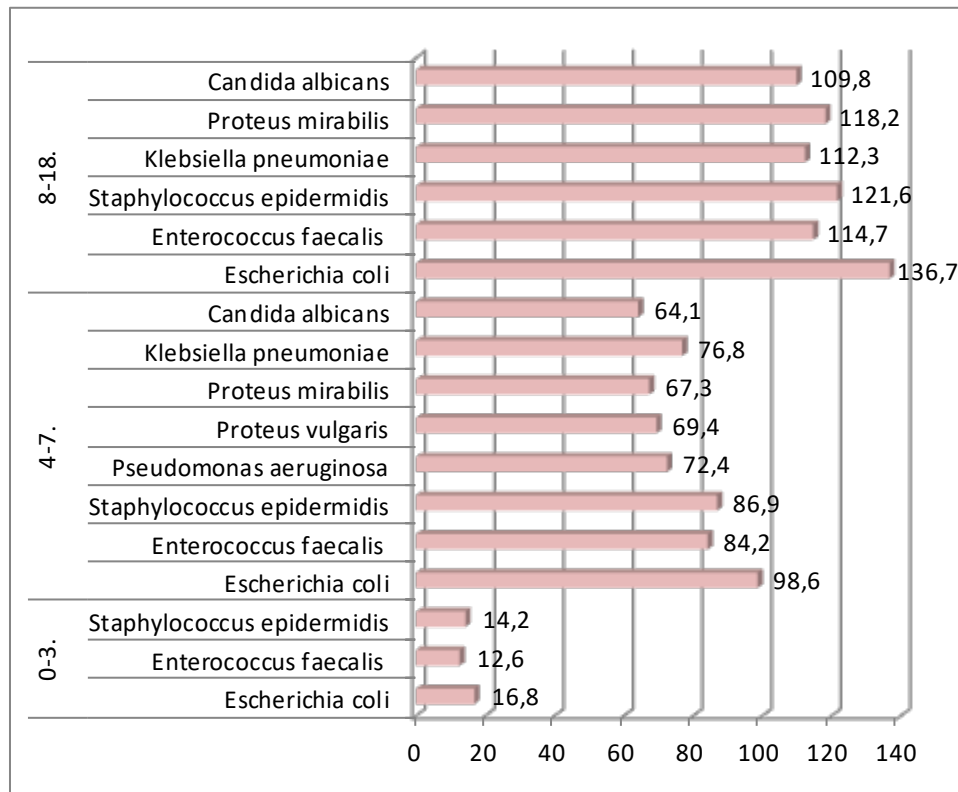


Рисунок 5.9. Параметри ЦіК у дітей з пієлонефритом на фоні вродженого гідронефрозу в активній стадії захворювання.

Цікаво, що серед змін імунного стану в дітей середнього віку з уродженим гідронефрозом, що ускладнений пієлонефритом, зумовленим *Pseudomonas aeruginosa*, в активній стадії захворювання реєструвалися виражені зміни параметрів імунологічної реактивності. Зміни показників клітинної ланки імунітету проявлялися в зменшенні відносної кількості Т-лімфоцитів, CD4-лімфоцитів у крові й імунорегуляторного індексу CD4/CD8, а зміни показників гуморального ланки імунітету обумовлені зменшенням відносного і абсолютного числа В-лімфоцитів у крові, зниження рівня IgG і тенденції до підвищення рівня IgM й достовірного підвищення концентрації ЦіК в сироватці крові. Водночас у дітей з уродженим гідронефрозом, ускладненим пієлонефритом, в активній стадії захворювання констатувалися ознаки зниження неспецифічної антибактеріальної резистентності: виражене зниження показників індексу активності нейтрофілів, фагоцитарного числа і різко виражене підвищення рівнів прозапальних цитокінів (IL-1 β , IL-6 і TNF- α) у сироватці крові.

При визначенні стану ключових компонентів системи комплементу в дітей залежно від вікової категорії та провідних збудників було встановлено, що в дітей молодшого віку з уродженим гідронефрозом, який ускладнений пієлонефритом, зумовленим моноінфекцією *E.coli*, спостерігалось підвищення значення компонентів комплементу на системному рівні: C3 – в 1,5 раза, C4 – в 1,3 та C5 – в 1,9 раза порівняно з групою контролю, а на локальному рівні: C3 – в 1,6 раза, C4 – у 2,3 та C5 – в 1,4 раза, а при *Enterococcus faecalis* – пієлонефриті: C3 – в 1,6 раза, C4 – в 1,4 та C5 – в 1,8 раза на системному рівні та C3 – в 1,8 раза, C4 – у 2,4 та C5 – в 1,5 раза (рис. 5.10) на локальному рівні, що свідчить про активацію системи комплементу як за класичним, так і за альтернативним шляхами.

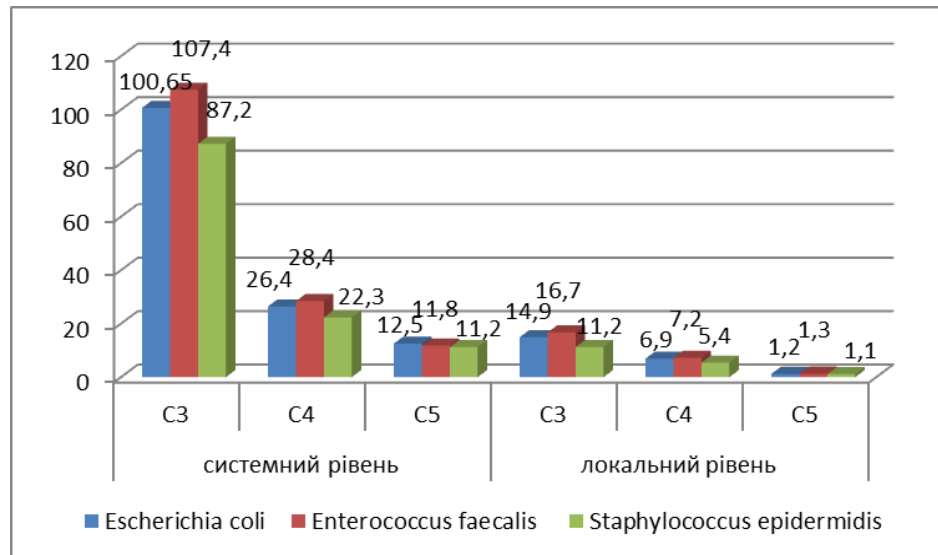


Рисунок 5.10. Параметри компонентів комплементу в дітей раннього віку з пієлонефритом на фоні вродженого гідронефрозу в активній стадії захворювання.

При аналізі результатів зміни рівнів компонентів комплементу в дітей середнього (рис. 5.11) та старшого віку (рис. 5.12) було виявлено зниження всіх показників як на системному, так і на локальному рівнях, особливо в дітей старшого віку, що свідчить про виснаження роботи системи комплементу при тривалому активному перебігу захворювання.

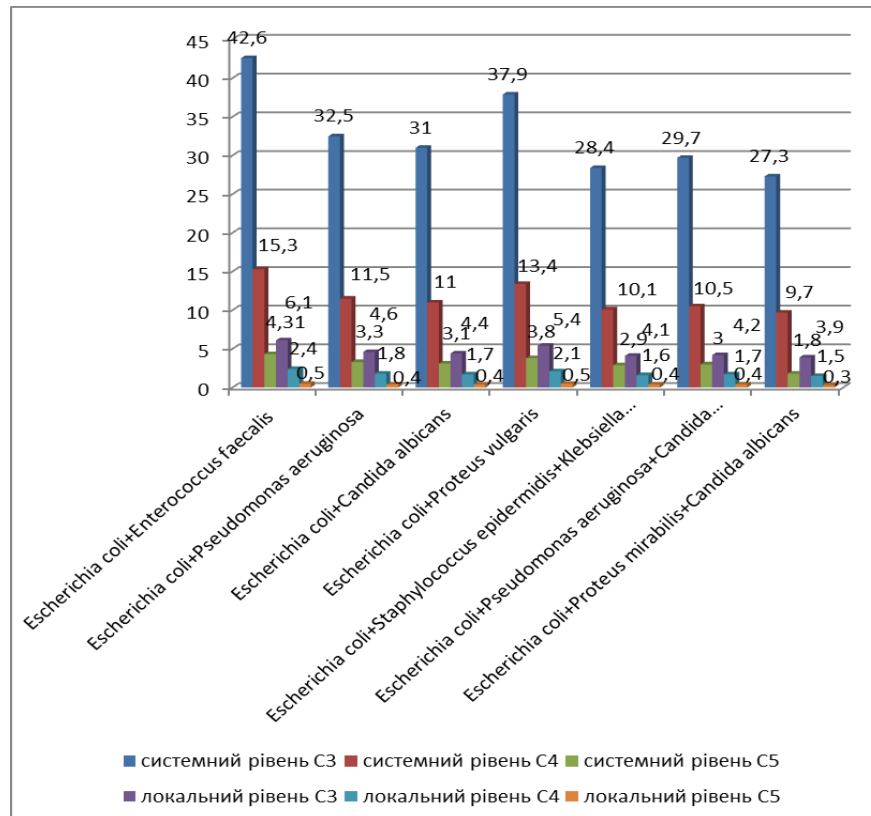


Рисунок 5.11. Параметри компонентів комплементу в дітей середнього віку з пієлонефритом на фоні вродженого гідронефрозу в активній стадії захворювання.

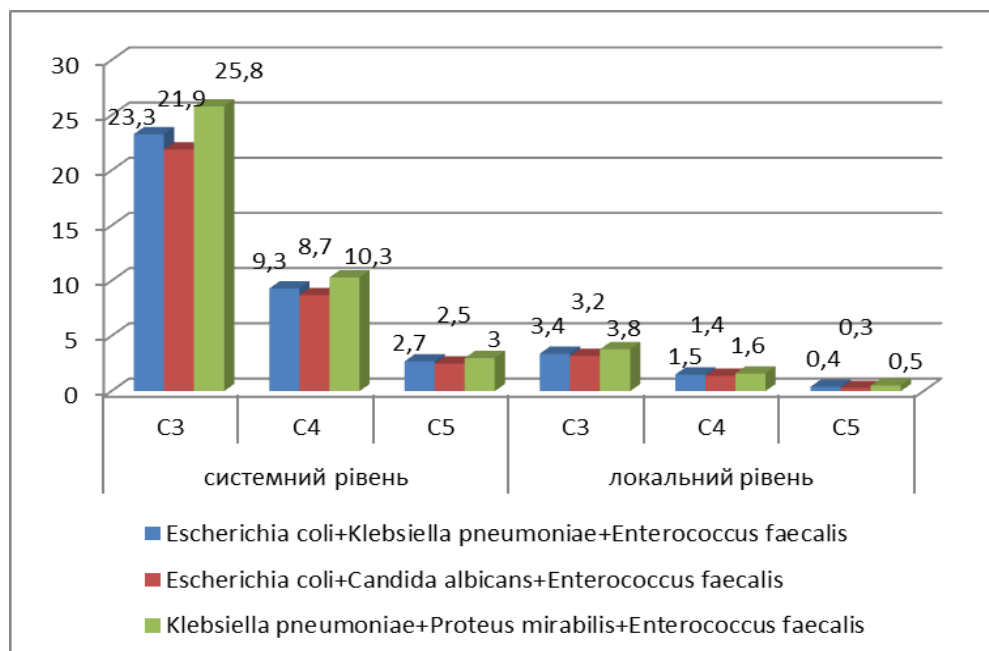


Рисунок 5.12. Параметри компонентів комплементу в дітей старшого віку з пієлонефритом на фоні вродженого гідронефрозу в активній стадії захворювання.

Слід зазначити, що в усіх дітей середнього та старшого віку пієлонефрит на фоні вродженого гідронефрозу був зумовлений змішаною інфекцією, особливо в дітей з ПН-ВГН, що спричинений *Escherichia coli*+ *Proteus mirabilis*+ *Candida albicans*, показники С3, С4 та С5 знижувалися у 2,5 раза як на системному, так і на локальному рівнях, а в дітей старшого віку з ПН-ВГН, що зумовлений *Escherichia coli* + *Klebsiella pneumoniae* + *Proteus mirabilis* + *Candida albicans*, – у 3,6 раза порівняно з контрольними значеннями.

Отже, при порівняльному аналізі імунологічних параметрів клітинних, гуморальних факторів імунітету, фагоцитарної ланки імунної системи і прозапального цитокінового профілю в дітей з пієлонефритом на фоні гідронефрозу в активній стадії захворювання, вивченні їхньої участі та значення внеску кожного в розвиток патологічного процесу було виявлено певні особливості імунопатогенезу: встановлено дефіцит показника активності системи комплементу (СН50) у дітей середньої та старшої вікової категорії. У дітей молодшого віку достовірно показано участь СН50 у механізмах елімінації ЦК, що перешкоджає надмірному накопиченню імунних комплексів і, відповідно, пошкодженню органів і тканин. Тому даний дефект імунної відповіді в дітей середнього та старшого віку можна вважати результатом порушення секретуючої функції макрофагів, що виробляють СН50.

Таким чином, цитотоксична дія збудників на лімфоцити, що призводить до лімфопенії, може свідчити про пригнічення та функціональну неповноцінність клітинної імунної відповіді в цілому.

Крім того, опосередковано за значення специфічного поверхневого рецептора CD95⁺ було вивчено стан апоптозу імунних клітин. У дітей середньої та старшої вікової категорії з пієлонефритом на фоні гідронефрозу в активній стадії захворювання встановлено виражений дисбаланс клітинної ланки імунної системи, за якої рівень Т-лімфоцитів, що містить на поверхні своєї мембрани рецептори CD95⁺, значно перевищує референтні значення. Це

свідчить про активацію запрограмованої загибелі лімфоцитів. Відповідно, посилення апоптозу призводить до подальших глибоких змін і прогресування вже наявного дефіциту Т-лімфоцитів, а також дисбалансу всіх ланок імунної системи.

Одночасно зафіксовано зниження експресії маркера CD25⁺ на поверхні Т-клітин. Виявлене зниження рівня імунорегуляторних CD4⁺ й CD25⁺ Т-регулюючих лімфоцитів у периферичній крові дітей з пієлонефритом на фоні гідронефрозу може свідчити про розвиток аутоімунного запалення. Таким чином, процеси активації апоптозу при вираженому Т-клітинному дефіциті є важливим патогенетичним аспектом при пієлонефриті на фоні гідронефрозу в дітей середнього та старшого віку.

Слід зазначити, що зміни клітинних чинників імунітету в дітей з пієлонефритом на фоні гідронефрозу відповідають процесам, характерним для запальних процесів мікробного генезу в цілому: виражений дефіцит абсолютної кількості лейкоцитів, лімфоцитів, клітин з фенотипами CD3⁺, CD4⁺ CD8⁺, а також знижене значення індексу імунорегуляції (CD4⁺/CD8⁺), який є важливим показником гармонійної функції імунної системи.

Отже, унаслідок проведеного дослідження відзначено порушення в складі клітинної, гуморальної, фагоцитарної ланок і прозапального цитокінового балансу, спричинене антигенними факторами провідних збудників пієлонефриту на тлі гідронефрозу. Можна констатувати, що при пієлонефриті в дітей на тлі гідронефрозу в стадії активного процесу наявний складний дефект фагоцитарної ланки імунної системи, що призводить до недостатності даного компонента імунітету. У дітей з пієлонефритом на фоні гідронефрозу виявляється високий рівень прозапальних IL-1 β , IL-6, TNF α -цитокінів у крові. Формування пієлонефриту на тлі вродженого гідронефрозу супроводжується порушенням механізмів адаптивного імунітету, тому моніторинг імунологічних показників продемонстрував зниження значень клітинної ланки імунітету: функціональної активності Т-лімфоцитів, абсолютної кількості Т-лімфоцитів (CD3⁺), Т-хелперів (CD4⁺), природних

регуляторних клітин для виключення аутоагресії (CD4⁺), Т-клітин із цитотоксичним ефектом (CD8⁺) у всіх вікових групах дітей незалежно від збудника захворювання. Згідно з поширеною думкою, після інфікування уrogenітального тракту розвивається гострий пієлонефрит, у якому активну участь беруть Т-лімфоцити, що мігрують з периферичного кровотоку в зону первинного запалення. Найбільш активний потенціал при цьому мають штами *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* і *Klebsiella pneumoniae*. У дітей з пієлонефритом на фоні вродженого гідронефрозу виявлено зміни в гуморальній ланці імунітету, які характеризувалися дисбалансом IgA, IgM, IgG: зниження рівня IgG у дітей середньої та старшої вікової категорії при нормальному рівні IgM у дітей середнього віку і незначному підвищенні даного показника в дітей старшого віку. Водночас у дітей молодшого віку зафіксовано підвищення рівнів IgA, IgM, IgG в активній фазі процесу. Збільшення концентрації ЦК є непрямим доказом активності захворювання і свідчить про його тяжкість. Таким чином, не викликає сумніву наявність імунних механізмів у дітей з пієлонефритом на фоні вродженого гідронефрозу; аутоімунний синдром провокується пошкодженням мембран власних клітин і сенсibiliзацією до компонентів клітин; антигени інфекційного збудника мімікують. Постінфекційний аутоімунний синдром у поєднанні з вторинним імунодефіцитом є більш важким станом, оскільки включає не тільки аутоагресію, але й недостатність факторів і компонентів різних форм імунної відповіді, що проявляється тяжким перебігом пієлонефриту в дітей з уродженим гідронефрозом. Наявний імунодефіцитний стан створює умови для прогресування хвороби, стимулює інші патогенетичні фактори захворювання. З розвитком інфекційно-запального процесу ускладнюється імунологічна недостатність, що пов'язано не тільки з персистуванням мікроорганізмів, їхніх токсинів, а також з виснаженням резервів імунної системи.

Таким чином, у зв'язку з етіологічною особливістю вторинного пієлонефриту на тлі вродженого гідронефрозу у реалізації імунного захисту

при даній патології велику роль відіграють насамперед фактори вродженого імунітету, меншою мірою – механізми адаптивного імунітету, хоч, як і при більшості захворювань інфекційно-запального генезу, цей поділ часто є відносно умовним через тісну взаємодію і спільність їхніх механізмів. Прояв функцій уродженого імунітету при вторинному пієлонефриті на тлі вродженого гідронефрозу в дітей в активну стадію захворювання здійснюється в ході запальної реакції, що є відповіддю на пошкодження мембран клітин при альтерації і проникненні чужорідних агентів, патогенних або умовно-патогенних бактерій.

5.3. Визначення здатності утворення NETs у дітей різного віку з пієлонефритами залежно від клінічної форми, вікової категорії та збудника захворювання

5.3.1. Визначення здатності до утворення NETs у дітей з первинними пієлонефритами

При застосуванні люмінесцентної мікроскопії було виявлено, що нейтрофіли здатні формувати позаклітинні пастки (рис.5.13) для антигенних стимуляторів. Однак кількість антигенів у NETs була різною залежно від збудників, що викликали пієлонефрит.

Так, у дітей раннього віку з гострим пієлонефритом, зумовленим *Enterococcus faecalis*, відзначалося збільшення кількості антигенів у NETs ($27,5 \pm 2,3$ ум.од.), дещо нижчими були показники при ГПН, зумовленому *Escherichia coli*, – антигенів у NETs – $18,0 \pm 1,7$ ум.од., а при ГПН, зумовленому *Klebsiella pneumoniae*, – $15,0 \pm 2,5$ ум.од., що свідчить про зміну активності фагоцитарної ланки імунного захисту в дітей з гострим пієлонефритом в активній фазі. Зниження показника кількості спожитих антигенів *Klebsiella pneumoniae* в NETs обумовлено утворенням капсули.

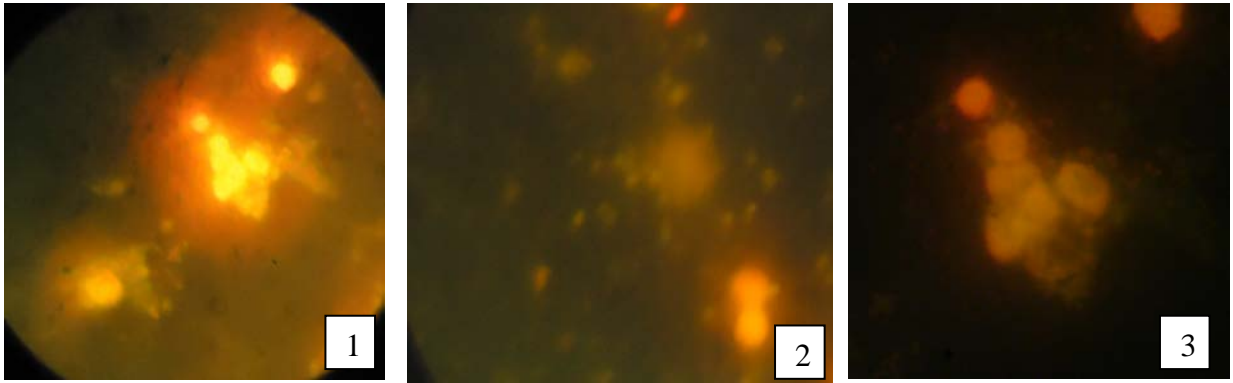


Рисунок 5.13. Формування NETs у дітей раннього віку з гострою формою пієлонефриту, зумовленого *Enterococcus faecalis* (1), *Escherichia coli* (2), *Klebsiella pneumoniae* (3).

У дітей середнього та старшого віку кількість антигенів у NETs збільшується й дорівнює: при ГПН, зумовленому *Escherichia coli*, – $18,7 \pm 0,6$ од. і $21,2 \pm 0,8$ од. відповідно, при ГПН, зумовленому *Enterococcus faecalis*, – $29,5 \pm 0,5$ од. й $30,4 \pm 0,6$ од. відповідно, при ГПН, зумовленому *Klebsiella pneumoniae*, – $17,2 \pm 0,8$ од. й $19,5 \pm 0,5$ од. відповідно, при ГПН, зумовленому *Proteus mirabilis*, – $18,5 \pm 0,5$ од. й $22,5 \pm 0,7$ од. відповідно (рис. 5.14).

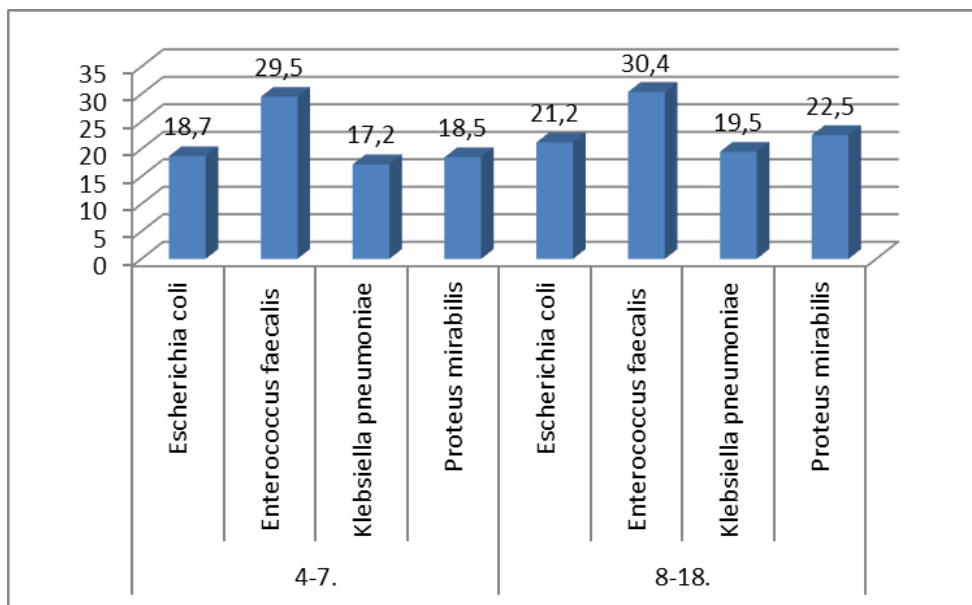


Рисунок 5.14. Кількість антигенів в NETs у дітей середнього та старшого віку з гострою формою пієлонефриту.

При визначенні показників кількості антигенів у NETs у дітей з хронічною формою пієлонефриту залежно від провідних збудників захворювання було встановлено їхнє зниження порівняно з аналогічними показниками в дітей з гострою формою пієлонефриту (рис. 5.15).

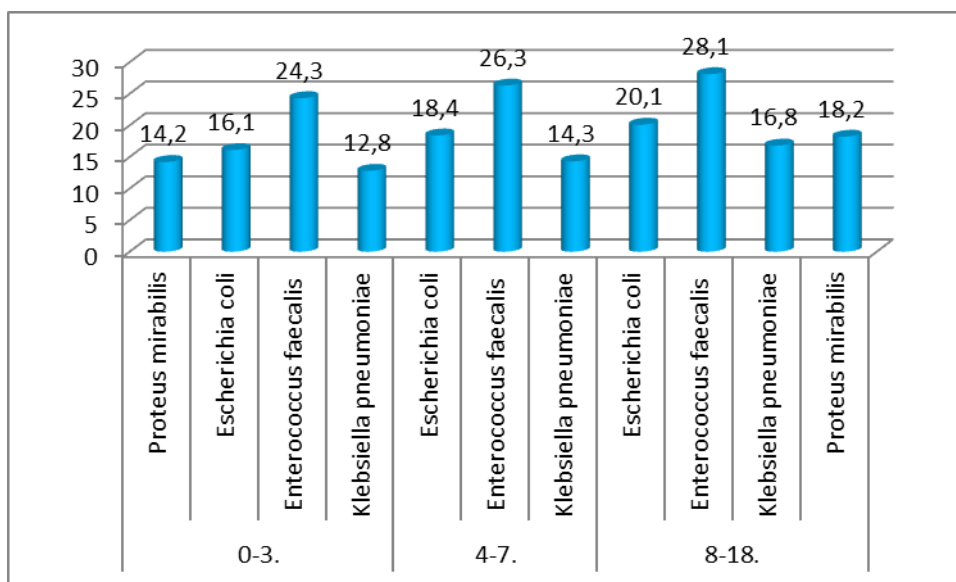


Рисунок 5.15. Кількість антигенів у NETs у дітей з хронічною формою пієлонефриту.

Проте, аналогічно до показників дітей з ГПН, значення кількості антигенів у NETs збільшувалися (рис. 5.16) з віком дитини, незалежно від провідного збудника захворювання.

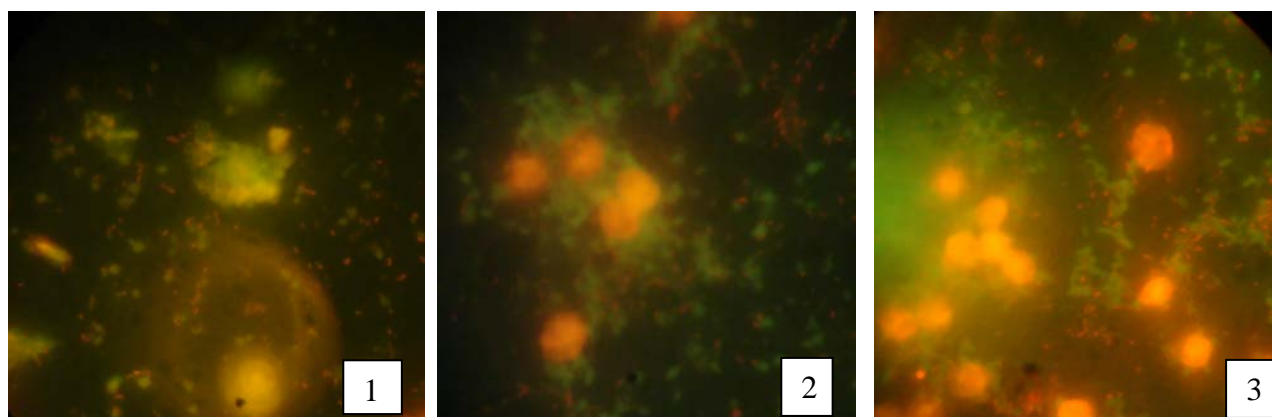


Рисунок 5.16. Формування NETs у дітей з хронічною формою пієлонефриту, зумовленого *Escherichia coli* раннього віку (1), середнього віку (2), старшого віку (3).

5.3.2. Визначення здатності до утворення NETs у дітей різного віку з вторинним пієлонефритом на фоні вродженого гідронефрозу в активній стадії перебігу захворювання.

При визначенні показників кількості антигенів у NETs у дітей з вторинним пієлонефритом на фоні вродженого гідронефрозу було виявлено, що вони достовірно зростають порівняно з аналогічними значеннями в дітей з первинним пієлонефритом, причому з віком дитини показники кількості антигенів в NETs збільшуються (рис. 5.17, рис. 5.18).

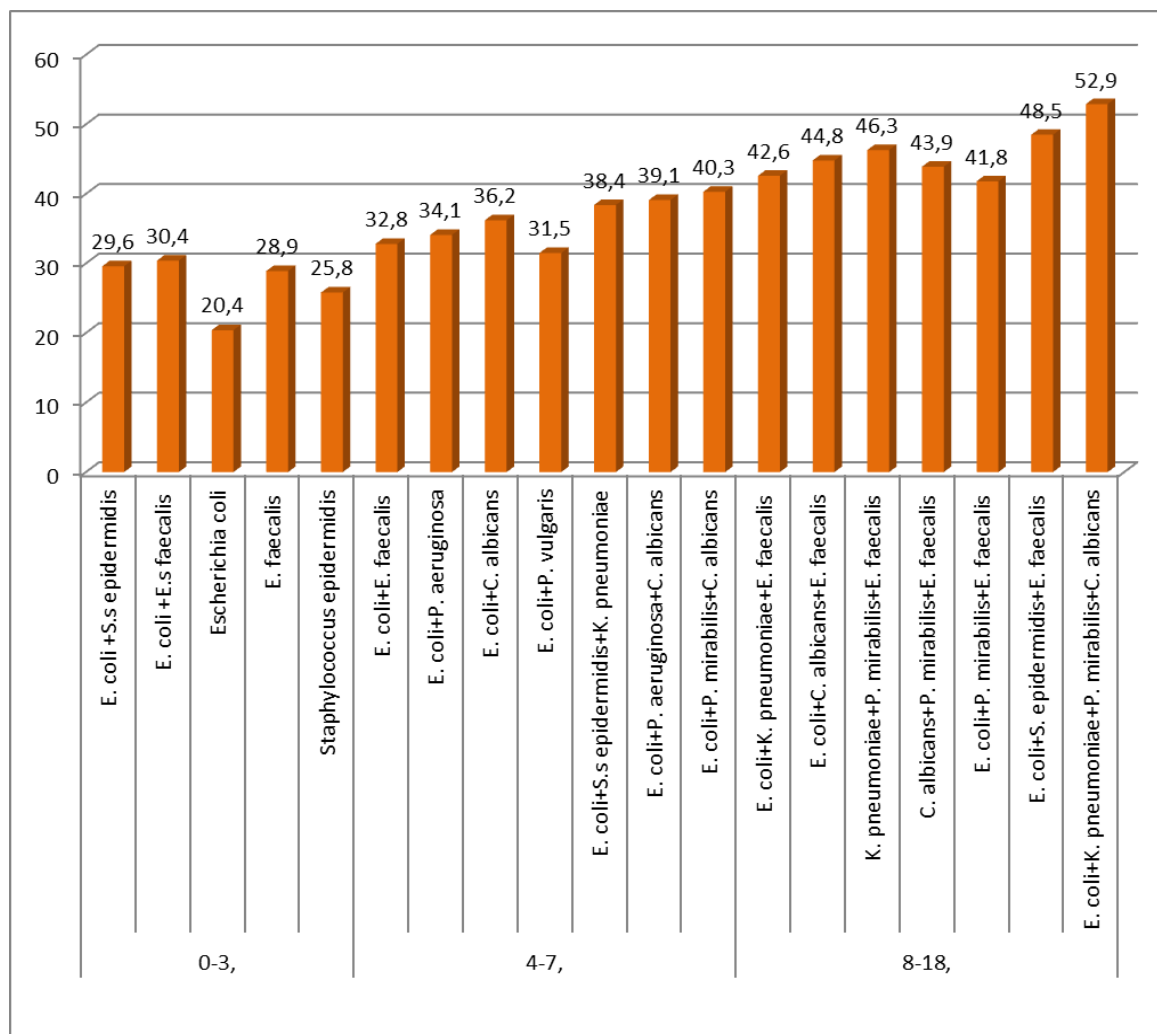


Рисунок 5.17. Кількість антигенів у NETs у дітей із вторинним пієлонефритом на фоні вродженого гідронефрозу.

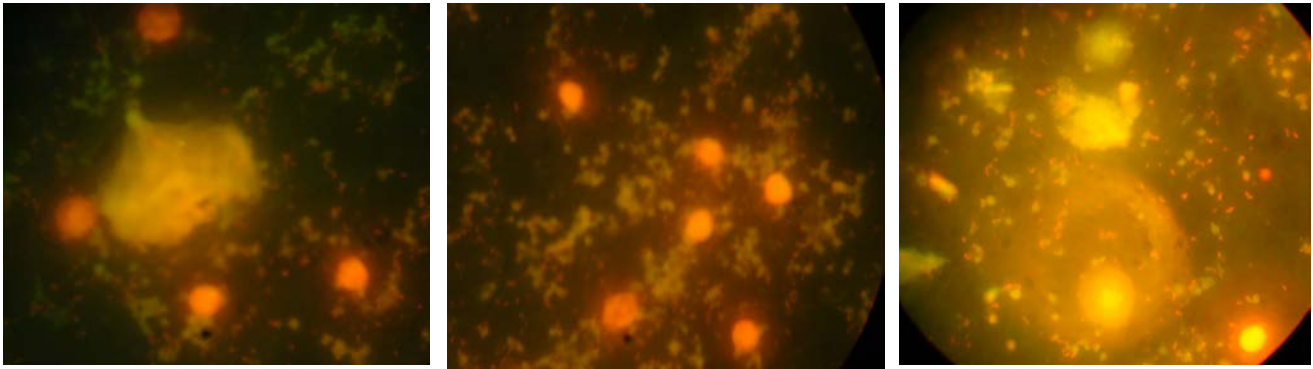


Рисунок 5.18. Формування NETs у дітей ПН-ВГН: раннього віку – моноінфекція *Escherichia coli* (1), середнього віку – змішана інфекція *Escherichia coli*+*Enterococcus faecalis* (2), старшого віку – змішана інфекція *Escherichia coli* + *Klebsiella pneumoniae*+*Enterococcus faecalis* (3).

Отже, під час проведеного дослідження встановлено, що в дітей з пієлонефритом нейтрофіли здатні формувати NETs та захоплювати антигени. Цей процес залежить від етіологічного чинника, клінічної форми захворювання та від віку дитини.

5.4. Визначення функціональної активності нейтрофільних гранулоцитів при пієлонефриті в дітей різного віку залежно від утворення біоплівки провідними збудниками

Проведене дослідження продемонструвало, що основні показники функціональної активності нейтрофілів у дітей з ХПН у фазі загострення характеризувалися такими змінами: за параметрами поглинальної здатності нейтрофілів встановлено зниження показника ФЧ у дітей усіх вікових категорій, провідними збудниками хронічного пієлонефриту були ентеробактерії (рис. 5.19).

Активне формування позаклітинних нейтрофільних пасток спостерігалось в дітей старшої вікової категорії.

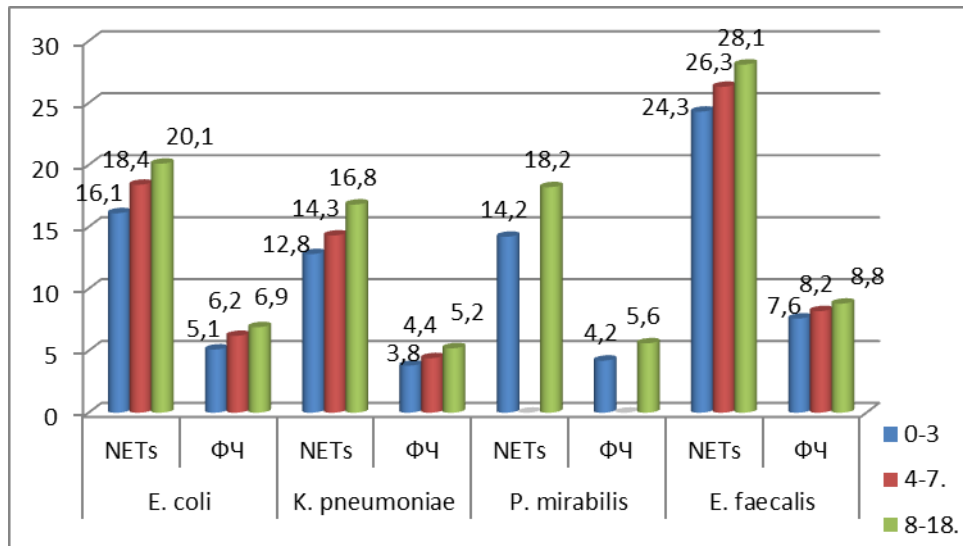


Рисунок. 5.19. Показники активності захвату антигенів нейтрофілами (ФЧ та вміст антигенів в NETs) залежно від збудника хронічного пієлонефриту в дітей різного віку.

При визначенні показників апоптозної готовності нейтрофілів у дітей з ХПН встановлено (рис. 5.20), що кількість живих клітин була найвищою в дітей середнього віку (4–7 років), провідним збудником пієлонефриту був *Enterococcus faecalis*, та старшого віку (8–18 років), збудником пієлонефриту був *Proteus mirabilis*.

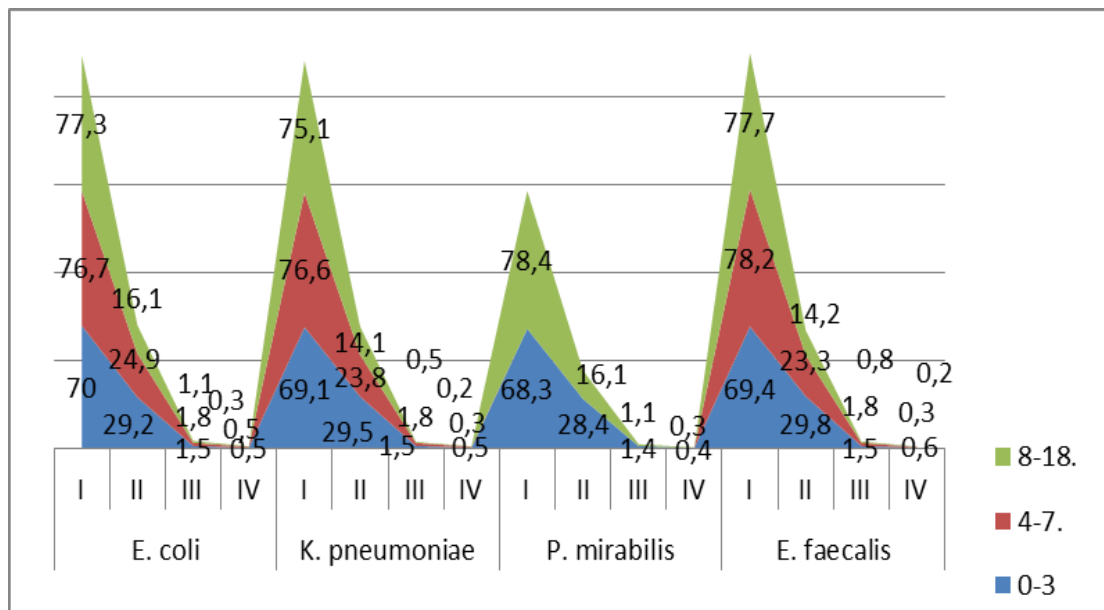


Рисунок 5.20. Інтегральні показники апоптозу нейтрофілів залежно від провідного збудника хронічного пієлонефриту в дітей різного віку.

Проведений аналіз здобутих даних дає змогу встановити, що збудники ХПН активно формують біоплівки підвищеної щільності у дітей старшої вікової категорії з активним захопленням антигенів нейтрофілами.

Однак виявлено, що в дітей з ХПН, зумовленим *Klebsiella pneumoniae*, при досить високій щільності біоплівок, показники інтенсивності фагоцитозу є найнижчими. Показники ФЧ є досить високими при ХПН, зумовленому *Enterococcus faecalis*, проте й рівень щільності біоплівок теж є досить високим і достовірно не відрізняється від аналогічних показників при ХПН, зумовленому *Klebsiella pneumoniae* (рис.5.21).

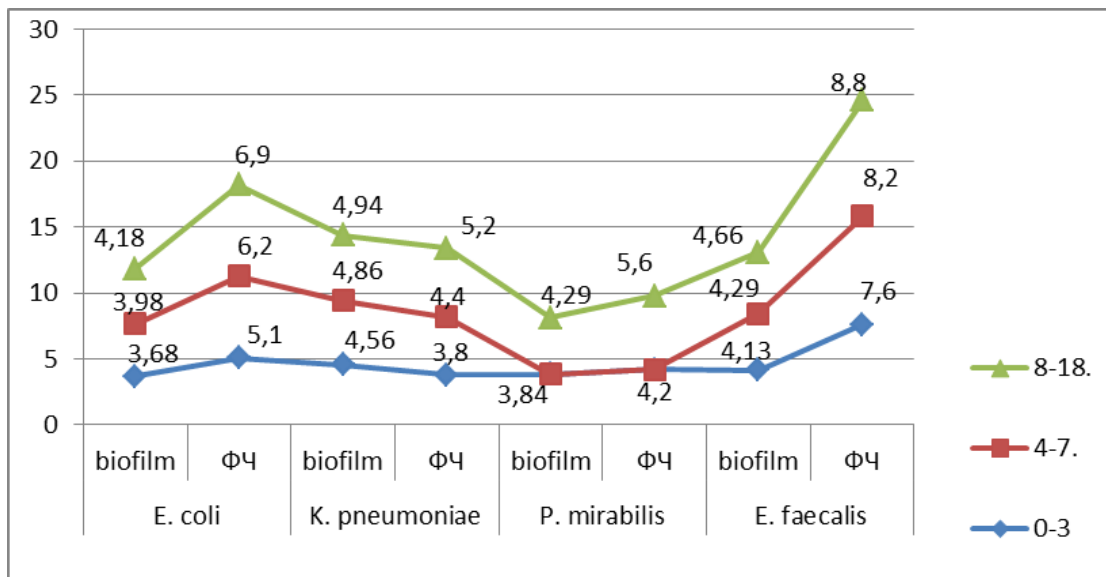


Рисунок 5.21. Показники активності захвату антигенів нейтрофілами (ФЧ) залежно від щільності біоплівок мікроорганізмів, провідних збудників хронічного пієлонефриту в дітей різного віку.

Аналогічні дані було отримано при зіставленні показників формування біоплівок провідними збудниками ХПН і формуванням нейтрофільних позаклітинних пасток. Установлено таку саму закономірність, як і при фагоцитарному процесі: у момент загибелі (III стадія апоптозу нейтрофілів) нейтрофіли формують NETs та в дітей старшого віку з ХПН при підвищенні щільності біоплівок збільшується показник умісту антигенів у NETs, тобто

здатність нейтрофілів у момент загибелі до захоплення більшої кількості збудників ХПН (рис. 5.22).

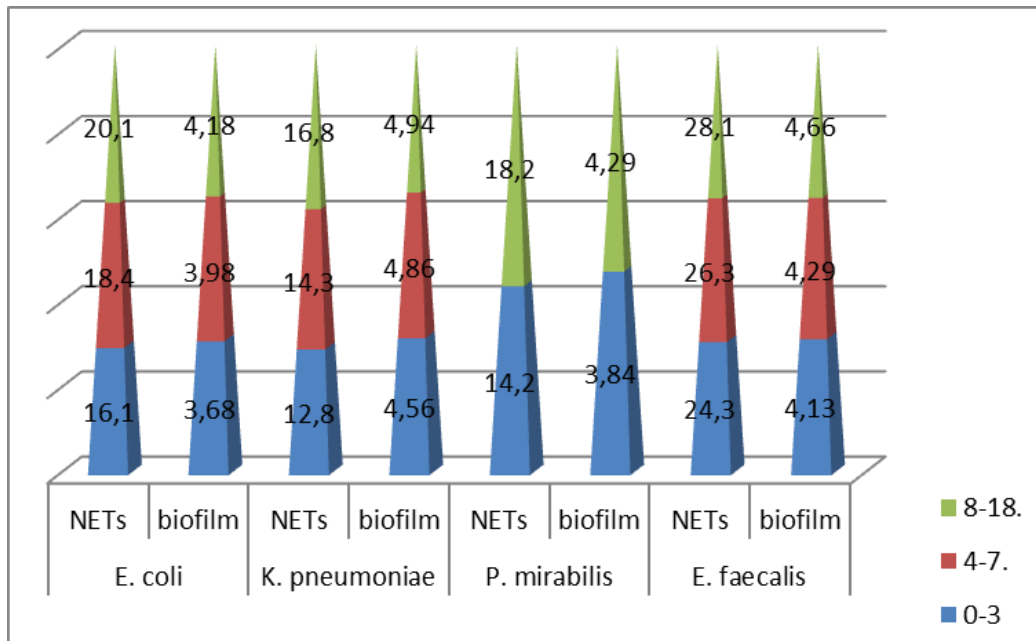


Рисунок 5.22. Показники захвату антигенів NETs залежно від щільності біоплівок мікроорганізмів, збудників хронічного пієлонефриту в дітей різного віку.

Однак при аналізі здатності до формування щільних біоплівок провідними збудниками ХПН у дітей і захоплення антигенів NETs виявлено, що вміст антигенів у NETs більший при ХПН, зумовленому *E. faecalis*, а біоплівки високої щільності формують *K. pneumoniae* (рис.5.23), особливо в дітей старшого віку.

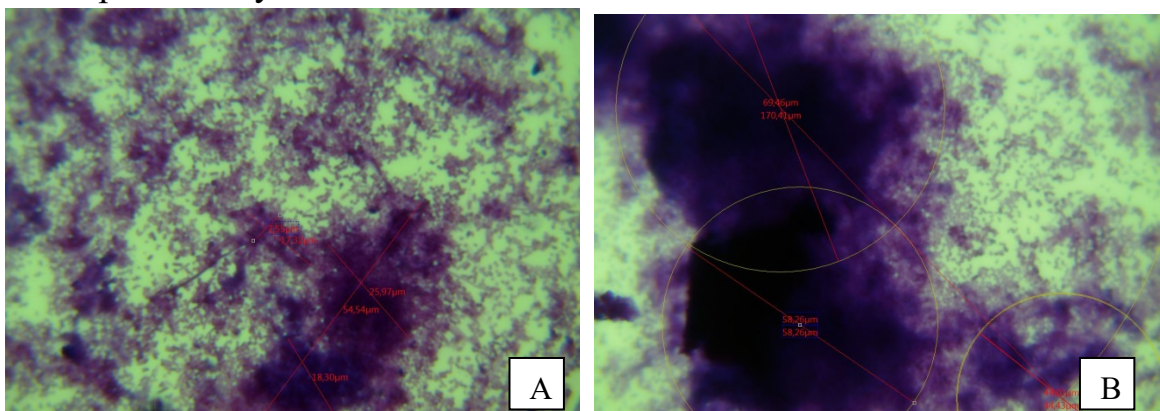


Рисунок 5.23. Сформовані високої щільності біоплівки *K. pneumoniae*, збудників хронічного пієлонефриту в дітей середнього (А) та старшого віку (В).

5.5. Визначення патогенетичної ролі апоптозу нейтрофілів при пієлонефритах у дітей залежно від клінічної форми, вікової категорії та збудника захворювання

5.5.1 Особливості модуляції апоптозу нейтрофілів у дітей з первинними пієлонефритами

В останні роки уявлення про механізми програмованої загибелі клітин кардинально змінилося, що дало змогу виділити в самостійні форми фагоцитоз, некроз й апоптоз, опосередкований презентацією кластерних молекул або сигналів загибелі на мембрані клітини. Таким чином, особливого значення набуває відкриття феномену апоптозу клітин, унаслідок чого встановлено, що генетична програма в клітинах організму, яка забезпечує їхній життєвий цикл, при певних фізіологічних чи патологічних умовах запускає процес апоптозу, тобто програмованої загибелі клітин. У розвитку апоптичного процесу бере участь велика кількість сигнальних молекул, більшість з яких регулюють й інші важливі функції організму [47].

У літературних джерелах наведено переконливі докази існування взаємозв'язку між порушеннями процесу апоптозу й розвитком пієлонефриту, що призводить до зниження ефективності імунної відповіді, показано механізми імунодепресії, пов'язані з індукцією апоптозу лімфоцитів периферичної крові [99, 104]. Відомо, що надмірне накопичення апоптичних клітин унаслідок порушення їхньої утилізації фагоцитами за участю комплементу призводить до того, що власні антигени клітин розпізнаються як чужорідні, змінюється спектр домінантних гуморальних факторів зі збільшенням частки протизапальних цитокінів, що здатні до довготривалого підтримання імунної відповіді [98, 111]. Однак поза увагою залишаються питання модуляції програмованої клітинної смерті нейтрофілів у дітей при пієлонефритах залежно від віку й ускладнень. У зв'язку з цим не викликає сумнівів той факт, що вивчення стадій апоптозу нейтрофілів, механізмів

індукції запрограмованої клітинної смерті допоможе доповнити особливості патогенезу виникнення пієлонефритів у дітей.

Тому перспективним напрямом у вивченні цього питання є дослідження модуляції апоптозу нейтрофілів при пієлонефритах у дітей різного віку, що забезпечує елімінацію потенційно небезпечних для дитячого організму пошкоджених клітин.

Унаслідок проведеного дослідження було виявлено, що кількість живих клітин при хронічній формі первинного пієлонефриту в дітей різних вікових категорій достовірно знижена, особливо в дітей вікової категорії 0-3 роки, і становить $69,6 \pm 0,8\%$. Кількість нейтрофілів на ранній стадії апоптозу (рис.5.24) у дітей вікової категорії 0-3 роки (I група дітей) з гострою формою пієлонефриту становила в середньому $4,4 \pm 0,07\%$; від 4 до 7 років (II група дітей) – $3,3 \pm 0,06\%$ і від 8 до 18 років (III група дітей) – $3,5 \pm 0,07\%$ (рис.5.25).

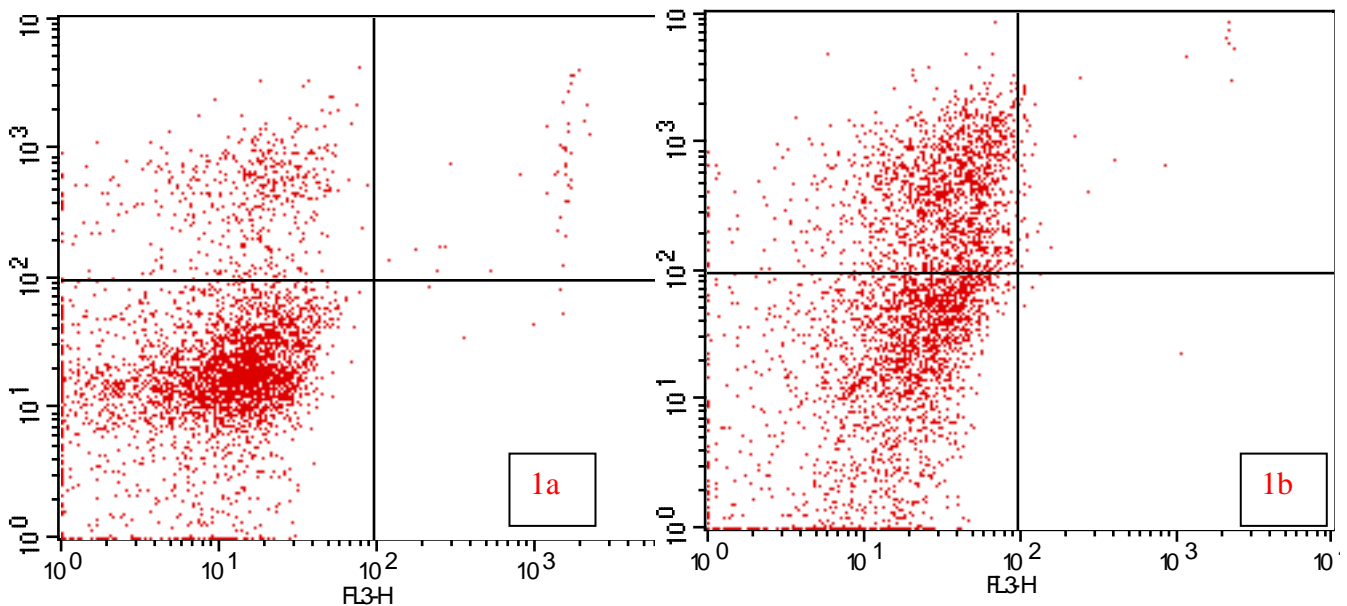


Рисунок 5.24. Кількість нейтрофілів на ранній стадії апоптозу в дітей I групи з гострою (1a) та хронічною (1b) формою пієлонефриту

У дітей з хронічною формою пієлонефриту показники кількості нейтрофілів на ранній стадії апоптозу значно підвищені: у I групі дітей – $29,3 \pm 0,4\%$, у II групі дітей – $24,1 \pm 0,6\%$ і у III групі дітей – $16,2 \pm 0,7\%$, що

можна пояснити, з одного боку, поліетіологічністю хронічної форми пієлонефриту (найчастіше висівали асоціації мікроорганізмів, такі як: *Enterococcus faecalis* і *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae* і *Escherichia coli*; *Enterococcus faecalis* і *Klebsiella pneumoniae*; *Proteus mirabilis* і *Klebsiella pneumoniae*), а з іншого боку – виникненням ускладнень. Так, у дітей I групи найчастіше діагностували інфекцію сечовивідних шляхів, дисметаболічну нефропатію, токсико-метаболічну нефропатію, дисплазію нирок і порушення пуринового обміну.

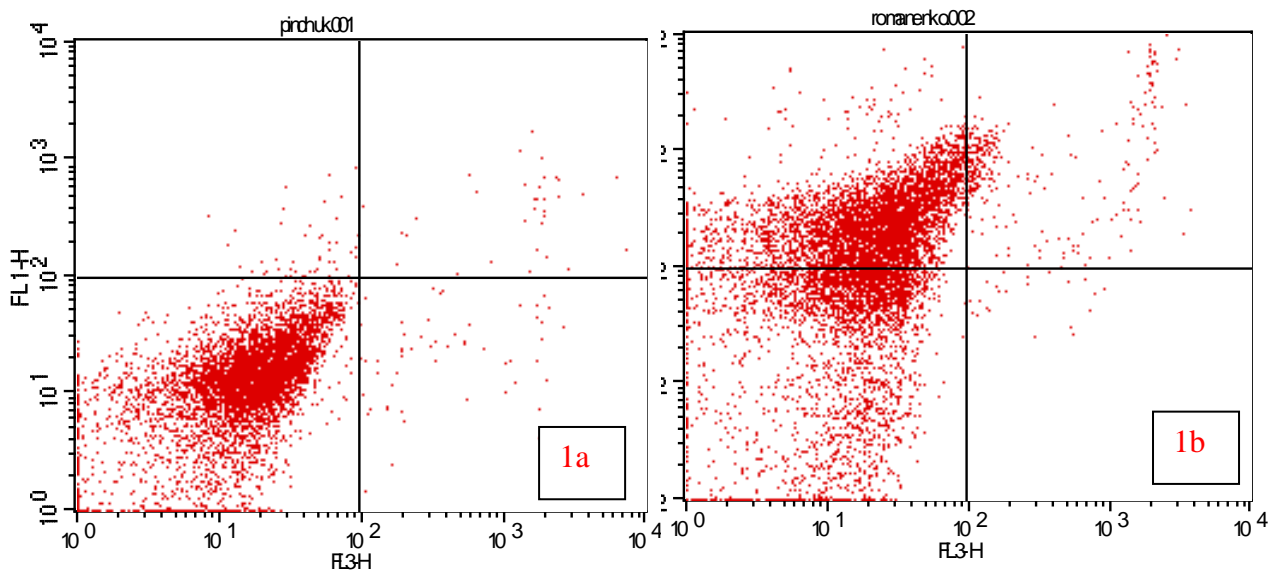


Рисунок 5.25. Кількість нейтрофілів на ранній стадії апоптозу в дітей III групи з гострою (1a) та хронічною (1b) формою пієлонефриту

У дітей II групи було виявлено інфекцію сечовивідних шляхів, нейро-м'язову дисфункцію сечового міхура, полікістоз нирок, у дітей III групи, крім інфекції сечовивідних шляхів, фіксували дисметаболічну нефропатію, дисплазію нирок і нейро-м'язову дисфункцію сечового міхура.

Усі групи були перевірені на нормальність, і, як видно з частотних гістограм, розподіл у групах не є нормальним. Тому для статистичного оцінювання величин слід використовувати непараметричні статистичні методи (рис. 5.26).

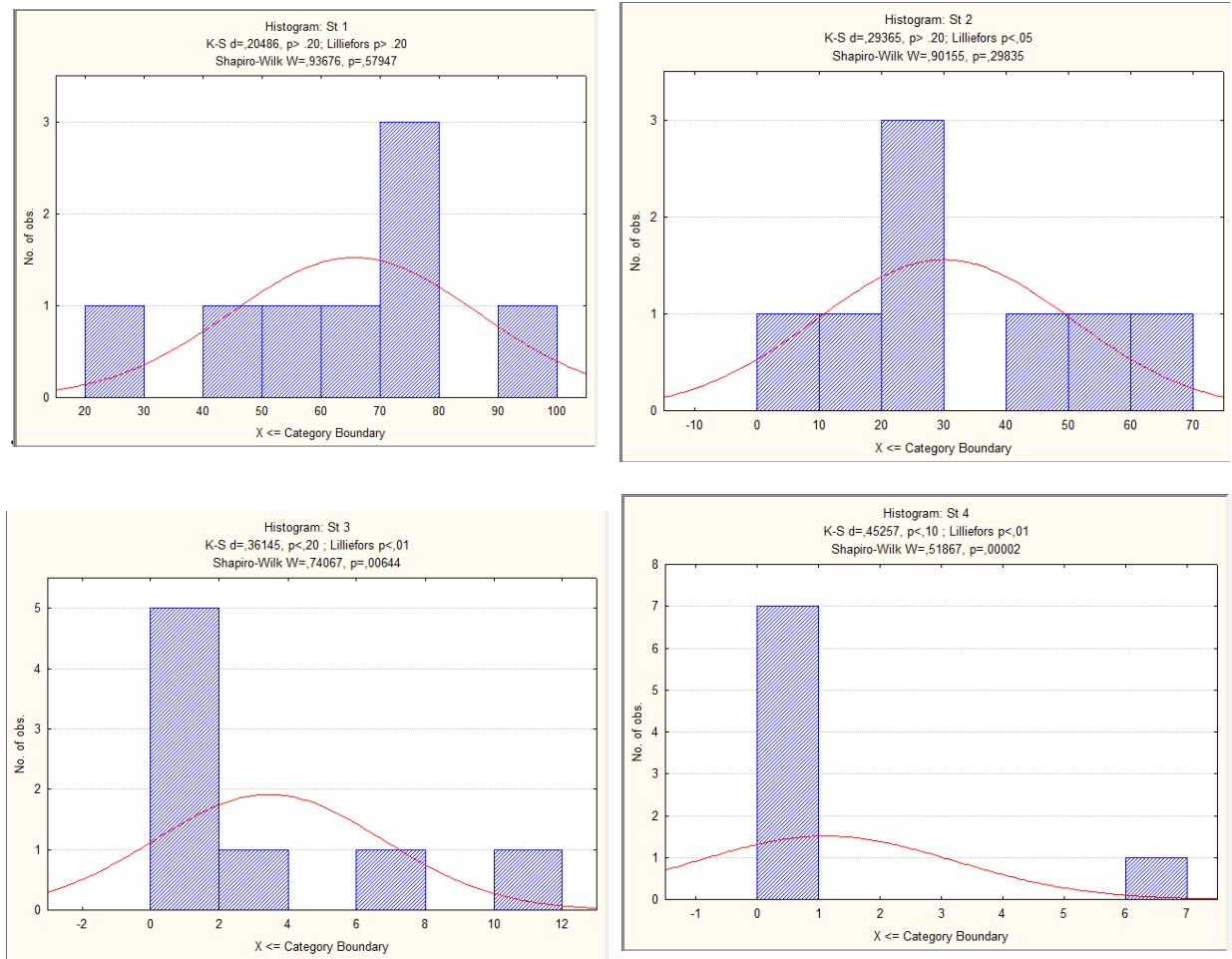


Рисунок 5.26. Апоптоз нейтрофілів залежно від збудників, що спричиняли пієлонефрит у дітей (перевірка на нормальність).

Далі наведено 2DBoxPlots для кожної стадії апоптозу. Як групувальний фактор було використано умовне позначення 1 – монокультура, 2 – змішана культура, що викликала пієлонефрит у дітей.

Як видно з рисунку 5.27, за умови, що пієлонефрит спричинений монокультурою, діапазон меж верхнього і нижнього кuartилів коливає між ~ 60 до 90 без розкидів. Медіана перебуває приблизно на 70. Таку статистичну картину можна пояснити невеликою кількістю спостережень у групі й однорідністю самої групи. Щодо першої стадії апоптозу нейтрофілів у дітей з пієлонефритом, що був викликаний змішаною культурою, то ми

спостерігаємо розкид від 30 до ~ 80, медіана збігається з верхнім квантилем, що характеризує групу як неоднорідну.

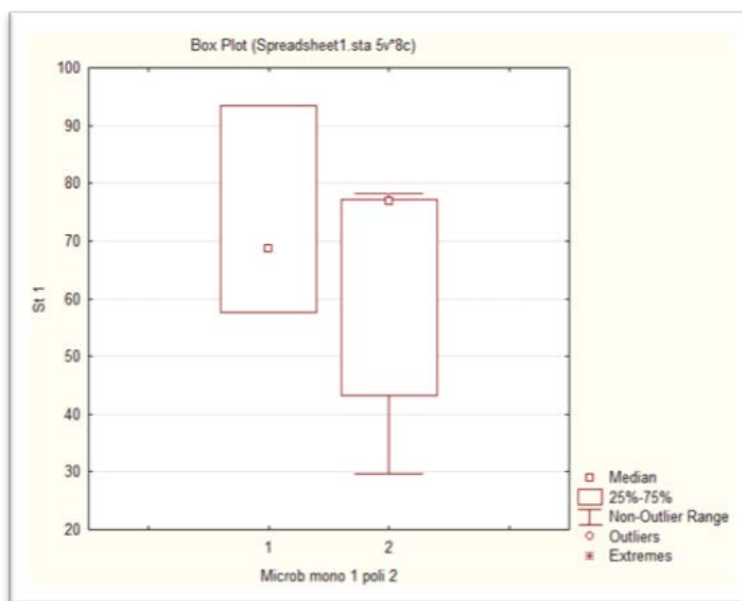


Рисунок 5.27. Боксова діаграма 1-ї стадії апоптозу нейтрофілів залежно від кількості збудників, що викликали пієлонефрит у дітей.

Як видно з рисунку 5.28, за умови, що пієлонефрит викликаний монокультурою, діапазон меж верхнього і нижнього квантилів перебуває між ~ 5 до 40 без розкидів, а медіана ~ на 15. Таку статистичну картину можна пояснити невеликою кількістю спостережень у групі й однорідністю самої групи. Щодо другої стадії апоптозу нейтрофілів у дітей з пієлонефритом, спричиненим змішаною культурою, то ми спостерігаємо розкид у більший бік до ~ 65, медіана майже збігається з нижнім квантилем, що характеризує групу як неоднорідну.

З рисунку 5.29 бачимо, що за пієлонефриту, викликаного монокультурою, діапазон меж верхнього і нижнього квантилів коливається між ~ 5 до 10 без розкидів. Медіана майже збігається з нижнім квантилем (~6). Таку статистичну картину можна пояснити невеликою кількістю спостережень у групі й неоднорідністю групи.

Щодо третьої стадії апоптозу нейтрофілів у дітей з пієлонефритом, що був викликаний змішаною культурою, то ми спостерігаємо випадваючу величину на ~ 7 , медіана збігається з нижнім квантилем, що характеризує групу як неоднорідну.

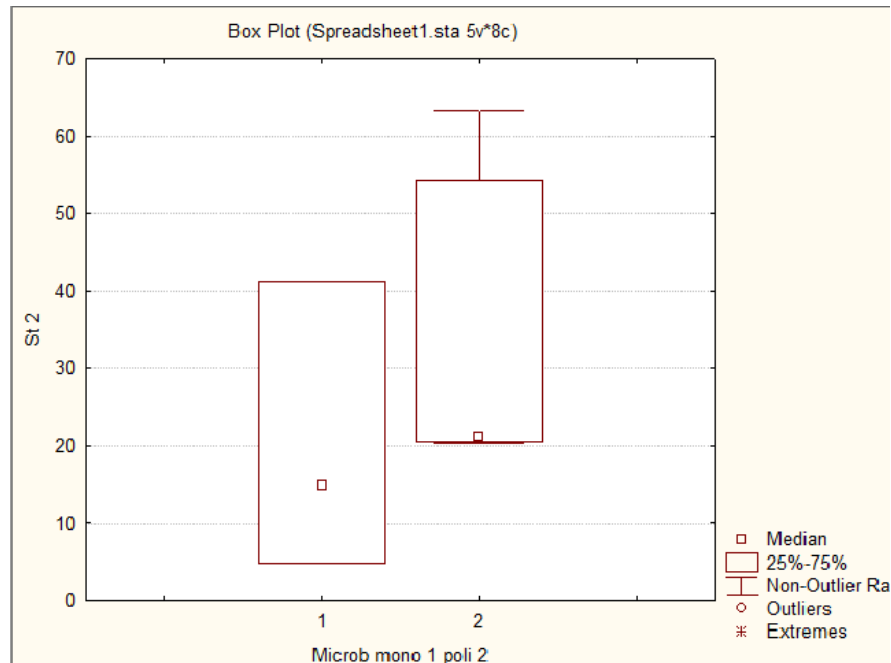


Рисунок 5.28. Боксова діаграма 2-ї стадії апоптозу нейтрофілів залежно від кількості збудників, що викликали пієлонефрит у дітей.

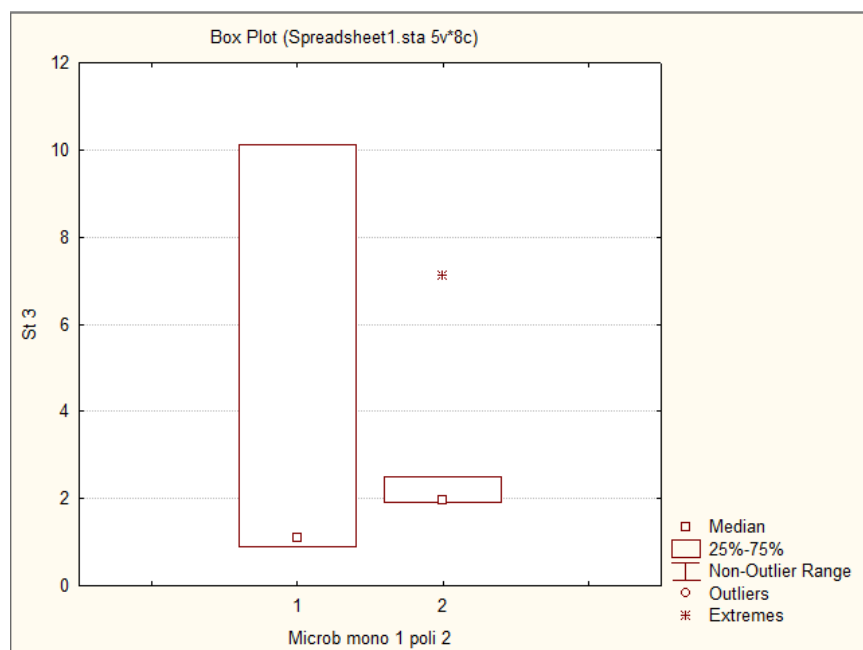


Рисунок 5.29. Боксова діаграма 3 стадії апоптозу нейтрофілів залежно від кількості збудників, що викликали пієлонефрит у дітей.

Як видно з рисунка 5.30, за умови, що пієлонефрит був викликаний монокультурою, діапазон меж верхнього і нижнього кuartилів перебуває між ~ від 0 до 6 без викидів. Медіана дорівнює ~ 0,5. Таку статистичну картину можна пояснити малою кількістю спостережень у групі й неоднорідністю самої групи. Щодо четвертої стадії апоптозу нейтрофілів у дітей з пієлонефритом, що був спричинений змішаною культурою, то виявлено викид, який майже збігається з верхнім і нижнім кuartилями. Медіану спрямовано на верхній кuartиль.

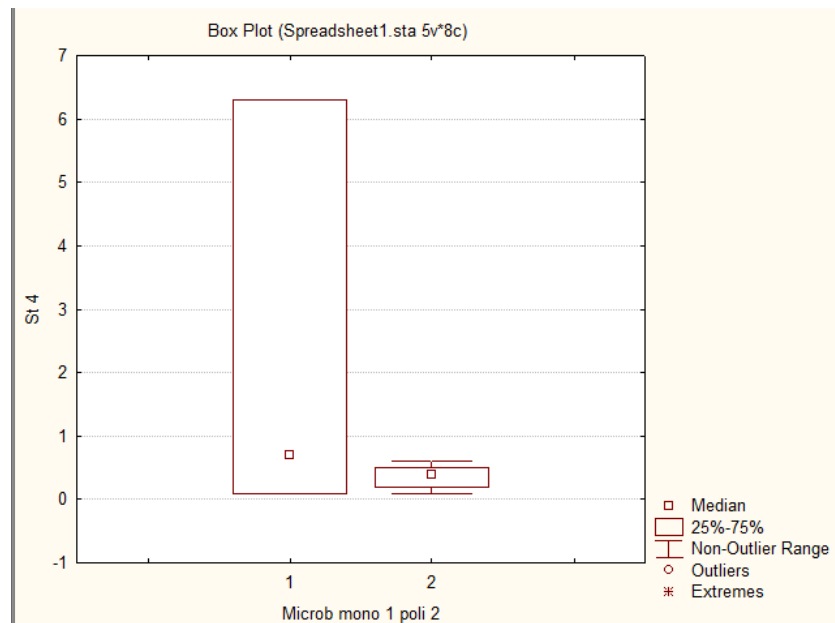


Рисунок 5.30. Боксова діаграма 4-ї стадії апоптозу нейтрофілів залежно від кількості збудників, що викликали пієлонефрит у дітей

Після аналізу даних показників апоптозу лімфоцитів у дітей старшого віку з гострим та хронічним пієлонефритом, які були зумовлені *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, *Klebsiella pneumoniae* та їхніми асоціаціями, було встановлено, що розподіл за групами не відповідав закону Гаусса. Проведений статистичний дисперсійний аналіз показав, що статистичні відмінності між показниками апоптозу нейтрофілів і мікроорганізмами (моно- або mixed-інфекція), які викликали гостру та хронічну форми пієлонефриту в дітей старшого віку, значущі лише для 1-ї ($F=9,78$; $p<0,05$) та 2-ї ($F=12,72$; $p<0,05$) стадії апоптозу та статистично

незначущі для 3-ї ($F=1,41$; $p>0,05$) та 4-ї ($F=2,10$; $p>0,05$) стадії. Отже, встановлено, що показники 1-ї та 2-ї стадії апоптозу в дітей старшого віку з пієлонефритом, спричиненим монокультурою, були нижчими, тобто живих клітин та тих, що перебувають на початкових стадіях апоптозу було менше, ніж при пієлонефритах, викликаних змішаною інфекцією. Такої відповідності не спостерігалось в 3-й та 4-й (незворотніх) стадіях апоптозу.

Підвищену модуляцію апоптозу нейтрофілів при хронічній формі пієлонефриту можна пояснити виникненням ускладнень (табл. 5.1).

Таблиця 5.1

**Захворювання, які ускладнюють перебіг пієлонефриту в дітей
залежно від вікової категорії**

№	Ускладнення	Вікова категорія					
		0-3(n=37)		4-7(n=16)		8-18(n=30)	
		ГПН (n=26)	ХПН (n=11)	ГПН (n=10)	ХПН (n=6)	ГПН (n=16)	ХПН (n=14)
1	Дисметаболична нефропатія	11,5%	18,2%	10%	-	50%	43%
2	Нейро-м'язова дисфункція сечового міхура	3,9%	-	-	16,7%	-	7,1%
3	Пієлоектазія	-	-	10%	-	-	7,1%
4	Дисплазія нирок	-	9,1%	-	-	-	7,1%
5	Полікістоз	-	-	-	16,7%	-	-
6	Інфекція сечовивідних шляхів	-	54,5%	-	66,6%	-	35,7%
7	Порушення пуринового обміну	-	9,1%	-	-	-	-
8	Уретрогідронефрит	-	9,1%	-	-	-	-
	Разом	15,4%	100%	20%	100%	50%	100%

Так, у дітей І групи найчастіше діагностували інфекцію сечовивідних шляхів (54,5%), дисметаболичну нефропатію (18,2%), дисплазію нирок (9,1 %) і порушення пуринового обміну (9,1%). У дітей ІІ групи - інфекцію сечовивідних шляхів (66,6%), нейро-м'язову дисфункцію сечового міхура (16,7%), полікістоз нирок (16,7%), у дітей ІІІ групи, крім інфекції сечовивідних шляхів (37,7%), було виявлено дисметаболичну нефропатію (43%), дисплазію нирок (7,1%) і нейро-м'язову дисфункцію сечового міхура.

У дітей молодшого віку ускладнення гострого пієлонефриту становили 15,4%, що у 6,5 разів менше, ніж при хронічній формі пієлонефриту. У дітей вікової категорії від 4 до 7 років ускладнення виникали у 20% випадків, серед яких 50% – поліетазія, 50% – дисметаболична нефропатія. У дітей старшого віку з гострою формою пієлонефриту половина випадків була з ускладненням у вигляді дисметаболичної нефропатії.

У даному дослідженні встановлено, що відсоток апоптозу лейкоцитів (включаючи нейтрофільний апоптоз) значно більший у дітей, хворих на первинний пієлонефрит, ніж у здорових групи контролю. Причому спостерігається найвища активність апоптозу лейкоцитів на ранній стадії в дітей вікової категорії 0-3 роки з гострою формою пієлонефриту, одночасно виявлено, що й у дітей з хронічною формою пієлонефриту показники кількості лейкоцитів, у тому числі й нейтрофілів, на ранній стадії апоптозу значно підвищені. Це пояснюється поліетіологічністю захворювання та виникненням ускладнень.

5.5.2. Визначення показників апоптозу лімфоцитів у дітей з пієлонефритом на фоні вродженого гідронефрозу

Оцінювання апоптозу лімфоцитів периферичної крові в дітей з пієлонефритом на фоні вродженого гідронефрозу показало, що в дітей раннього віку незалежно від провідного збудника існує тенденція до

зниження AnnexinV⁺/7AAD⁻-лімфоцитів, а AnnexinV⁺/7AAD⁺ та AnnexinV⁻/7AAD⁺-клітини залишаються на рівні контрольних значень (рис. 5.31).

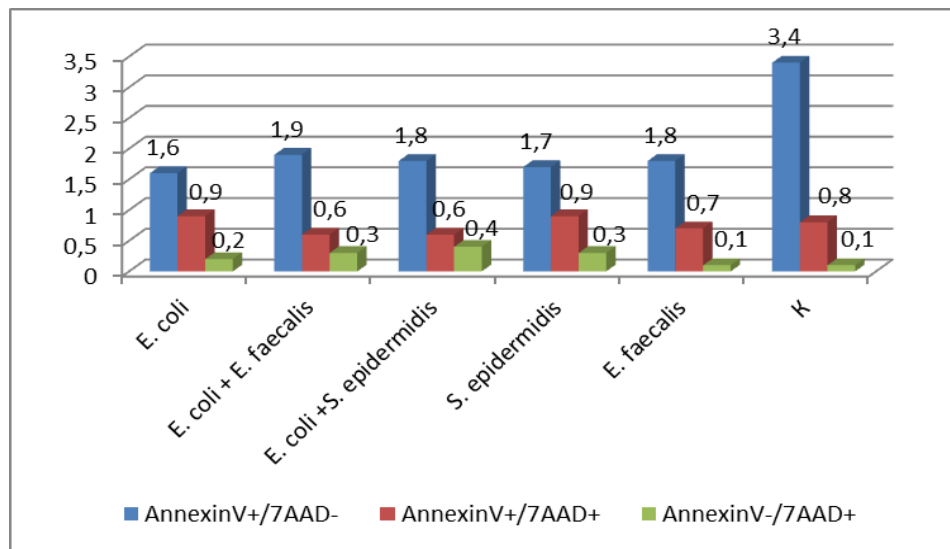


Рисунок 5.31. Апоптоз нейтрофілів залежно від збудників, що викликали пієлонефрит у дітей на фоні вродженого гідронефрозу.

Показник кількості живих клітин був недостовірно знижений у дітей з моноінфекцією, що викликана *Escherichia coli*, й істотно знижений при змішаній інфекції (рис. 5.32), зумовленій *Escherichia coli* + *Enterococcus faecalis* та *Escherichia coli* + *Staphylococcus epidermidis* (рис. 5.33).

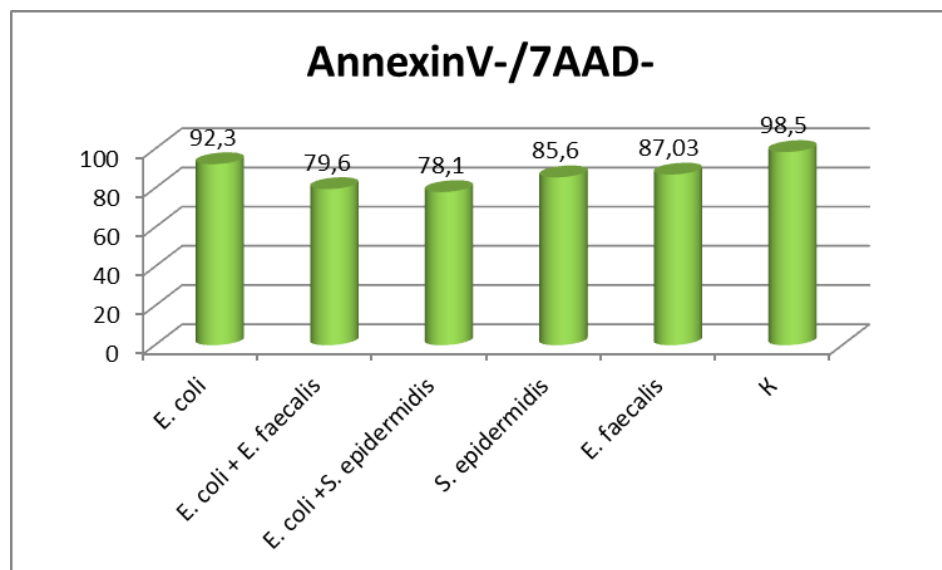


Рисунок 5.32. Відсоток живих лімфоцитів залежно від збудників, що викликали вторинний пієлонефрит у дітей раннього віку на фоні вродженого гідронефрозу.

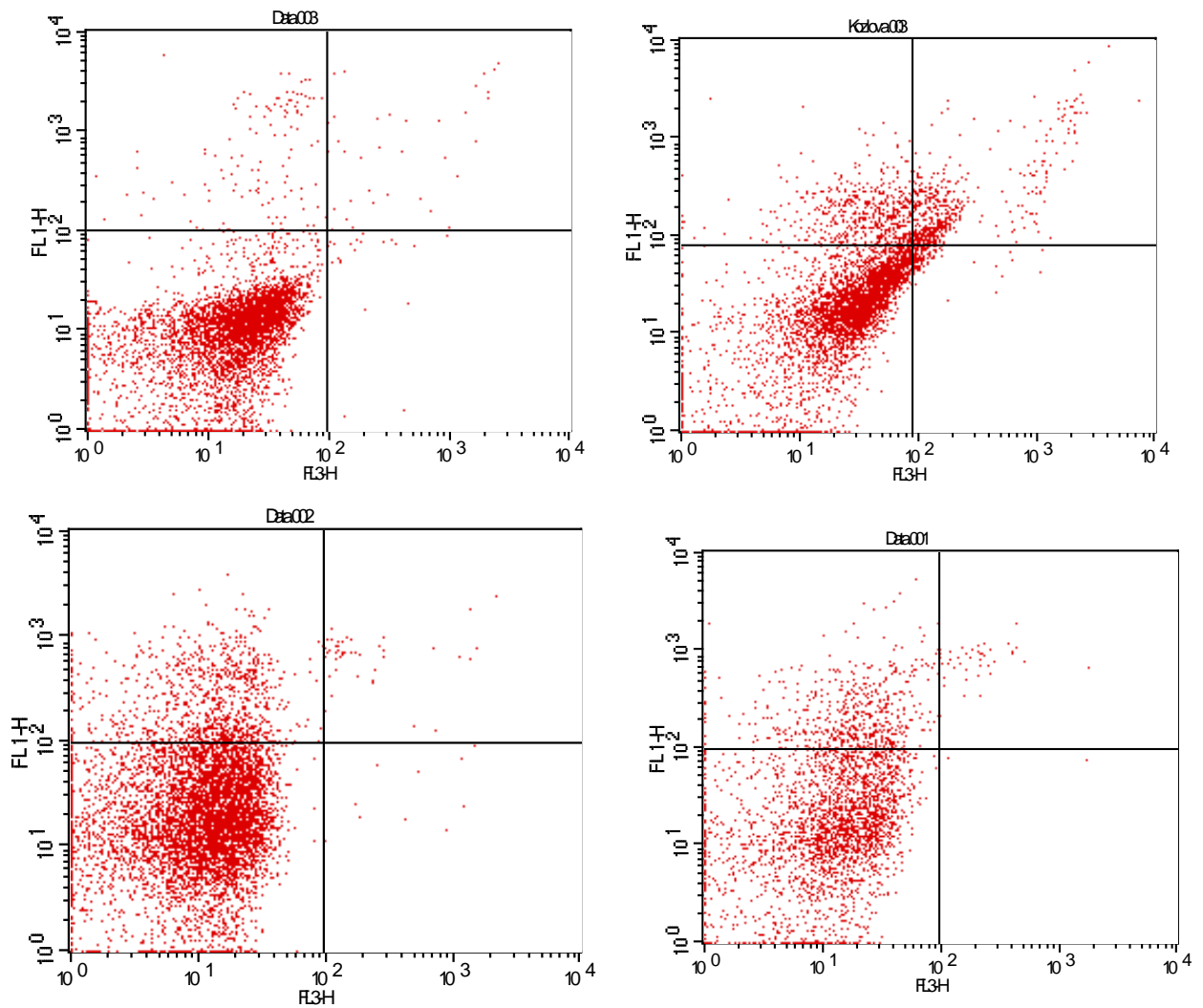


Рисунок 5.33. Кількість лімфоцитів у дітей раннього віку з вторинним пієлонефритом залежно від збудників (Б – моноінфекція *Escherichia coli*, В – моноінфекція *Enterococcus faecalis*, Г - змішана інфекція) та контроль (А).

У дітей середнього віку з вторинним пієлонефритом, зумовленим *Escherichia coli* + *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* + *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* + *Candida albicans*, *Escherichia coli* + *Proteus vulgaris* на фоні вродженого гідронефрозу, кількість AnnexinV/7AAD⁻-клітин знижено в 1,4 раза, а при змішаній інфекції, зумовленій *E. coli* + *Staphylococcus epidermidis* + *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* + *Pseudomonas aeruginosa* + *Candida albicans*, *Escherichia coli* + *Proteus mirabilis* + *Candida albicans*, – в 1,6 раза (рис. 5.34).

Аналогічну картину спостерігаємо в дітей старшого віку: кількість AnnexinV⁻/7AAD⁻-лімфоцитів було достовірно знижено порівняно з контрольними значеннями та з відсотком живих клітин у дітей раннього та середнього віку з вторинним пієлонефритом.

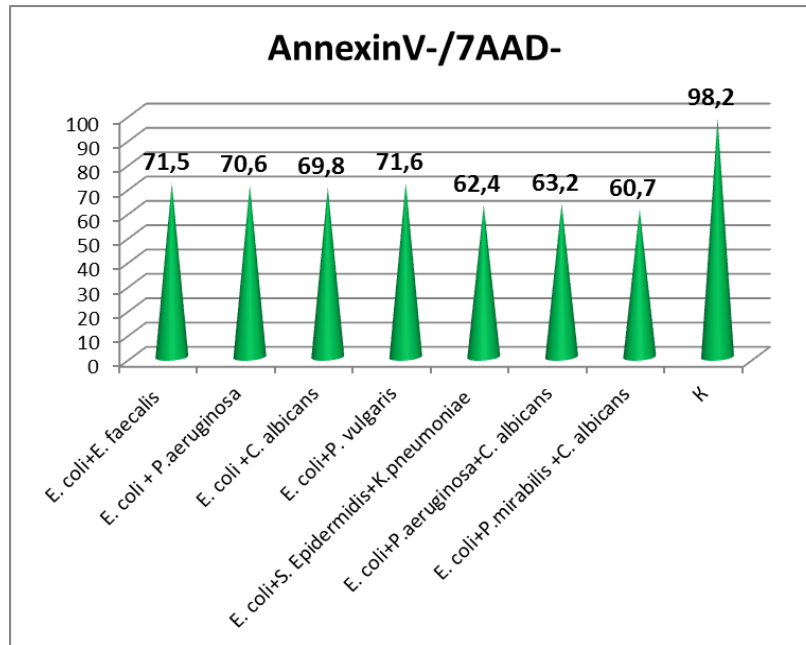


Рисунок 5.34. Відсоток живих лімфоцитів залежно від збудників, що викликали вторинний пієлонефрит у дітей середнього віку на фоні вродженого гідронефрозу.

Так, показник LL у дітей старшого віку з вторинним пієлонефритом, зумовленим асоціацією мікроорганізмів *Escherichia coli* + *Klebsiella pneumoniae* + *Enterococcus faecalis* та *Escherichia coli* + *Candida albicans* + *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* + *Staphylococcus epidermidis* + *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* + *Klebsiella pneumoniae* + *Proteus mirabilis* + *Candida albicans*, знижується в 1,7 раза, *Klebsiella pneumoniae* + *Proteus mirabilis* + *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* + *Proteus mirabilis* + *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* + *Proteus mirabilis* + *Enterococcus faecalis* – в 1,6 раза (рис. 5.35).

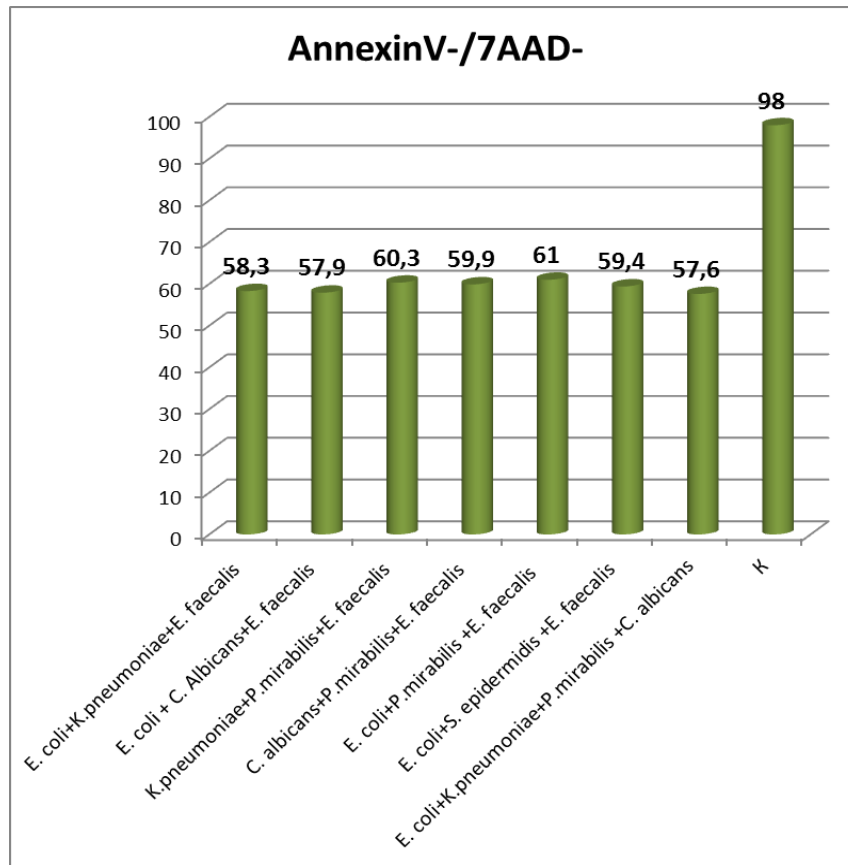


Рисунок 5.35. Відсоток живих лімфоцитів залежно від збудників, що викликали вторинний пієлонефрит у дітей старшого віку на фоні вродженого гідронефрозу.

Відсоток апоптичних лімфоцитів UL у дітей середнього віку з вторинним пієлонефритом був достовірно вищим за аналогічні показники контрольної групи та в дітей раннього віку, а саме: при вторинному пієлонефриті, що зумовлений *Escherichia coli* + *Enterococcus faecalis*, – у 6,9 раза, *Escherichia coli* + *Pseudomonas aeruginosa* та *Escherichia coli* + *Proteus mirabilis* + *Candida albicans* – у 7,5 раза, *Escherichia coli* + *Candida albicans* – у 7,6 раза, *Escherichia coli* + *Proteus vulgaris* - у 7,1 раза, *E. coli* + *Staphylococcus epidermidis* + *Klebsiella pneumoniae* – у 7,8 раза, *Escherichia coli* + *Pseudomonas aeruginosa* + *Candida albicans*– у 7,7 раза (рис. 5.36).

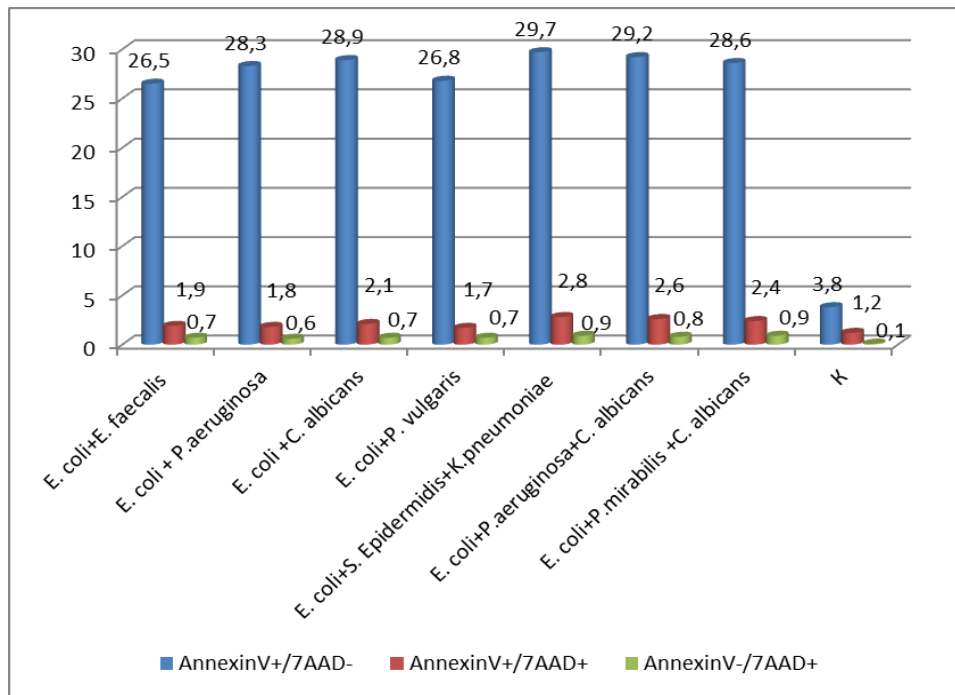


Рисунок 5.36. Відсоток апоптичних лімфоцитів залежно від збудників, що викликали вторинний пієлонефрит у дітей середнього віку на фоні вродженого гідронефрозу.

Кількість клітин UR у дітей даної групи збільшується: при пієлонефриті, зумовленому *Escherichia coli* + *Enterococcus faecalis* – в 1,7 раза, *Escherichia coli* + *Pseudomonas aeruginosa* – в 1,6 раза, *Escherichia coli* + *Candida albicans* – в 1,9 раза, *Escherichia coli* + *Proteus vulgaris* – в 1,5 раза, *E. coli* + *Staphylococcus epidermidis* + *Klebsiella pneumoniae* - у 2,5 раза, *Escherichia coli* + *Pseudomonas aeruginosa* + *Candida albicans* – у 2,4 раза, *Escherichia coli* + *Proteus mirabilis* + *Candida albicans* – у 2,2 раза.

Отже, найбільший відсоток апоптичних клітин спостерігався при міх-інфекціях, зумовлених *E. coli* + *Staphylococcus epidermidis* + *Klebsiella pneumoniae* (рис. 5.37-Б), *Escherichia coli* + *Pseudomonas aeruginosa* + *Candida albicans* (рис. 5.37-В) та *Escherichia coli* + *Proteus mirabilis* + *Candida albicans* (рис. 5.37-Г).

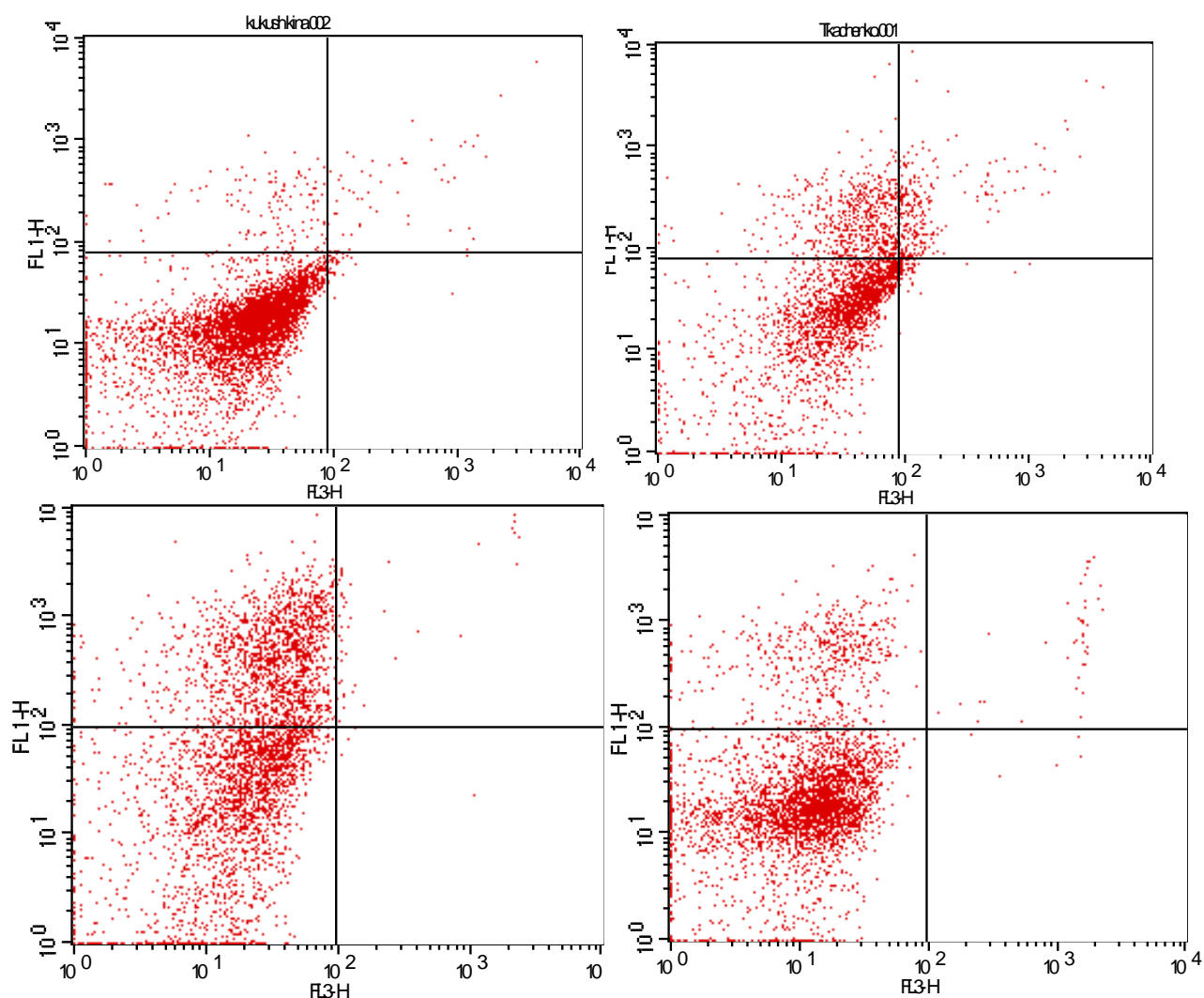


Рисунок 5.37. Кількість лімфоцитів у дітей середнього віку з вторинним пієлонефритом залежно від збудників (Б – інфекція *E. coli* + *Staphylococcus epidermidis* + *Klebsiella pneumoniae*, В – інфекція *Escherichia coli* + *Pseudomonas aeruginosa* + *Candida albicans*, Г – інфекція *Escherichia coli* + *Proteus mirabilis* + *Candida albicans*) та контроль (А).

У дітей старшого віку кількість AnnexinV⁺/7AAD⁻-лімфоцитів була достовірно вищою (рис. 5.38) за контрольні значення й за показники в дітей раннього та середнього віку з вторинним пієлонефритом.

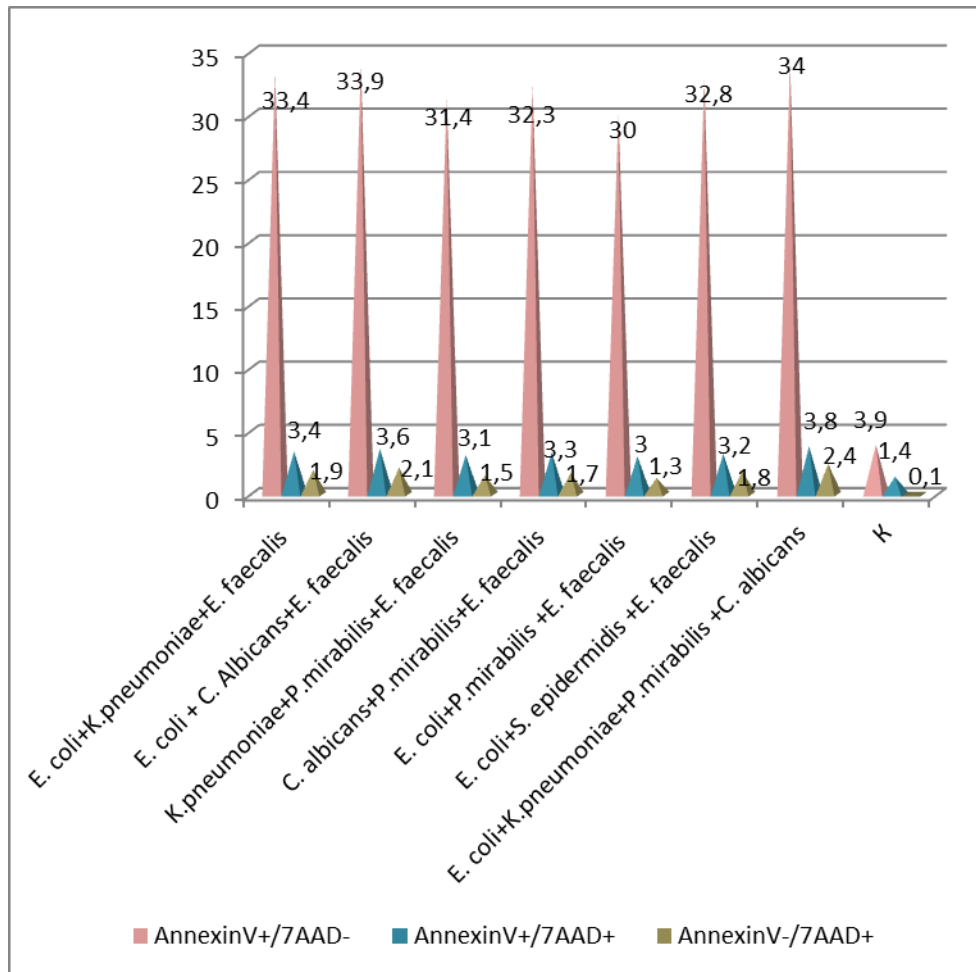


Рисунок 5.38. Відсоток апоптичних лімфоцитів залежно від збудників, що викликали вторинний пієлонефрит у дітей старшого віку на фоні вродженого гідронефрозу.

Так, кількість клітин UR у дітей старшого віку з вторинним пієлонефритом була підвищена при пієлонефриті (рис. 5.39), зумовленому асоціацією мікроорганізмів: *Escherichia coli* + *Proteus mirabilis* + *Enterococcus faecalis* – у 2,1 раза, *Klebsiella pneumoniae* + *Proteus mirabilis* + *Enterococcus faecalis* – у 2,2 раза, *Escherichia coli* + *Staphylococcus epidermidis* + *Enterococcus faecalis* – у 2,3 раза, *Candida albicans* + *Proteus mirabilis* + *Enterococcus faecalis* та *Escherichia coli* + *Klebsiella pneumoniae* + *Enterococcus faecalis* – у 2,4 раза, *Escherichia coli* + *Candida albicans* + *Enterococcus faecalis* – у 2,6 раза, *Escherichia coli* + *Klebsiella pneumoniae* + *Proteus mirabilis* + *Candida albicans* - у 2,7 раза.

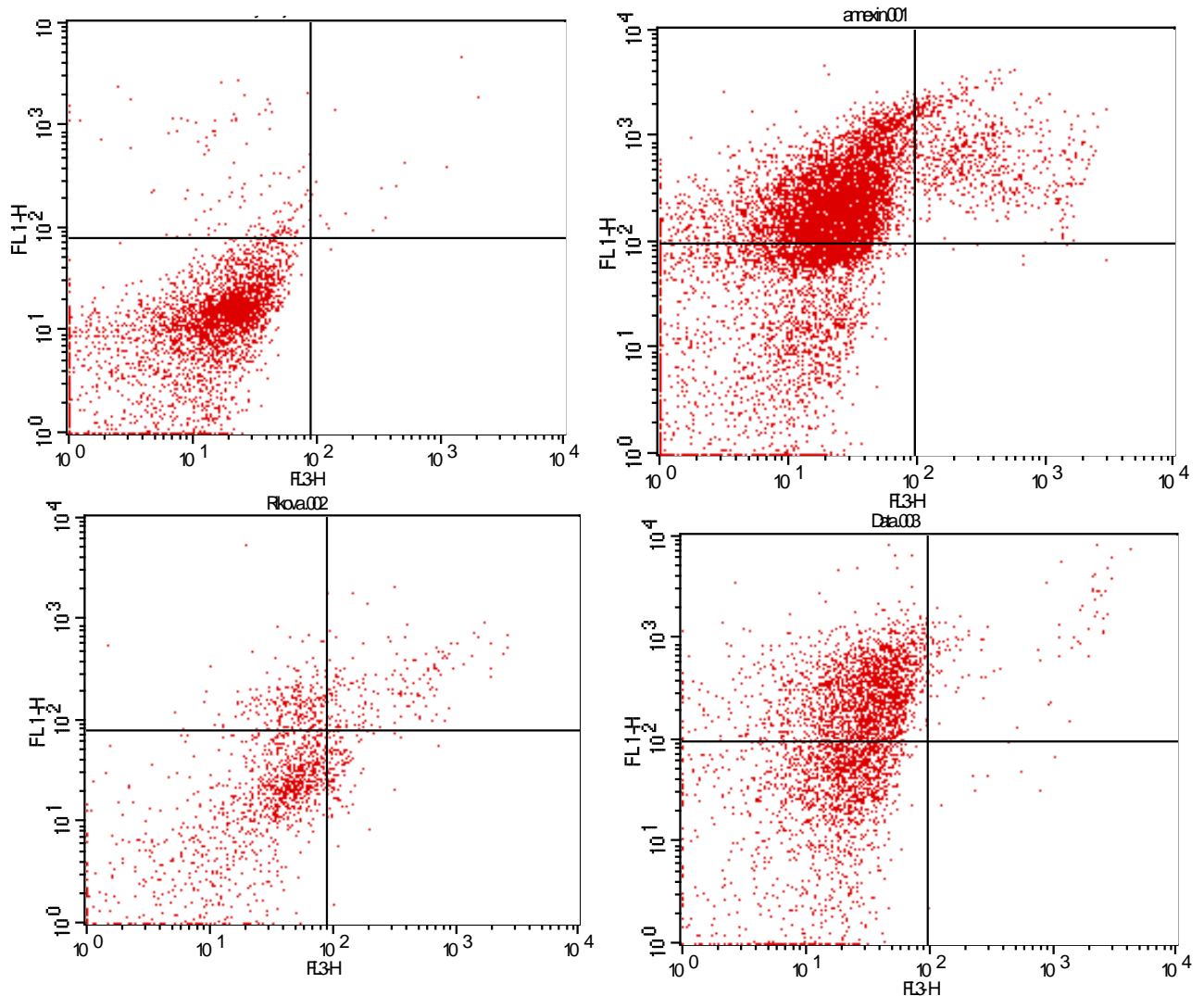


Рисунок 5.39. Кількість лімфоцитів у дітей старшого віку з вторинним пієлонефритом залежно від збудників (Б – *Escherichia coli* + *Klebsiella pneumoniae* + *Proteus mirabilis* + *Candida albicans*, В – *Escherichia coli* + *Proteus mirabilis* + *Enterococcus faecalis*, Г - *Escherichia coli* + *Candida albicans* + *Enterococcus faecalis*) та контроль (А).

Отже, зростання кількості апоптичних клітин залежить від етіологічного чинника, асоціації збудників, вікової категорії хворої на пієлонефрит дитини та клінічної форми захворювання.

Висновки до 5-го розділу:

1. Установлено порушення імунного статусу з пригніченням субпопуляції лімфоцитів $CD3^+$ $CD4^+$, $CD8^+$, $CD25^+$; підвищенням

субпопуляції клітин – активаторів апоптозу CD95⁺ у дітей середньої і старшої вікової категорії.

2. Виявлено підвищення рівнів цитокінів у дітей з пієлонефритом на фоні вродженого гідронефрозу в активній стадії захворювання, причому рівень їх залежив від етіологічного фактора і віку дитини.

3. Установлено, що дисбаланс клітинної та гуморальної ланок імунітету в дітей, хворих на пієлонефрит на тлі гідронефрозу в стадії загострення, сприяє рецидивуванню патологічного процесу, його прогресуванню та погіршенню подальшого перебігу пієлонефриту.

4. Установлено підвищення значень усіх компонентів системи комплементу як на системному, так і на локальному рівнях, що свідчить про активацію системи комплементу в дітей з пієлонефритом на фоні вродженого гідронефрозу.

5. З'ясовано, що в дітей старшого віку, хворих на хронічний пієлонефрит, при збільшенні щільності біоплівок підвищується показник умісту антигенів у NETs, тобто здатність нейтрофілів у момент загибелі до захоплення більшої кількості збудників хронічного пієлонефриту.

6. Установлено, що ізоляти *Klebsiella pneumoniae* здатні формувати біоплівки високої щільності при хронічному пієлонефриті в дітей усіх вікових категорій.

7. Інтенсивність фагоцитозу й здатність до формування NETs з найбільшим умістом антигенів виявлено в дітей з хронічним пієлонефритом, зумовленим *Enterococcus faecalis*, та в дітей із вторинним пієлонефритом в активній стадії захворювання старшої групи.

8. Виявлено найвищу активність апоптозу лейкоцитів при первинному пієлонефриті в дітей вікової категорії 0-3 роки з гострою формою на ранній стадії, одночасно виявлено, що і в дітей з хронічною формою пієлонефриту показники кількості лейкоцитів, у тому числі й нейтрофілів, на ранній стадії апоптозу значно підвищені, що пояснюється поліетіологічністю захворювання та виникненням ускладнень.

9. Установлено, що показники 1-ї та 2-ї стадії апоптозу в дітей старшого віку з первинним пієлонефритом, викликаним монокультурою, були нижчими, тобто живих клітин та тих, що перебувають на початкових стадіях апоптозу, було менше, ніж при пієлонефритах, спричинених змішаною інфекцією. Такої відповідності не спостерігалось в 3-й та 4-й (незворотніх) стадіях апоптозу.

9. Підвищену модуляцію апоптозу нейтрофілів при хронічній формі пієлонефриту можна пояснити виникненням ускладнень.

10. У дітей, хворих на пієлонефрит, середнього й старшого віку виявлено достовірне посилення експресії рецептора CD95⁺ та підвищення доли AnnexinV⁺-клітин.

11. Спостерігається посилення клітинної загибелі лімфоцитів у дітей з пієлонефритами незалежно від віку, клінічної форми захворювання та етіологічного чинника на фоні підвищення концентрації прозапальних цитокінів, ЦІК та NETs з одночасним зниженням загальної кількості лімфоцитів.

12. У дітей молодшого віку виявлено тенденцію до зниження експресії CD95⁺ і відсотка AnnexinV⁻/7AAD⁻ та AnnexinV⁺/7AAD⁻-лімфоцитів.

13. У дітей раннього віку, хворих на гостру форму пієлонефриту з неускладненим перебігом, рівень показників апоптозу лімфоцитів достовірно не відрізнявся від референтних значень та мав тенденцію до зниження.

14. Виявлено зростання кількості апоптичних клітин при хронічній формі первинного пієлонефриту й при вторинному пієлонефриті на фоні гідронефрозу в дітей середньої та старшої вікової категорії незалежно від етіологічного чинника, але при змішаній інфекції дані показники достовірно збільшені.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Marchenko I. A., Babiichuk L. O., Mishyna M. M., Makieieva N. I., Zubov P. M. Peculiarities of leukocytes apoptosis modulation in children with pyelonephritis. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2020. № 11 (1). С. 88-92.
2. Mishyna M., Marchenko I., Mozgova Yu. Neutrophils phagocytic activity and nets forming ability in young children with acute pyelonephritis. *EUSER 4th International Conference on Medicine and Natural Sciences Published*, 2019. Amsterdam, 26-27 April 2019. P.41.
3. Мішина М.М., Марченко І.А. Бабічук Л.О., Бабічук Г.А., Макеєва Н.І., Мозгова Ю.А., Головачова В.О., Мішин Ю.М. Оцінка стадій апоптозу лімфоцитів у дітей старшого віку з гострої і хронічної формами пієлонефриту. *Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Актуальні питання сучасної мікробіології та імунології», присвячена 90-річчю акад. А.Я. Циганенка 24-26 червня 2019 р., Харків*. С. 62-64.
4. Maryna Mishyna, Iryna Marchenko, Svitlana Malanchuk. Evaluation Of Peripheral Blood Neutrophils Apoptosis Stages In Children With Acute And Chronic Pyelonephritis. *Scitech World conference on Immunology&infectious diseases. Annual Conference on Nephrology and kidney diseases*. October 08-09, 2019, Dubai, UAE.
5. Марченко І.А. Визначення стану ключових компонентів системи комплементу у дітей молодшого віку з вродженим гідронефрозом, що ускладнений пієлонефритом, зумовленим *E.coli*. *Матеріали конференції ISIC-2019*. 18-20 вересня 2019. Харківський національний медичний університет, Харків, Україна. С.32-33.
6. Марченко І.А. Формування NETs при гострому обструктивному пієлонефриті у дітей. *Збірник тез міжвузівської конференції молодих вчених та студентів «Медицина третього тисячоліття» до 215-ої*

річниці утворення Харківської вищої медичної школи, 30 - 31. 01.2019, Харків. С.30-31.

7. Марченко І.А. Оцінка стану клітинної ланки імунітету у дітей раннього віку з пієлонефритом на фоні гідронефрозу. *Збірник матеріалів конференції «Медицина III тисячоліття»*, 20-22 січня 2020, Харків. С. 56-57.

8. Патент на корисну модель №144851. МПК G01N33/48 (2006.01). Спосіб оцінки імунного статусу дітей з пієлонефритами різних форм за станом апоптозу нейтрофілів венозної крові. Власник ХНМУ, Макєєва Н.І., Мішина М.М., Марченко І.А., Вовк О.О., Головачова В.А., Бабітчук Л.О. №заяв.у202003529, опубл.26.10.2020, бюл. №20.

9. Мішина М.М., Макєєва Н.І., Давиденко В.Б., Бабійчук Л.А., Марченко І.А., Головачова В.О., Мозгова Ю.А., Маланчук С.Г., Дукаров С.В., Дубовик О.С., Мішина Ю.М., Зубова П.М. пієлонефрит у дітей: роль бактеріальної комунікації. *Монографія, ХНМУ*. 2020.121с.

10. Malanchuk S., Mishyna M., Marchenko I., Davydenko V., Mozgova Yu. Modulation of the immune status in pyelonephritis caused by *Pseudomonas aeruginosa* in children with hydronephrosis. *30th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), France (Paris), Abstract Book*. 2020. P.2566.

РОЗДІЛ 6

ВИЗНАЧЕННЯ КОРЕЛЯЦІЙНИХ ВЗАЄМОЗВ'ЯЗКІВ ЗНАЧЕНЬ
ЩІЛЬНОСТІ УТВОРЕННЯ БІОПЛІВОК ПРОВІДНИМИ ЗБУДНИКАМИ
ПІЕЛОНЕФРИТІВ У ДІТЕЙ З ПОКАЗНИКАМИ НЕСПЕЦИФІЧНОЇ
РЕЗИСТЕНТНОСТІ ЗАЛЕЖНО ВІД КЛІНІЧНОЇ ФОРМИ ТА ВІКОВОЇ
КАТЕГОРІЇ

З'ясування патогенетичної ролі утворення біоплівок мікроорганізмами в імунопатогенезі піелонефриту в дітей залежно від клінічної форми, вікової категорії та збудника захворювання

У попередніх розділах дослідження було встановлено, що серед збудників піелонефритів, як первинних, так й вторинних, у дітей переважають *Escherichia coli* та *Enterococcus faecalis* у моноінфекції, а також у складі асоціацій мікроорганізмів, що зумовлюють змішану інфекцію. Крім того, було виявлено кореляційні взаємозв'язки між здатністю провідними збудниками формувати біоплівки та показниками неспецифічної резистентності хворої дитини залежно від віку та клінічної форми захворювання.

Отримані результати доводять, що показник щільності біоплівки (BF) *Escherichia coli*, який зумовлює ГПН у дітей раннього віку (рис. 6.1), має середній прямий кореляційний зв'язок з такими значеннями: ІАМ ($r=+0,6$), ІЛ- 1β ($r=+0,58$), ІЛ-6 ($r=+0,67$), повільний кореляційний зв'язок з NETs ($r=+0,32$) та зворотній середньої сили кореляційний зв'язок з $CD4^+$ ($r=-0,59$), $CD8^+$ ($r=-0,56$), $CD25^+$ ($r=-0,61$), $CD95^+$ ($r=-0,6$).

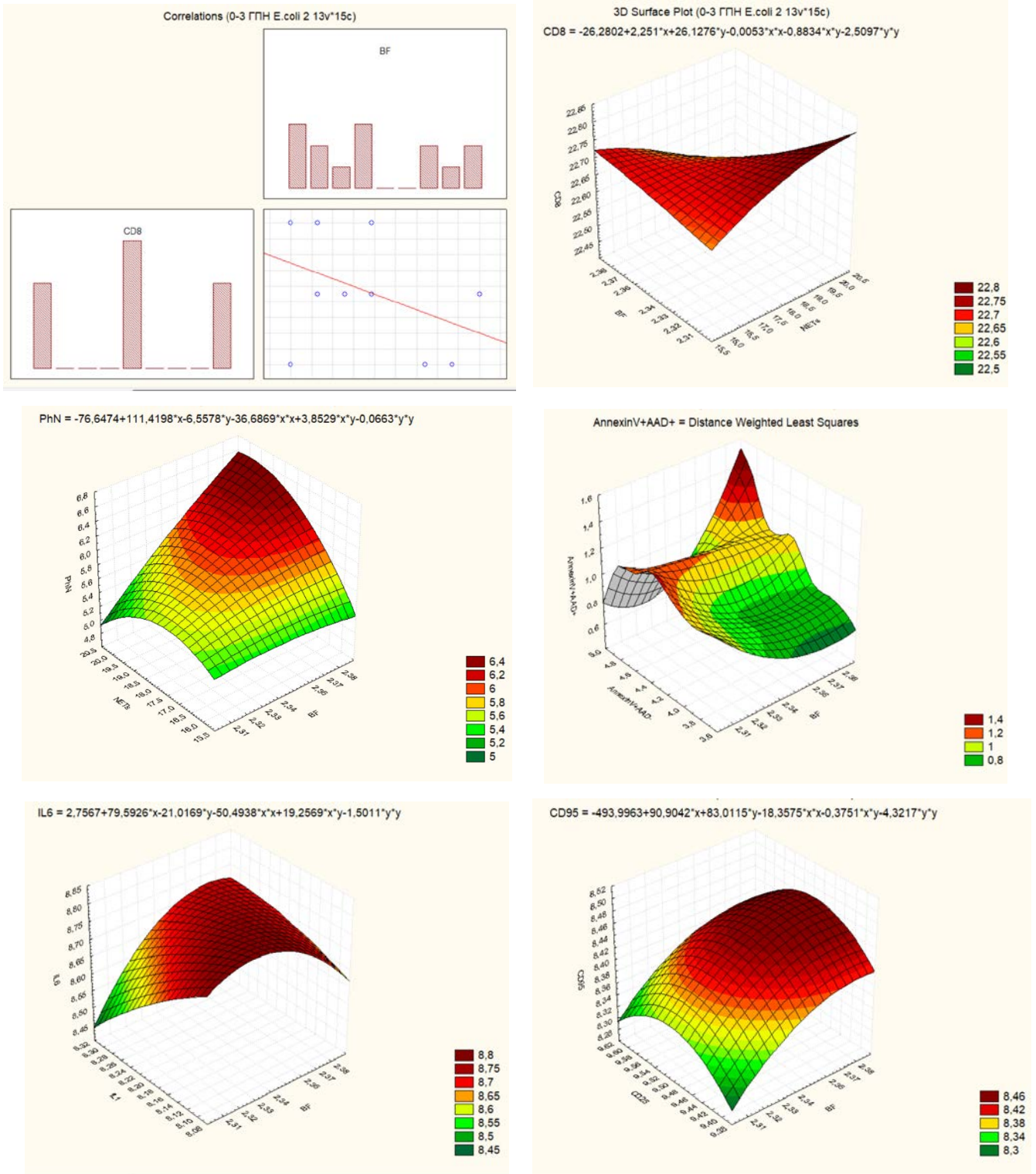


Рисунок 6.1. Взаємозв'язки між показником щільності біоплівки *Escherichia coli* та CD4⁺, CD8⁺, CD25⁺, CD95⁺, NETs, IL-1β, IL-6 та AnnexinV⁺AAD⁻ й AnnexinV⁺AAD⁺ при ГПН у дітей раннього віку.

При ГПН, зумовленому *Escherichia coli*, у дітей середнього віку (рис. 6.2) спостерігається прямий сильний кореляційний зв'язок показника BF з показником КА ($r=+0,87$) і зворотній – з $CD8^+$ ($r=-1,0$) й ФЧ ($r=-0,99$), а також виявлено кореляційні зв'язки середньої прямої сили з $IL-1\beta$, $IL-6$, AnnexinV⁺AAD⁻, $CD95^+$ та IAM ($r=+0,5$) і кореляційний зв'язок середньої зворотньої сили з $CD25^+$ ($r=-0,5$).

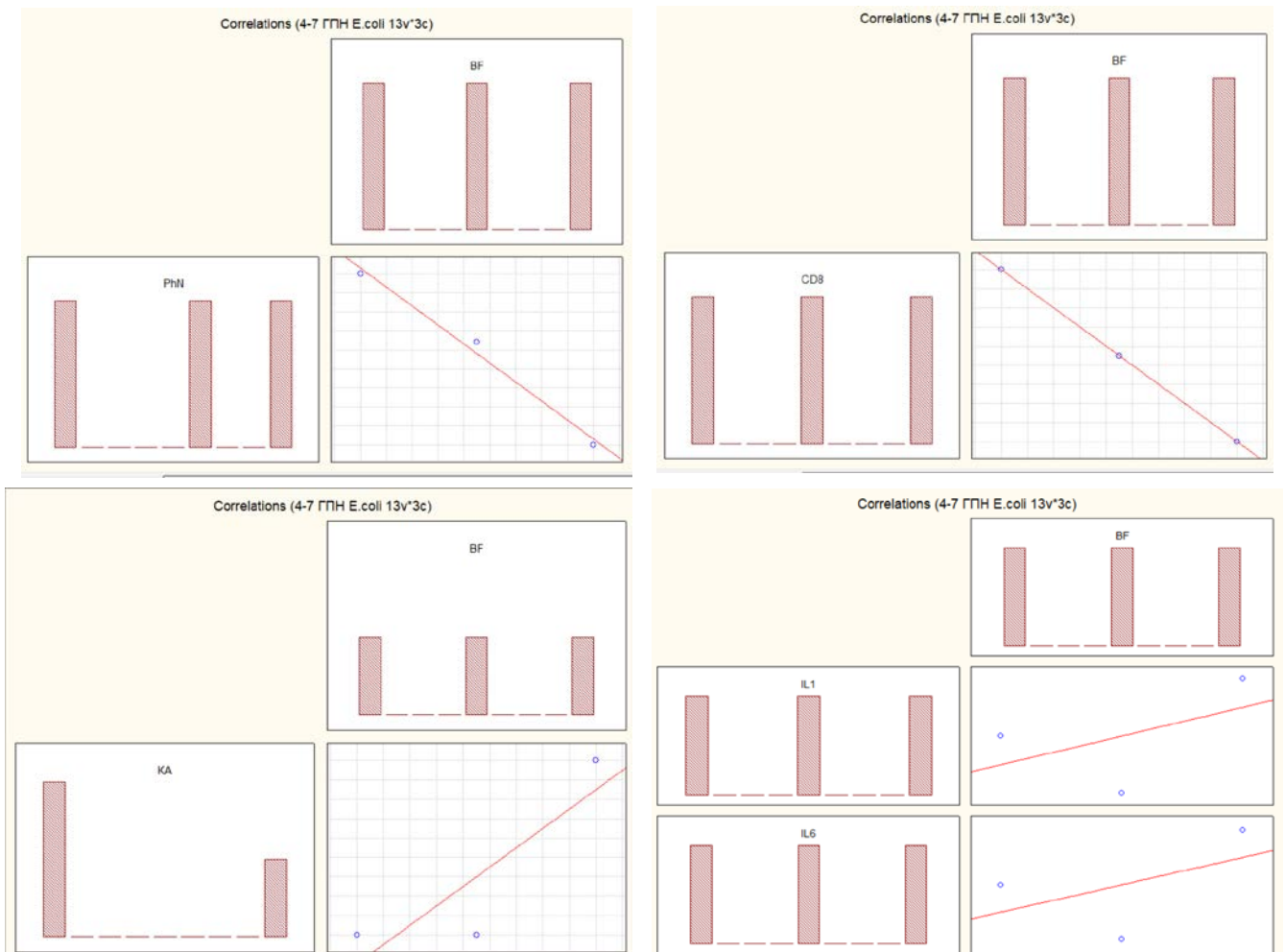


Рисунок 6.2. Кореляційні зв'язки між показником щільності біоплівки *Escherichia coli* та ФЧ, $CD8^+$, $IL-1\beta$, $IL-6$ та КА при ГПН у дітей середньої вікової категорії.

У дітей старшого віку з ГПН, зумовленим *Escherichia coli*, значення BF (рис. 6.3) має високий прямий кореляційний зв'язок з показниками NETs ($r=+0,74$), AnnexinV⁺AAD⁻ ($r=+0,76$), $IL-1\beta$ ($r=+0,78$) $IL-6$ ($r=+0,84$), $CD95^+$ ($r=+0,88$) та IAM ($r=+0,86$). Високий зворотній кореляційний зв'язок

спостерігався з $CD25^+$ ($r=-0,76$), середньої сили – з ФЧ ($r=-0,64$), $CD4^+$ ($r=-0,59$) й $CD8^+$ ($r=-0,68$).

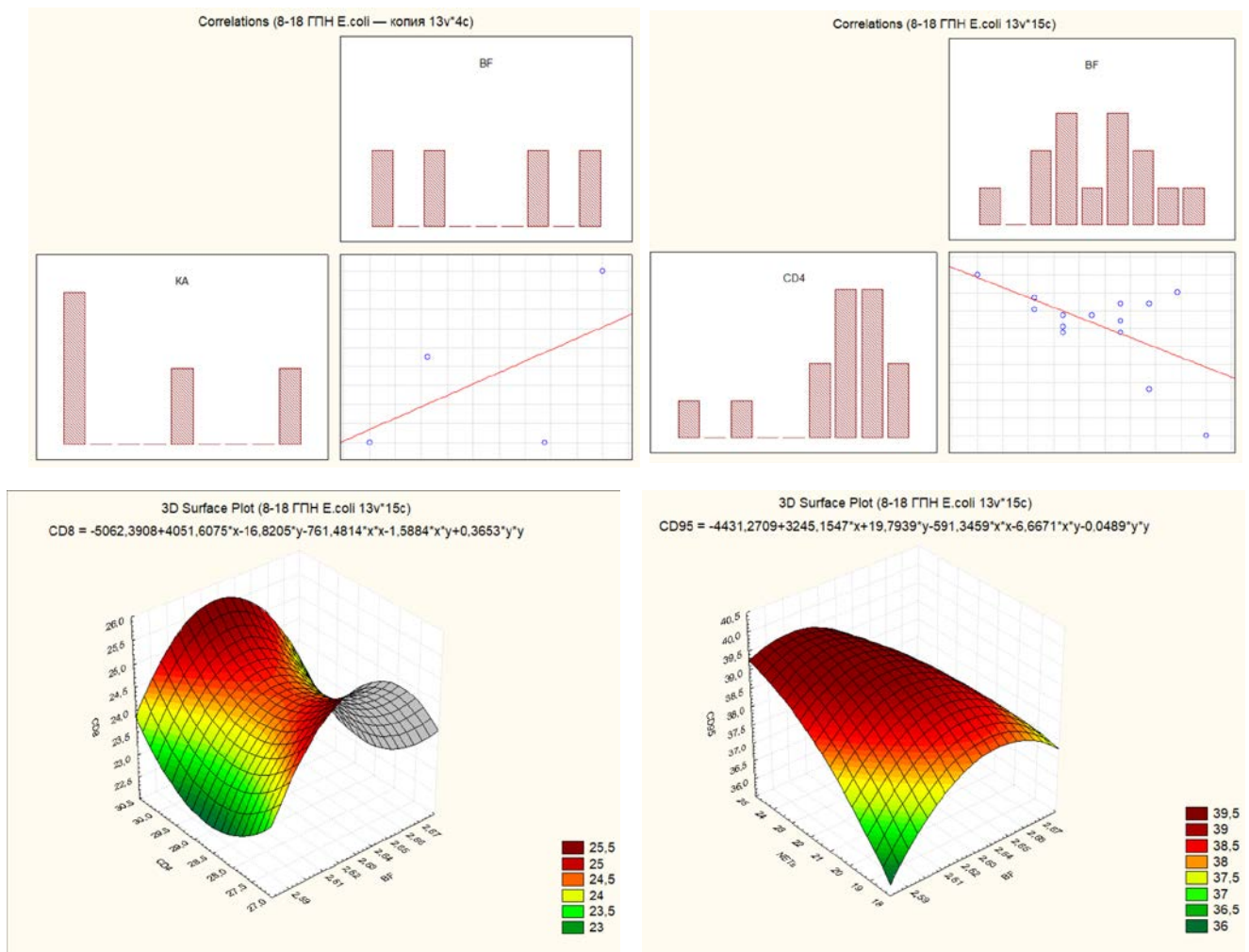


Рисунок 6.3. Взаємозв'язки між показником щільності біоплівки *Escherichia coli* та $CD4^+$, $CD8^+$, $CD95^+$, NETs та КА при ГПН у дітей старшого віку.

У дітей раннього віку з ХПН, що зумовлений *Escherichia coli* (рис. 6.4), було виявлено сильний зворотній кореляційний зв'язок показника BF з $CD4^+$ ($r=-0,72$) та $CD8^+$ ($r=-0,75$). З іншими показниками неспецифічної резистентності встановлено помірні кореляційні зв'язки різної спрямованості: прямі з AnnexinV⁺AAD⁻, IAM, NETs, IL-1 β , IL-6 та зворотні з показниками: $CD25^+$ й ФЧ.

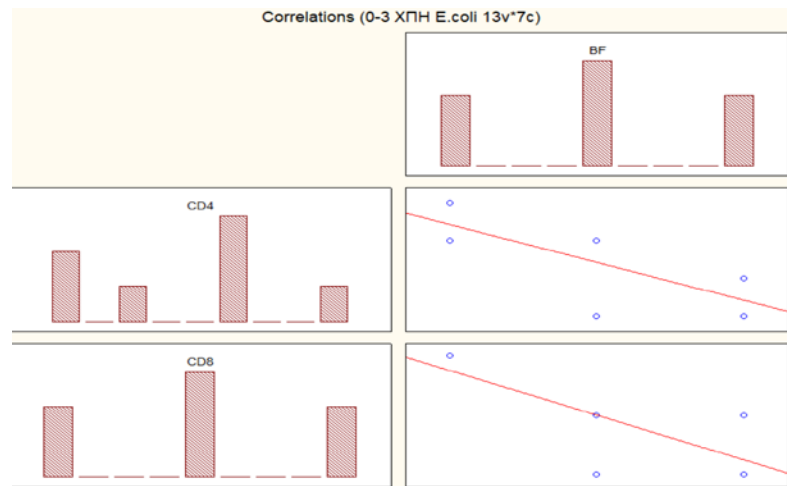


Рисунок 6.4. Взаємозв'язки між показником щільності біоплівки *Escherichia coli* та $CD4^+$ й $CD8^+$ при ХПН у дітей раннього віку.

При ХПН, зумовленому *Escherichia coli*, у дітей середнього віку (рис. 6.5) спостерігається прямий сильний кореляційний зв'язок показника BF з показниками NETs ($r=+0,89$) й IAM ($r=+0,7$) та сильний зворотній з $CD4^+$ ($r=-0,7$).

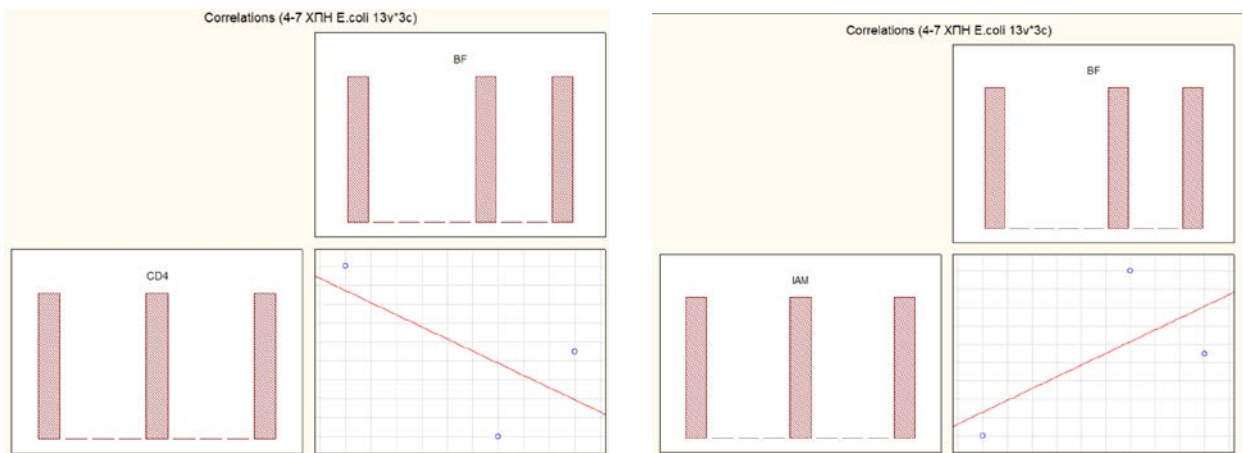


Рисунок 6.5. Взаємозв'язки між показником щільності біоплівки *Escherichia coli* та $CD4^+$, IAM й NETs при ХПН у дітей середнього віку.

У дітей старшого віку з ХПН, зумовленим *Escherichia coli*, значення BF (рис. 6.6) має високий прямий кореляційний зв'язок з IL-1 β ($r=+0,82$) і помірний зворотній кореляційний зв'язок з показниками CD8 $^+$ ($r=-0,32$) та CD25 $^+$ ($r=-0,2$).

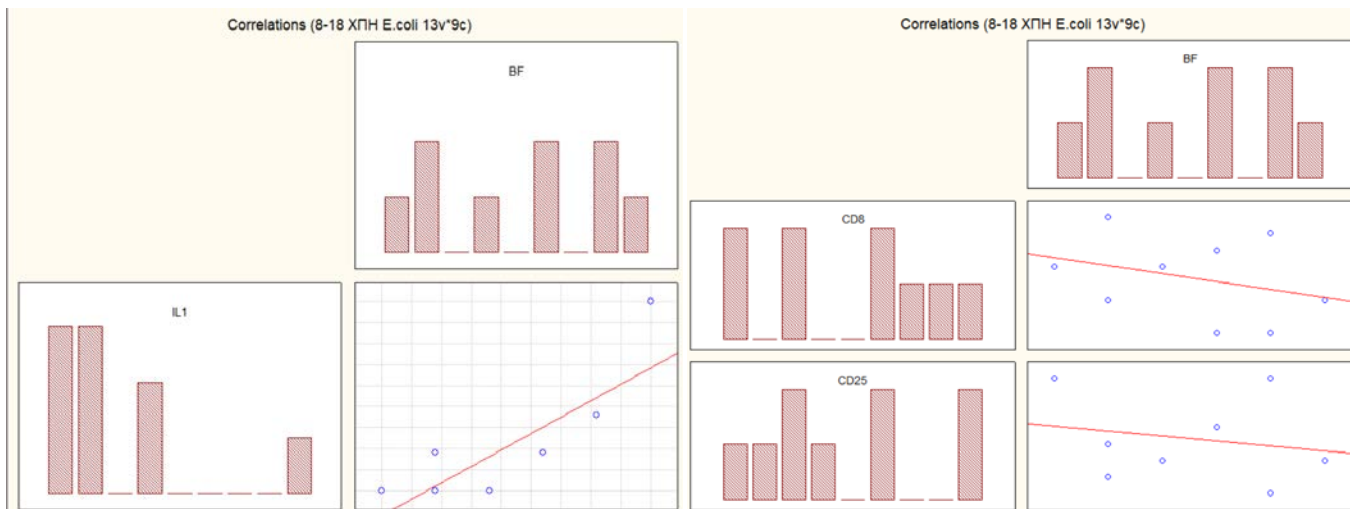


Рисунок 6.6. Взаємозв'язки між показником щільності біоплівки *Escherichia coli* та CD8 $^+$, CD25 $^+$ й IL-1 β при ХПН у дітей старшого віку.

У дітей раннього віку з ПН-ВГН, що зумовлений *Escherichia coli*, як при моноінфекції, так і в асоціаціях мікроорганізмів (рис. 6.7) було виявлено сильний зворотній кореляційний зв'язок показника BF з CD4 $^+$ ($r=-0,76$) і CD8 $^+$ ($r=-0,9$), а також сильний прямий кореляційний зв'язок між показником BF та IL-6 й IAM ($r=+0,9$).

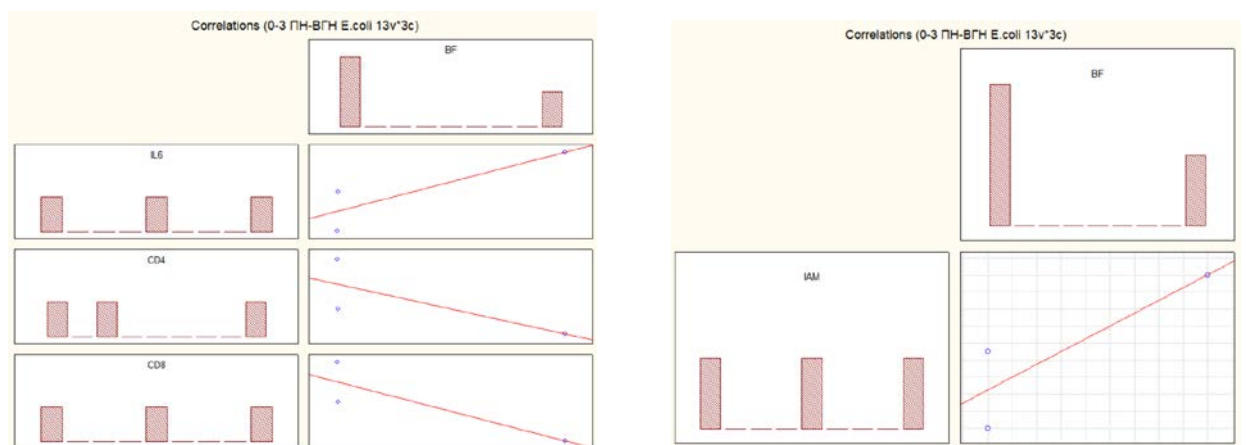


Рисунок 6.7. Взаємозв'язки між показником щільності біоплівки *Escherichia coli* та CD4 $^+$, CD8 $^+$, IL-6 й IAM при ПН-ВГН у дітей раннього віку.

При ПН-ВГН, зумовленому асоціацією мікроорганізмів, у склад якої входить *Escherichia coli*, у дітей середнього віку (рис. 6.8) спостерігається прямий середній кореляційний зв'язок показників ВФ й ІАМ ($r=+0,43$) та сильний зворотній – із $CD4^+$ ($r=-0,81$), тоді як з показниками $CD8^+$ ($r=-0,14$) й $CD25^+$ ($r=-0,25$) виявлено помірні кореляційні зв'язки.

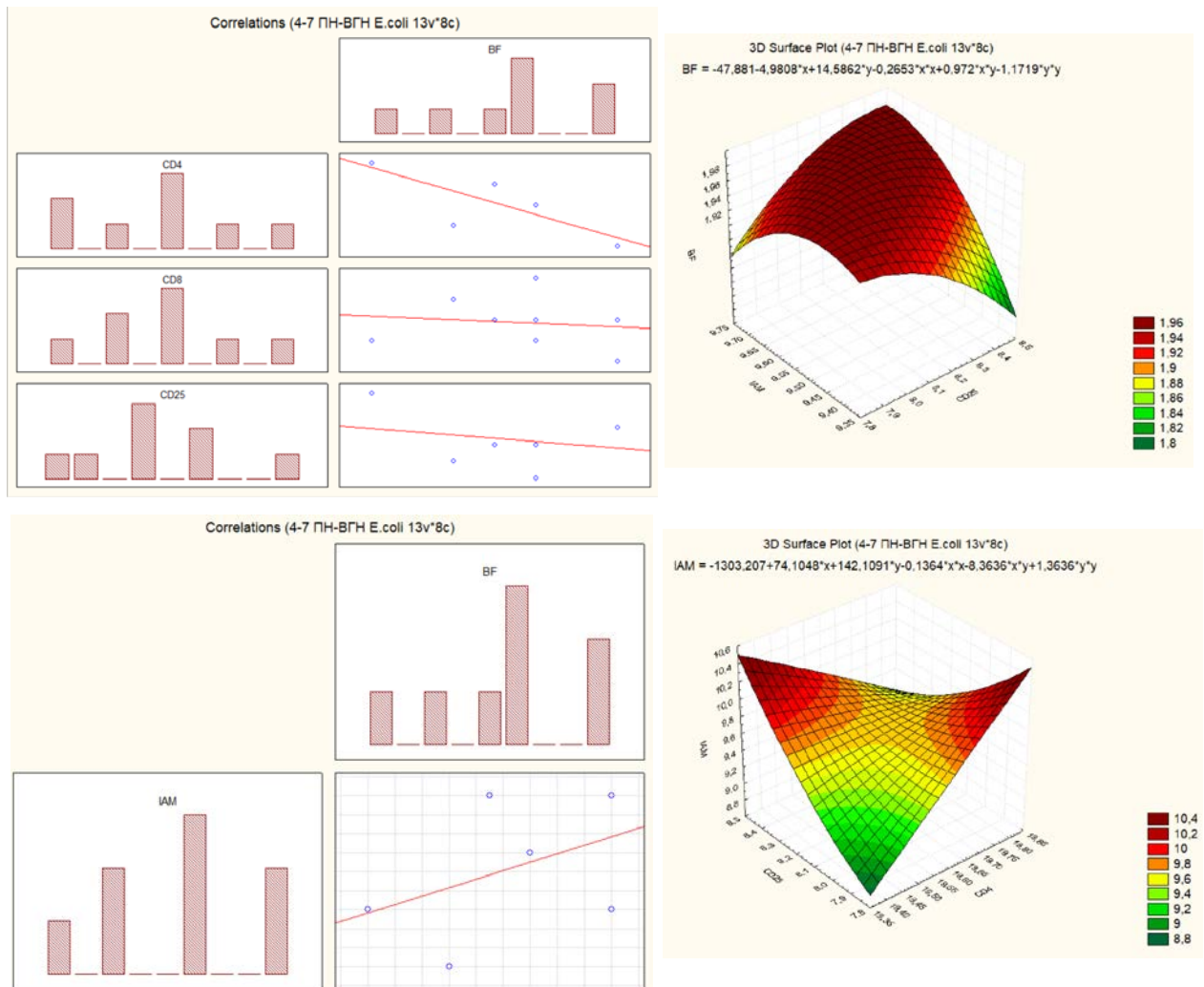


Рисунок 6.8. Взаємозв'язки між показником щільності *Escherichia coli* та $CD4^+$, $CD8^+$, $CD25^+$ та ІАМ при ПН-ВГН у дітей середнього віку.

У дітей старшого віку з ГН-ВГН, зумовленим асоціацією мікроорганізмів, до складу якої входить й *Escherichia coli*, показник ВФ (рис. 6.9) має високий зворотній кореляційний зв'язок з $CD4^+$ ($r=-0,74$), помірний кореляційний зв'язок спостерігався з $CD25^+$ ($r=-0,3$) та прямий середньої сили – з КА ($r=+0,55$).

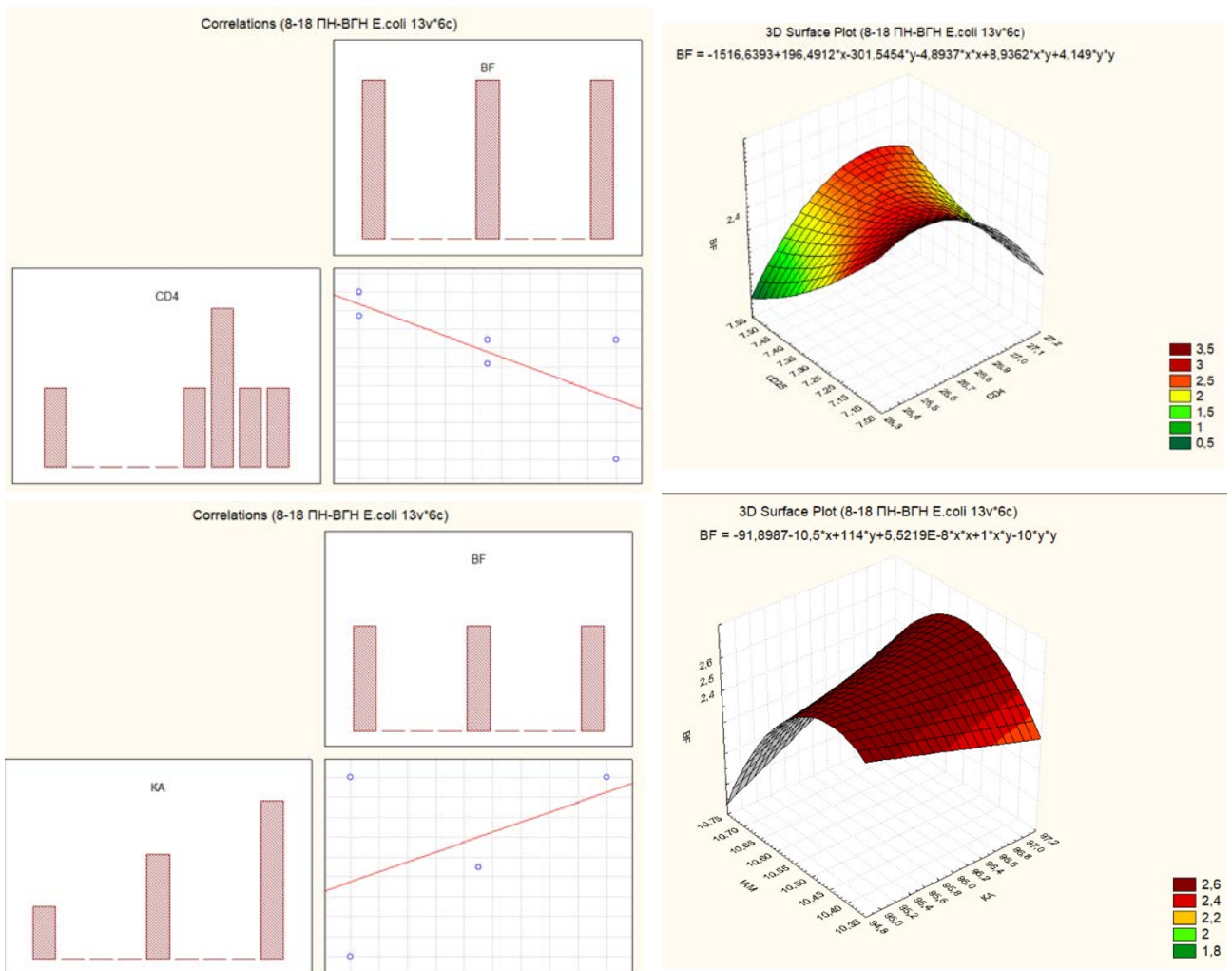


Рисунок 6.9. Взаємозв'язки між показником щільності біоплівки *Escherichia coli* та $CD4^+$ й $CD8^+$ при ХПН у дітей старшого віку.

Отримані результати встановлення кореляційних зв'язків між щільністю біоплівки *Enterococcus faecalis* та показниками неспецифічного імунного захисту в дітей раннього віку з ГПН (рис. 6.10) показують високий ступінь зворотної кореляційної значності між показником ВФ та ФЧ ($r=-0,98$) і $CD95^+$ ($r=-0,8$), середній прямий кореляційний зв'язок було встановлено з КА ($r=+0,67$).

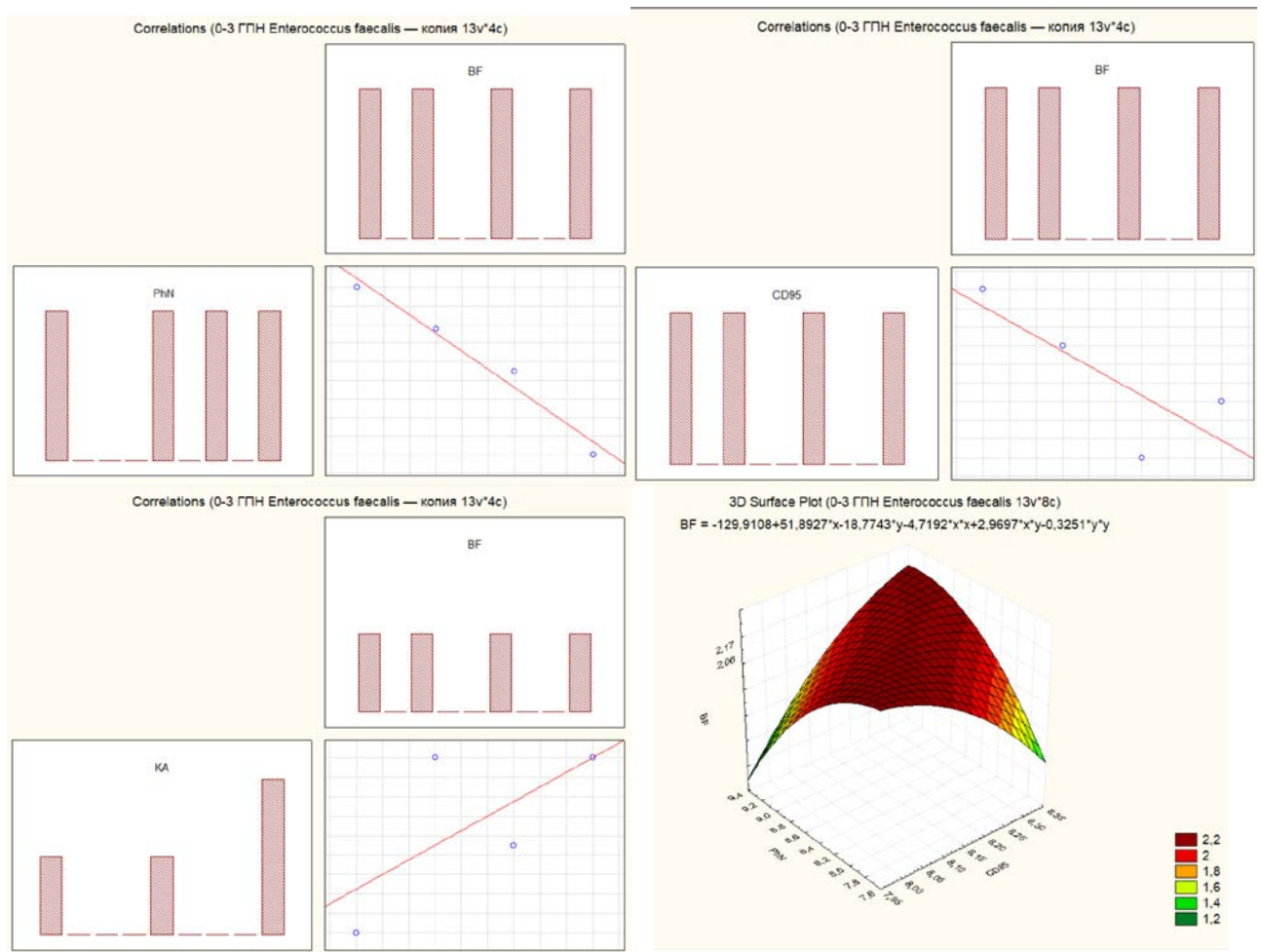


Рисунок 6.10. Взаємозв'язки між показником щільності біоплівки *Enterococcus faecalis* та $CD95^+$, ФЧ й КА при ГПН у дітей раннього віку.

Прямий сильний кореляційний зв'язок у дітей середньої вікової категорії з ГПН було встановлено між ВФ та $IL-1\beta$, $IL-6$ й $CD95^+$ ($r=+0,9$),

IAM ($r=+0,89$), зворотній сильного ступеня – $CD4^+$ ($r=-0,9$) і помірний ФЧ ($r=-0,28$) (рис. 6.11).

У дітей старшої вікової категорії сильний прямий кореляційний зв'язок виявлено між BF й $IL-1\beta$ ($r=+0,7$) та зворотній з ФЧ ($r=-0,81$), на відміну від показників $CD95^+$ ($r=+0,42$), AnnexinV⁺AAD⁻ ($r=+0,44$) й AnnexinV⁻AAD⁺ ($r=+0,39$), коли кореляційні зв'язки були середньої сили (рис. 6.12).

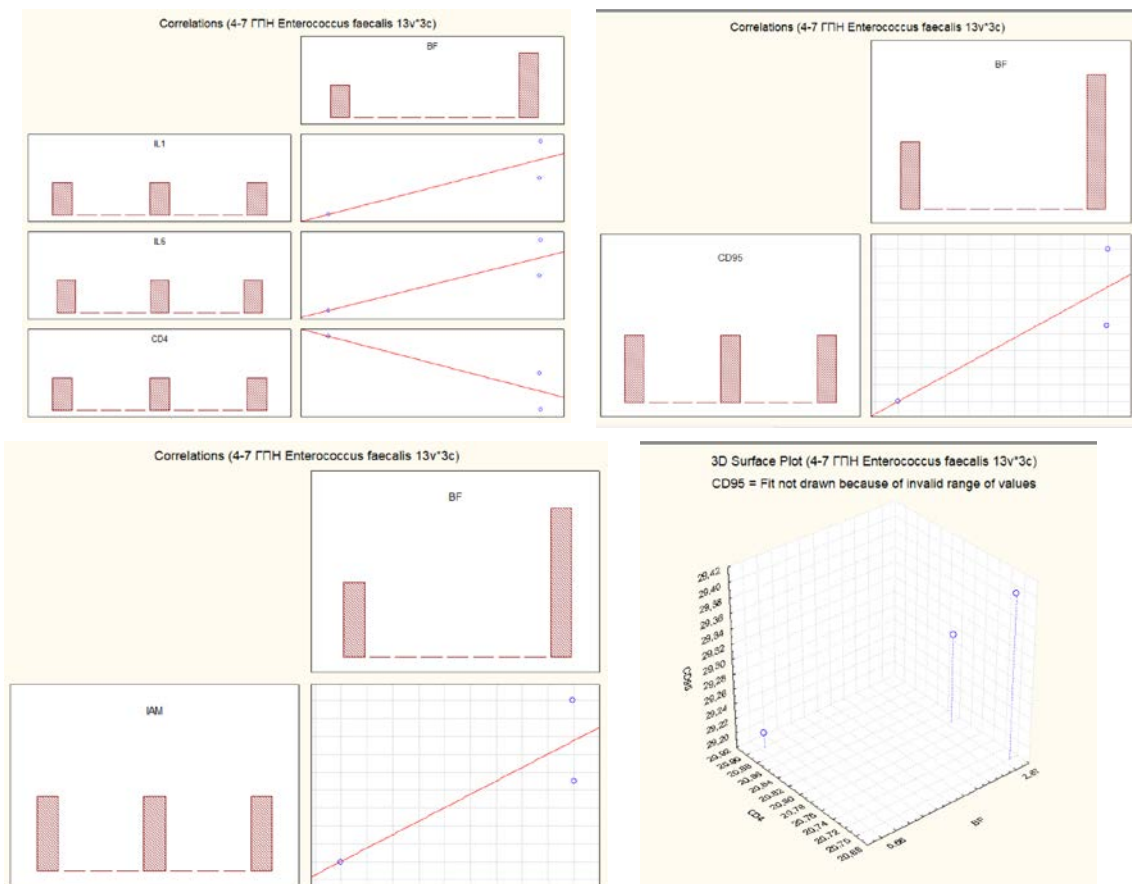


Рисунок 6.11. Взаємозв'язки між показником щільності біоплівки *Enterococcus faecalis* та $IL-1\beta$, $IL-6$, $CD4^+$, $CD95^+$, IAM й ФЧ при ГПН у дітей середнього віку.

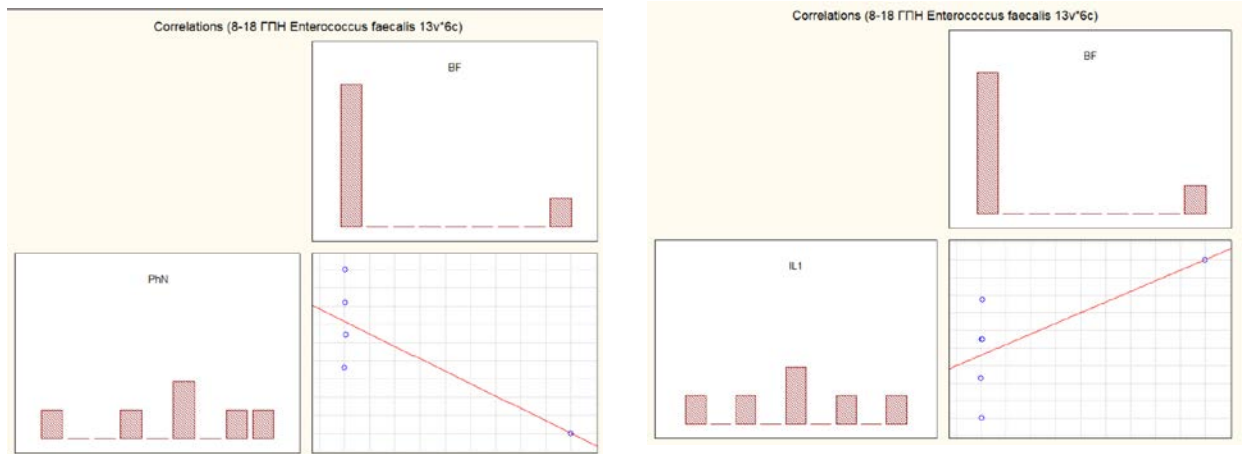


Рисунок 6.12. Взаємозв'язки між показником щільності біоплівки *Enterococcus faecalis* та $IL-1\beta$, $CD95^+$, $AnnexinV^-AAD^+$, $AnnexinV^+AAD^-$ і ФЧ при ГПН у дітей середнього віку

Результати статистичних досліджень, що описують зв'язок BF зі зміною показників неспецифічної резистентності в дітей раннього віку з ХПН, зумовленим *Enterococcus faecalis*, свідчать про наявність зворотніх зв'язків середньої сили: з ФЧ ($r=-0,65$), $CD95^+$ ($r=-0,53$), $CD4^+$ ($r=-0,47$) (рис.6.13).

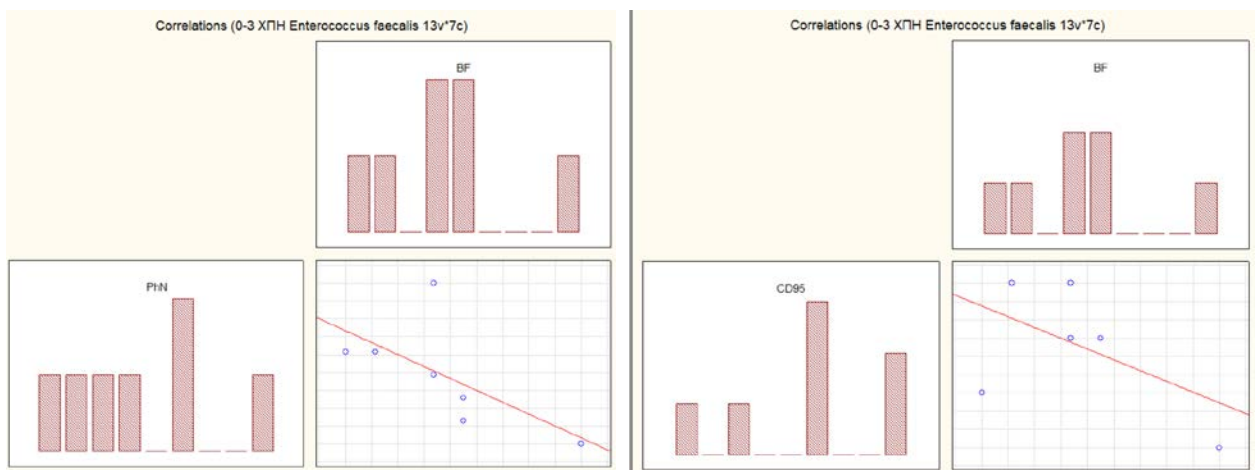


Рисунок 6.13. Зворотні кореляційні зв'язки середньої сили між показником BF *Enterococcus faecalis* та $CD95^+$ й ФЧ при ХПН у дітей раннього віку.

Установлено сильний прямий кореляційний зв'язок між BF *Enterococcus faecalis* та AnnexinV⁺AAD⁻ ($r=+1,0$), середньої сили – з IAM ($r=+0,5$) і зворотній середньої сили – з CD4⁺ й CD25⁺ ($r=-0,5$) та з ФЧ ($r=0,56$) (рис. 6.14), що підтверджує зміну показників клітинної ланки імунної системи залежно від щільності збудника ХПН у дітей середнього віку.

Крім того, середньої сили прямі зв'язки (рис. 6.15) було встановлено між BF та стадіями апоптозу: AnnexinV⁺AAD⁻ ($r=+0,55$) й AnnexinV⁻AAD⁺ ($r=+0,62$) у дітей старшої вікової категорії з ХПН, зумовленим *Enterococcus faecalis*.

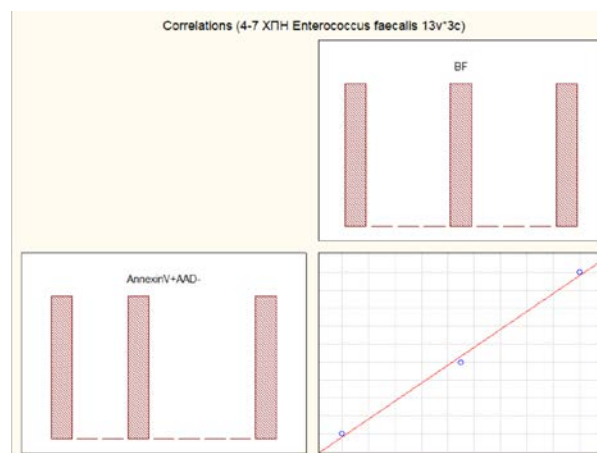


Рисунок 6.14. Корелятивні зв'язки між показником щільності біоплівки *Enterococcus faecalis* й AnnexinV⁺AAD⁻ й IAM при ХПН у дітей середнього віку.

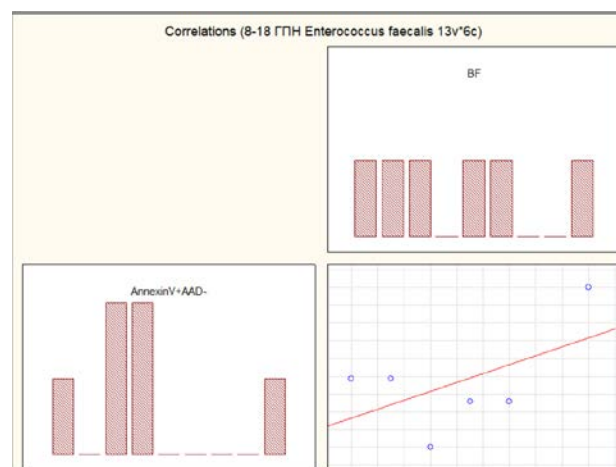


Рисунок 6.15. Середньої сили прямі кореляційні зв'язки між показником щільності біоплівки *Enterococcus faecalis* та стадіями апоптозу при ХПН у дітей старшого віку.

У дітей раннього віку з ПН-ВГН, зумовленим асоціацією мікроорганізмів, у склад якої входив *Enterococcus faecalis*, було виявлено (рис. 6.16) зворотні корелятивні зв'язки сильного ступеня між ВФ, CD4⁺ і CD25⁺ ($r=-1,0$), сильний прямий – з ІЛ-6 ($r=+0,98$) та середньої прямої сили – з КА ($r=+0,5$).

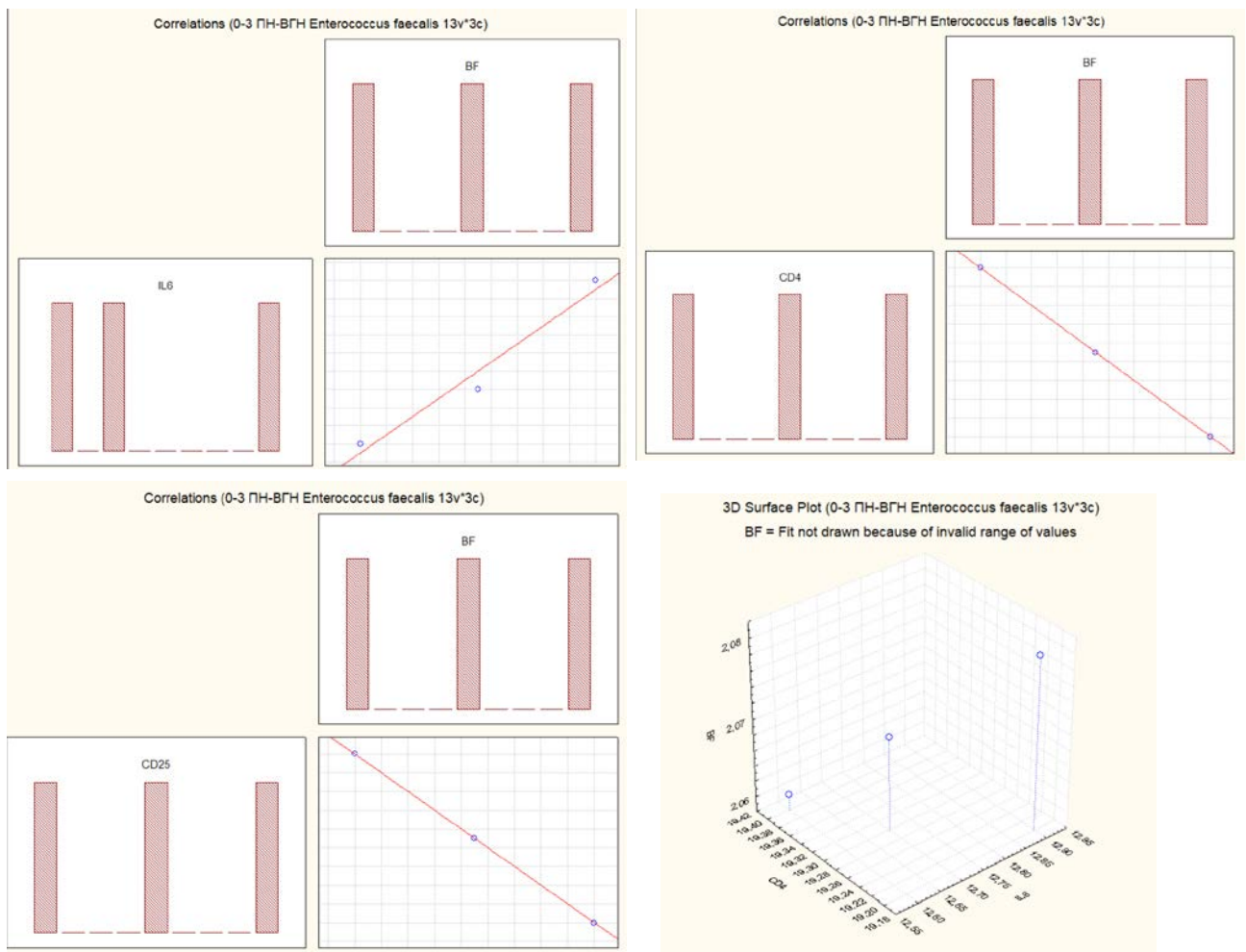


Рисунок 6.16. Взаємозв'язки між показником щільності біоплівки *Enterococcus faecalis* та ІЛ-6, CD4⁺ й CD25⁺ при ПН-ВГН у дітей раннього віку.

Виявлено сильний прямий кореляційний зв'язок між ВФ *Enterococcus faecalis* та КА⁻ ($r=+0,95$), CD95⁺ ($r=+0,8$), NETs ($r=+0,74$) і сильний зворотній – з CD4⁺ ($r=-1,0$) та з ФЧ ($r=-0,99$) (рис. 6.17) у дітей середнього віку з ПН-ВГН.

Прямий сильний зв'язок (рис. 6.18) було зафіксовано між ВФ та стадіями апоптозу: AnnexinV⁺AAD⁻ ($r=+0,73$) й AnnexinV⁻AAD⁺ ($r=+0,74$) у дітей старшої вікової категорії з ПН-ВГН, зумовленим асоціацією мікроорганізмів з *Enterococcus faecalis*. Виявлено прямий кореляційний зв'язок середньої сили між ВФ та КА ($r=+0,63$).

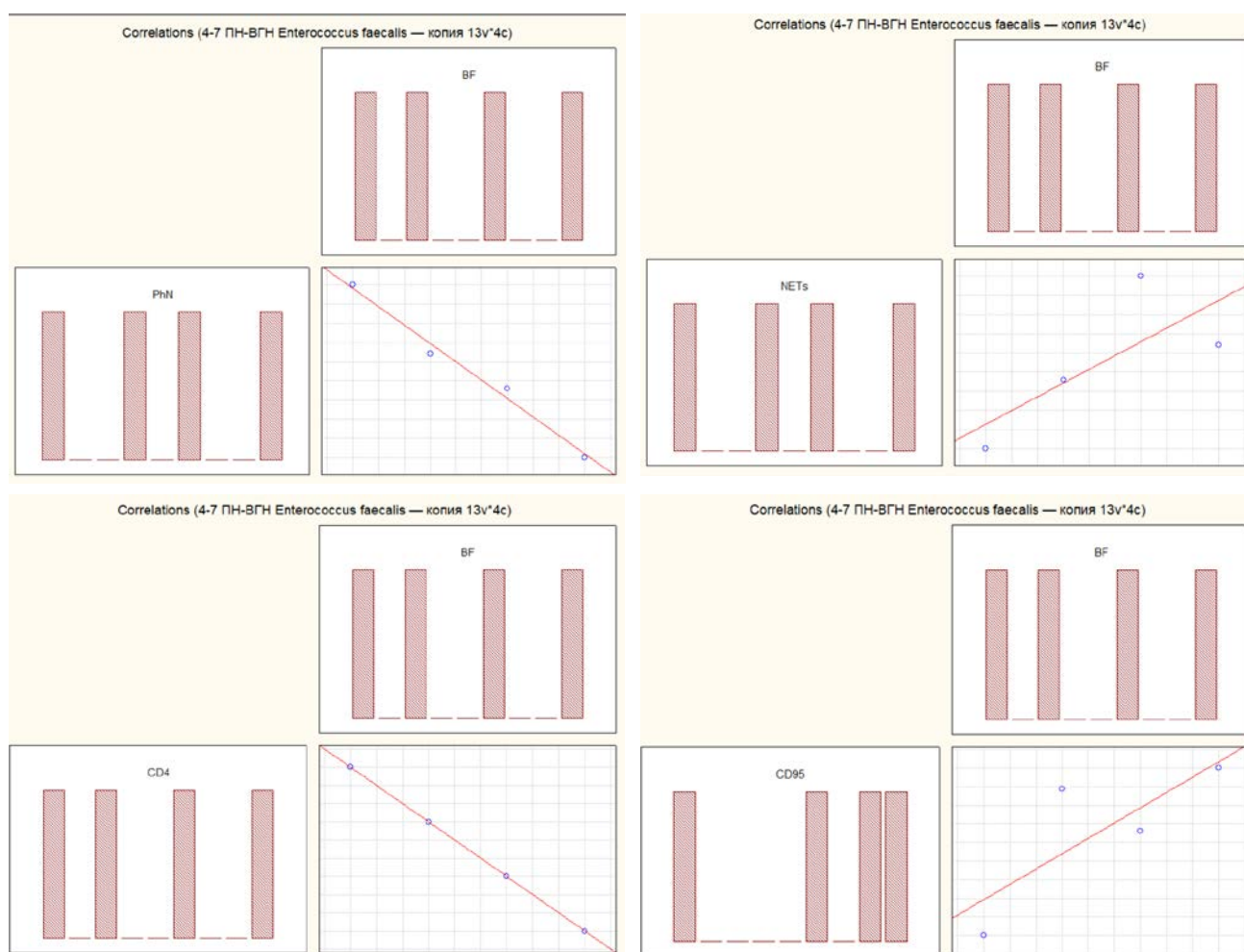


Рисунок 6.17. Взаємозв'язки між показником щільності біоплівки *Enterococcus faecalis* та ФЧ, NETs, CD4⁺, CD95⁺ при ПН-ВГН у дітей середнього віку.

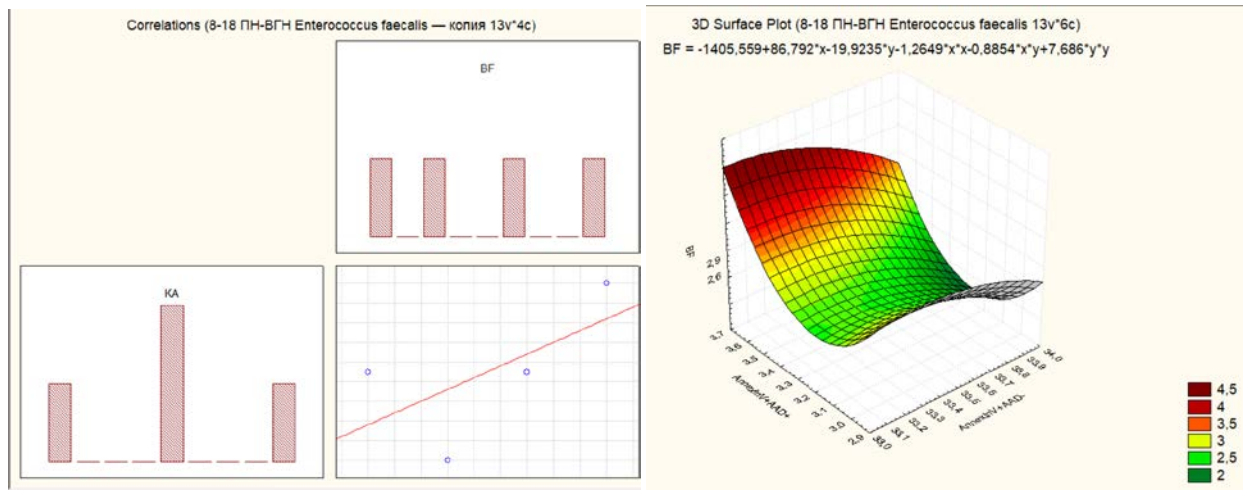


Рисунок 6.18. Сильні прямі кореляційні зв'язки між BF *Enterococcus faecalis* та стадіями апоптозу при ПН-ВГН у дітей старшого віку

Висновки до розділу 6:

Ключовими міжклітинними зв'язками в каскаді взаємодій між показниками імунного, цитокінового стану, апоптозу нейрофілів є здатність до формування щільних біоплівки збудниками пієлонефритів, що обумовлює виникнення рецидивів при імунодепресивному стані хворої дитини, особливо при пієлонефриті на фоні вродженого гідронефрозу. Таким чином, під час проведення цього дослідження було виявлено міжклітинні взаємозв'язки при всіх клінічних формах захворювання, але вони мали різну силу.

АНАЛІЗ Й УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Одне з провідних місць серед запальних захворювань сечовивідних шляхів у дітей посідає пієлонефрит, перебіг якого здебільшого являє собою важке інфекційне захворювання як основну причину розвитку хронічної ниркової недостатності, що загрожує життю дитини.

Відомо, що пієлонефрит є найбільш поширеним захворюванням дитячого віку з тенденцією до хронізації запального процесу та рецидиву. Одночасно відзначається збільшення в дітей частоти вторинних пієлонефритів, пов'язаних з уродженими аномаліями розвитку сечової системи, такими як уроджений гідронефроз. Незважаючи на постійне збільшення кількості антибактеріальних препаратів і призначення відповідно до чутливості збудника до них, не завжди вдається провести ефективну протимікробну терапію. Рецидивуючий характер пієлонефриту в дітей, що виник унаслідок уродженого гідронефрозу, відсутність бажаного ефекту від етіотропної терапії пояснюються не тільки наявністю високовірулентної мікрофлори, а й складними патогенетичними механізмами, у розвитку яких важливу роль відіграє імунна система. Роль імунних механізмів у патогенезі вторинних пієлонефритів у дітей набуває особливо важливого значення з урахуванням незрілості імунної системи й недосконалістю багатьох її функцій у дитячому організмі. Вторинний пієлонефрит у дітей з уродженим гідронефрозом виникає на тлі вже наявної імунологічної перебудови організму внаслідок порушення диференціювання тканин сечового тракту. Виникнення запалення в сечовій системі обумовлено взаємодією двох основних чинників – особливостями імунітету дитини і патогенетичними особливостями збудника пієлонефриту. Однак проведений літературний аналіз показав, що питання, які стосуються неспецифічної відповіді вродженого й адаптивного імунітету, зокрема інтенсивність фагоцитозу, здатність до формування нейтрофілами позаклітинних пасток, роль апоптозу,

характер цитокинової відповіді, недостатньо вивчені та є суперечливими. Крім того, відсутні дані про фенотипування субпопуляцій Т- і В-лімфоцитів, їх активації при пієлонефриті в дітей на тлі вродженого гідронефрозу в активній стадії захворювання.

Дисертацію присвячено вивченню особливостей процесу формування бактеріальних біоплівки збудниками пієлонефритів у дітей залежно від стану показників факторів неспецифічної резистентності організму.

Проведене дослідження виявило етіологічні особливості пієлонефритів у дітей з одночасним установленням особливостей формування біоплівки збудниками з визначенням стадій для кожного з ізолятів та встановленням здатності до продукування планктонних клітин добовими біоплівками як фактора колонізації мікроорганізмів з метою розроблення діагностичних критеріїв та подальшого визначення ефективних протимікробних засобів для запобігання рецидивів пієлонефритів у дітей.

Унаслідок проведеного дослідження встановлено, що найчастіше при гострій формі первинного пієлонефриту виділяли *Escherichia coli* й *Enterococcus faecalis* у дітей вікової категорії від 8 до 18 років (17,1%), а при хронічній формі первинного пієлонефриту – *Enterococcus faecalis* й *Escherichia coli* (по 14,3%) у дітей вікової категорії від 0 до 3 років та *Escherichia coli* (18,4%) у дітей вікової категорії від 8 до 18 років. У дітей з хронічною формою первинного пієлонефриту вікової категорії від 4 до 7 років висівали *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* та *Klebsiella pneumoniae* з однаковою частотою (6,1%). Проведений аналіз показав, що частіше на пієлонефрит хворіли дівчата, причому випадки гострої форми в 3,3 раза частіші, ніж у хлопчиків, випадки хронічної форми первинного пієлонефриту в дівчат частіші, ніж у хлопчиків, у 6,8 раза, що пов'язано з анатомо-фізіологічними особливостями.

Уроджені обструктивні аномалії сечових шляхів у дітей залишаються актуальною проблемою дитячої нефрології. Найбільш поширеним серед них

є гідронефроз, який нерідко ускладнюється інфекцією, що сприяє виникненню пієлонефриту і, як наслідок, хронізації інфекційного процесу з частими випадками рецидивів. Відомо, що недостатня ефективність проведеного лікування бактеріального пієлонефриту певною мірою пояснюється наявністю в мікроорганізмів механізмів захисту від зовнішніх факторів, забезпечує виражену селективну дію на збудників пієлонефриту і сприяє відбору резистентних ізолятів. Тому було визначено провідні збудники пієлонефриту в дітей з пієлонефритом унаслідок гідронефрозу. Установлено, що в дітей з уродженим гідронефрозом, ускладненим пієлонефритом, вікової категорії від 0 до 3 років збудниками пієлонефритів були *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* та *Escherichia coli*, причому в 75% випадків спостерігалася моноінфекція. У дітей з пієлонефритом унаслідок уродженого гідронефрозу вікової категорії від 4 до 7 років у всіх випадках було виявлено збудників пієлонефритів в асоціаціях. У виникненні пієлонефриту як ускладнення вродженого гідронефрозу зростає питома вага родини *Enterobacteriaceae* (57,9%): 42,1% – *Escherichia coli* та по 5,3% *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*. Грампозитивні коки висівали в 15,8% випадків: 10,5% *Enterococcus faecalis* й 5,3% *Staphylococcus epidermidis*. Такий відсоток ізолятів виявлено й *Candida albicans*. Привертає увагу поява *Pseudomonas aeruginosa*, питома вага якої становить 10,5%. У дітей вікової категорії від 8 до 18 років найбільш частими збудниками пієлонефритів унаслідок уродженого гідронефрозу були представники родини *Enterobacteriaceae* (56%), які виявлялися в асоціаціях зі *Enterococcus faecalis* та *Candida albicans*.

На сьогодні фахівцями різних країн встановлено унікальну роль важливих ефекторних клітин, які мають ключове значення в імунному захисті організму від інфекційних чинників гнійно-запальних процесів, зокрема пієлонефритів, особливо в дітей, оскільки їхня імунна система зазнає постійних змін у процесі розвитку. Відомо, що одними з головних клітин, які беруть участь в ініціації та регулюванні вродженого й адаптивного імунітету

шляхом міжклітинної контакту і через продукування біологічно активних медіаторів, є нейтрофіли.

Труднощі в лікуванні пієлонефриту в дітей виникають у зв'язку з надзвичайним зростанням стійкості мікроорганізмів до антимікробних засобів, яку пов'язують з можливістю бактерій утворювати навколо себе захисну плівку [16], а також зі змінами у функціональній активності неспецифічної ланки імунітету, зокрема в роботі нейтрофільних гранулоцитів. Дані про здатність біоплівкоутворення провідних збудників пієлонефритів у дітей залежно від змін функціональної активності нейтрофільних гранулоцитів практично відсутні, а їхнє одержання становить значний науковий інтерес і може мати прикладне значення на етапі призначення комплексної терапії. Тому вивчення показників функціональної активності нейтрофілів у дітей з пієлонефритом різних вікових категорій залежно від здатності утворювати біоплівки провідними збудниками є актуальним.

При виявленні здатності до формування біоплівок бактеріями – збудниками пієлонефритів у дітей за допомогою світлової, люмінесцентної і скануючої мікроскопії було встановлено, що всі ізоляти утворювали біоплівки: адгезія окремих бактеріальних клітин *Pseudomonas aeruginosa* відбувається з подальшим формуванням конгломератів, оточених матриксом, й утворенням біоплівки, за якою проглядалися бактеріальні клітини, розташовані у вигляді подовжених паличок, що мали щільну структуру у вигляді гелю. При дослідженні добових біоплівок ізолятів *Klebsiella pneumoniae* з'ясовано, що вони покриті щільним матриксом і пронизані численними каналами у вигляді отворів. Бактеріальні клітини *Enterococcus faecalis* у складі біоплівок були щільно упаковані й об'єднані міжклітинним матриксом, під яким видно бактерії кулястої форми. Таким чином, на поверхні конгломератів, що складаються з бактеріальних клітин, формуються біоплівки, природа яких залежить від виду бактерій. Формуванням біоплівок

пояснюються особливості перебігу та виникнення хронічної форми і рецидивів пієлонефриту в дітей.

Отже, було виявлено такі особливості: формування зрілої біоплівки збудників гострих пієлонефритів у дітей молодшого віку відбувалося повільніше, на відміну від утворення первинної біоплівки збудниками хронічної форми пієлонефритів дітей, щільність біоплівки була меншою за щільність добових біоплівок ізолятів у дітей з хронічною формою. При визначенні оптичної щільності добових біоплівок з'ясовано, що всі ізоляти гострої форми пієлонефриту в дітей раннього віку утворювали біоплівки зі щільністю: *Escherichia coli* - $2,34 \pm 0,14$ од.ощ.; *Klebsiella pneumoniae* - $3,21 \pm 0,27$ од.ощ.; *Enterococcus faecalis* - $2,19 \pm 0,21$ од.ощ. з активним продукуванням планктонних клітин. Ізоляти хронічної форми пієлонефриту формували щільні біоплівки: *Proteus mirabilis* – $3,84 \pm 0,21$ од.ощ.; *Escherichia coli* – $3,68 \pm 0,19$ од.ощ.; *Klebsiella pneumoniae* – $4,56 \pm 0,28$ од.ощ.; *Enterococcus faecalis* – $4,13 \pm 0,26$ од.ощ.

При визначенні адгезивної властивості ізолятів при пієлонефриті в дітей з уродженим гідронефрозом було встановлено, що всі ізоляти мали високу адгезивну активність, але індекс адгезивної активності збудників пієлонефриту в дітей з уродженим гідронефрозом відрізнявся в різних вікових категоріях. Так, ізоляти *Escherichia coli*, вилучені при пієлонефритах у дітей з уродженим гідронефрозом, проявляли найвищу активність у дітей старшої вікової категорії, де ІАМ для *Escherichia coli* становив 10,6, та в дітей раннього віку – ІАМ для *Escherichia coli* дорівнював 6,6 проти інших ізолятів. У дітей середньої вікової категорії найбільш високоадгезивними штамми були *Pseudomonas aeruginosa* - ІАМ дорівнював 10,8; *Escherichia coli* – 9,6; *Candida albicans* – 8,6; *Klebsiella pneumoniae* – 8,3 та *Enterococcus faecalis* – 8,0. Дослідження структурно-функціональних особливостей формування біоплівок провідними збудниками пієлонефриту на фоні вродженого гідронефрозу в дітей залежно від віку виявило низку особливостей і закономірностей. На першому етапі формування біоплівок

ізолятами, що виділені в дітей вікової категорії 0-3 роки, прикріплення кокоподібних бактерій до субстрату відбувається швидше за грамнегативні палички, а саме: *Enterococcus faecalis* – через 2-4 години, *Staphylococcus epidermidis* – через 3-5 годин, а *Escherichia coli* - 6-8 годин. Було виявлено відокремлені структури, що склалися з декількох клітин з формуванням тонкого покриву. Установлено, що найтривалішими етапами формування первинної біоплівки в дітей молодшого віку є етап коагрегації, який спостерігається в кокоподібних бактерій *Enterococcus faecalis* й *Staphylococcus epidermidis* – 9 годин та етап дисперсії, що триває 12 годин в ізолятів *E.coli*. Зафіксовано формування моношару ізолятами у вигляді ущільнених ділянок із скупченням клітин та утворення мікроколоній різних розмірів, що об'єднані міжклітинним матриксом клітин. При визначенні здатності до колонізації ізолятів з формуванням вторинної біоплівки було встановлено, що найтривалішим етапом є етап реадсорбції в *Staphylococcus epidermidis* та в *Enterococcus faecalis* – 12 годин, а найкоротшим є етап реагрегації, який дорівнював 2 годинам у всіх виявлених збудників. У дітей середнього віку серед провідних збудників пієлонефриту, зумовленого вродженим гідронефрозом, було ідентифіковано *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans* та встановлено такі особливості: тривалість стадії адгезії мікроорганізмів до субстрату скорочувалася на 1-2 години порівняно з аналогічними показниками в дітей раннього віку. Для *Candida albicans* тривалість стадії адгезії становила 2-6 годин.

За рахунок утворення міжклітинних зв'язків відзначалася іммобілізація планктонних клітин і формування вторинних мікроколоній, які пов'язані з первинними, а також утворення мікропорожнин у матриксі, синтез якого зумовлено викидом екстрацелюлярних речовин у вигляді полімерних сіток, що забезпечують механічну стабільність сформованих біоплівок. Надалі було встановлено, що завершення формування біоплівок в ізолятів *Escherichia coli*

відбувається на 4–6 годин раніше за аналогічні показники в дітей раннього віку. Така сама тенденція спостерігається й в ізолятів *Enterococcus faecalis* – на 12 годин, а в *Staphylococcus epidermidis* – на 8 годин, що є особливістю завершального етапу утворення біоплівок збудниками пієлонефриту в дітей з уродженим гідронефрозом.

Найтривалішим етапом у формуванні вторинної біоплівки є етап реакреації ізолятів *Candida albicans* (14 годин). Що стосується особливостей утворення біоплівок провідними збудниками пієлонефриту внаслідок вродженого гідронефрозу в дітей старшої вікової категорії, то було встановлено, що весь цикл утворення первинних і вторинних біоплівок грамнегативними бактеріями триває 26-32 годин, а грампозитивними – 24-34 години. Тривалість кожного з етапів скорочується порівняно з групами дітей молодших вікових категорій. Найповільнішим етапом є завершальний етап формування вторинної біоплівки, що триває в грампозитивних бактерій 4 години, а в грамнегативних – 6 годин за винятком ізолятів *Klebsiella pneumoniae*, у яких етап формування вторинної біоплівки триває 8 годин. Спостерігається повторне злиття мікроколоній з утворенням кластерів, на лініях формування яких виявляються пори й канали, оточені мембранними структурами. У центрі мікроколонії більш розвинені, ніж на периферії, а між клітинами виявляються довгі структури на зразок анастомозів і структури шароподібної форми, що беруть участь у формуванні нових мікроколоній шляхом колонізації вільних ділянок субстрату. Привертає увагу етап коагрегації ізолятів при формуванні первинних біоплівок: хоч початок цього етапу зафіксовано раніше на 3-4 години від аналогічних показників у дітей молодшої вікової категорії, але його тривалість становить 10-11 годин, що є одним з найповільніших серед усіх етапів формування як первинних, так і вторинних біоплівок ізолятами. Унаслідок кількісного аналізу проведеного дослідження було встановлено, що всі ізоляти здатні формувати щільні біоплівки: у дітей раннього віку *Staphylococcus epidermidis* – $1,95 \pm 0,01$ од.ощ.; *Enterococcus faecalis* – $2,07 \pm 0,01$ од.ощ. та *Escherichia coli* – $1,76 \pm 0,01$

од.ощ. У дітей з пієлонефритом на фоні вродженого гідронефрозу вікової категорії від 4 до 7 років ізоляти утворювали біоплівки такої щільності: *Enterococcus faecalis* – $2,29 \pm 0,015$ од.ощ.; *Escherichia coli* – $1,96 \pm 0,006$ од.ощ.; *Pseudomonas aeruginosa* – $2,47 \pm 0,014$ од.ощ. й *Candida albicans* – $3,61 \pm 0,02$ од.ощ. У дітей з пієлонефритом на фоні вродженого гідронефрозу вікової категорії від 8 до 18 років ізоляти утворювали біоплівки щільністю: *Escherichia coli* – $2,51 \pm 0,017$ од.ощ.; *Proteus mirabilis* – $2,73 \pm 0,066$ од.ощ.; *Enterococcus faecalis* – $2,82 \pm 0,011$ од.ощ.; *Klebsiella pneumoniae* – $3,14 \pm 0,012$ од.ощ. та *Candida albicans* – $4,05 \pm 0,018$ од.ощ. Таким чином, виявлено здатність збудників пієлонефритів у дітей до формування щільних біоплівок, особливо у віці від 8 до 18 років, що є передумовою виникнення хронічної форми та рецидивів. Отже, застосування конфокальної мікроскопії дало змогу встановити, що біоплівки мікроорганізмів – збудників пієлонефритів у дітей з уродженим гідронефрозом мають складну тримірну структурну організацію, а після формування первинної біоплівки ізолятами відбувається активне продукування планктонних клітин, які колонізують організм дитини. Після повторної незворотної адгезії починається інтенсивне зростання популяції збудників і формування багатоклітинних шарів із синтезом щільного екзополімерного матриксу, що є одним з ключових моментів утворення вторинних біоплівок. Причому клітини в слизовому екзополімерному матриксі розташовуються структуровано у вигляді багатоклітинних кластерів, що нагадують стовпи або дерева, мають порожнини та поділені каналами. Клітини мікроорганізмів у складі біоплівок мають поліморфну організацію: виявляються клітини зі зміненою морфологією, зокрема в *Enterococcus faecalis* спостерігалися подовжені або витягнуті клітини. Здобуті в роботі результати не суперечать провідним дослідженням цього спрямування та доповнюють наукові дані про стадії формування біоплівок мікроорганізмами – збудниками пієлонефритів у дітей.

При застосуванні препаратів похідних нітрофуранів пригнічується біоплівкоутворення патогенними мікроорганізмами: *Proteus vulgaris* – у 32,1

раза; *Proteus mirabilis* – у 67,9 раза; *Escherichia coli* – у 65 разів; *Klebsiella pneumoniae* – у 66,9 раза, *Pseudomonas aeruginosa* – у 64,5 раза. При дослідженні дії похідних нітрофуранів на добові первинні біоплівки мікроорганізмів, збудників гострих та хронічних пієлонефритів у дітей встановлено, що оптична щільність їх практично не знижувалася, проте дані мікроскопії показують, що за їхнього впливу утворюються «пори - щілини» діаметром від 5,98 мкм до 21,66 мкм і більші, крізь які можливе проникнення антибактеріальних препаратів у біоплівку і вплив на планктонні форми існування мікроорганізмів з подальшою їх загибеллю або зниженням активної здатності утворювати щільні біоплівки, що попереджає розвиток рецидивів.

На сьогодні встановлено роль дисфункції компонентів імунітету, зокрема нейтрофілів, у дітей з пієлонефритом. Одним з механізмів, що дає змогу контролювати інтенсивність перебігу запальних реакцій у нирках при пієлонефритах, є апоптоз нейтрофілів, посилення якого може призвести до зниження імунної опірності організму, тоді як уповільнення апоптозу нейтрофілів сприяє вираженому пошкодженню тканин аж до розвитку системних реакцій. Іншим важливим механізмом реалізації функціональної активності нейтрофілів є формування нейтрофільних екстрацелюлярних пасток, здатних захоплювати антигенні часточки, зокрема збудників пієлонефритів.

Однак, незважаючи на те, що тільки сукупна реалізація функціональних властивостей нейтрофілів забезпечує повноцінну імунну відповідь, досі не вивчено функціональний стан нейтрофілів при пієлонефриті в дітей різного віку залежно від збудників. Тому визначення функціональної ролі нейтрофілів є дуже важливим у розумінні механізмів імунної відповіді при пієлонефриті в дітей різного віку залежно від рівня агресії збудників.

Аналізуючи параметри клітинного імунітету в дітей з гострою та хронічною формами пієлонефриту, ми встановили, що вони змінюються в

дітей різних вікових категорій: показники субпопуляцій лімфоцитів з маркерами диференціювання CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD25⁺ та CD95⁺ знижуються в дітей раннього віку, відзначається дисбаланс у клітинній ланці імунітету в дітей середнього та старшого віку: достовірне підвищення CD95⁺ з одночасним зниженням CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD25⁺. Причому було виявлено, що найнижчі значення за показниками CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD25⁺ спостерігалися в дітей, хворих на хронічний пієлонефрит, зумовлений *Enterococcus faecalis* та *Escherichia coli* у дітей старшого віку. Аналіз рівнів імуноглобулінів у дітей з гострою формою пієлонефриту продемонстрував, що показник сироваткового IgA був на рівні референтних значень у дітей раннього віку, а в дітей середнього та старшого віку відзначалася тенденція до пригнічення продукування цього імуноглобуліну. Установлено тенденцію до підвищення показника IgM у дітей раннього віку, тоді як у дітей старших груп даний показник був у межах референтних значень. У дітей з хронічною формою пієлонефриту спостерігалось пригнічення рівнів IgA та IgM з помірним підвищенням показника IgG. Дослідження прозапального цитокінового статусу в дітей з гострою та хронічною формами пієлонефриту дали змогу виявити достовірне збільшення їх продукції порівняно з референтними значеннями в усіх групах дітей незалежно від провідного збудника захворювання. Імунологічні дослідження в дітей з пієлонефритом на фоні гідронефрозу демонструють, що параметри клітинного імунітету змінюються у дітей різних вікових категорій порівняно з референтними значеннями, а саме: статистично значущі зміни незалежно від віку дитини та збудника захворювання відзначаються за кількістю CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ та CD25⁺, показники яких знижуються. Спостерігаємо зниження субпопуляції лімфоцитів з маркером диференціювання CD95⁺ у дітей раннього віку та достовірне підвищення цього показника в дітей середнього та старшого віку. Аналіз рівнів імуноглобулінів у дітей з пієлонефритом на фоні гідронефрозу дав змогу встановити, що показник сироваткового IgA суттєво не відрізнявся від референтних значень у дітей раннього віку, а в дітей середнього та

старшого віку було виявлено пригнічення продукування даного імуноглобуліну. Фагоцитарна кількість нейтрофілів та їхня поглинальна здатність були нижчі від контрольних значень. Низька ефективність фагоцитозу може спричиняти недостатню елімінацію циркулюючих імунних комплексів (ЦК), свідченням чого є достовірне підвищення рівня ЦК сироватки крові в дітей з пієлонефритом на фоні гідронефрозу в усіх вікових групах незалежно від збудника захворювання порівняно з показниками дітей контрольної групи. Найбільш високі показники виявлено в дітей, хворих на пієлонефрит на фоні гідронефрозу в активній стадії, у старшій групі, де провідними збудниками захворювання були переважно *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* та *Klebsiella pneumoniae*.

Виявлене зниження рівня імунорегуляторних CD4⁺ й CD25⁺ Т-регулюючих лімфоцитів у периферичній крові дітей з пієлонефритом на фоні гідронефрозу може свідчити про розвиток аутоімунного запалення. Таким чином, процеси активації апоптозу при вираженому Т-клітинному дефіциті є важливим патогенетичним аспектом при пієлонефриті на тлі гідронефрозу в дітей середнього та старшого віку.

Таким чином, у зв'язку з етіологічною особливістю вторинного пієлонефриту на тлі вродженого гідронефрозу, у реалізації імунного захисту при даній патології важливу роль фактори вродженого імунітету, меншою мірою – механізми адаптивного імунітету, хоч, як і при більшості захворювань інфекційно-запального генезу, цей поділ часто досить умовний з огляду на тісну взаємодію і спільність їхніх механізмів. Прояв функцій вродженого імунітету при вторинному пієлонефриті на тлі вродженого гідронефрозу в дітей в активній стадії захворювання реалізується в ході запальної реакції, що є відповіддю на пошкодження мембран клітин при альтерації і проникненні чужорідних агентів, патогенних або умовно-патогенних бактерій.

Показники кількості нейтрофілів, які беруть участь у фагоцитарній реакції, фагоцитарне число й кількість антигенів у NETs розрізнялися

залежно від збудника, що викликали гострий пієлонефрит. Так, найбільша кількість активних нейтрофілів ($92,9 \pm 2,6\%$), ФЧ ($8,4 \pm 0,5$ ум.од.), кількість антигенів у NETs ($27,5 \pm 2,3$ ум.од.) відзначалася за впливу *Enterococcus faecalis*, дещо нижчими були показники за дії *Escherichia coli* – ФІ - $82,2 \pm 5,2\%$; ФЧ – $5,9 \pm 0,7$ ум.од.; антигенів у NETs - $18,0 \pm 1,7$ ум.од., за дії *Klebsiella pneumoniae* – ФІ - $70,4 \pm 9,3\%$; ФЧ - $4,5 \pm 1,2$ ум.од.; антигенів у NETs – $15,0 \pm 2,5$ ум.од., що свідчить про зміну активності фагоцитарної ланки імунного захисту в дітей з пієлонефритом. Зниження показника інтенсивності фагоцитозу й кількості спожитих антигенів *Klebsiella pneumoniae* в NETs обумовлено утворенням капсули. Таким чином, встановлено, що кількість активних нейтрофілів, інтенсивність фагоцитозу та здатність захоплювати антигени в NETs у дітей з гострою формою пієлонефриту залежить від етіологічного чинника. Основні показники функціональної активності нейтрофілів у дітей з хронічною формою пієлонефриту у фазі загострення характеризувалися такими змінами: за параметрами поглинальної здатності нейтрофілів встановлено зниження показника ФЧ у дітей усіх вікових категорій, провідними збудниками хронічного пієлонефриту були ентеробактерії. Активне формування NETs спостерігалось в дітей старшої вікової категорії.

Проведення досліджень з визначення модуляції апоптозу нейтрофілів при пієлонефритах у дітей різного віку продемонструвало, що кількість нейтрофілів на ранній стадії апоптозу в дітей вікової категорії 0-3 роки з гострою формою пієлонефриту становила в середньому $4,4 \pm 0,07\%$; від 4 до 7 років - $3,3 \pm 0,06\%$ і від 8 до 18 років - $3,5 \pm 0,07\%$. У дітей з хронічною формою пієлонефриту показники кількості нейтрофілів ранній стадії апоптозу значно підвищені: у дітей раннього віку - $29,3 \pm 0,4\%$, у дітей середнього віку - $24,1 \pm 0,6\%$ і у дітей старшого віку - $16,2 \pm 0,7\%$, що можна пояснити, з одного боку, поліетіологічністю хронічної форми пієлонефриту (найчастіше висівали асоціації мікроорганізмів, такі як: *Enterococcus faecalis* і *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae* і *Escherichia coli*; *Enterococcus faecalis*

і *Klebsiella pneumoniae*; *Proteus mirabilis* і *Klebsiella pneumoniae*), а з іншого боку – виникненням ускладнень.

Унаслідок оцінювання апоптозу лімфоцитів периферичної крові в дітей з пієлонефритом на фоні вродженого гідронефрозу було встановлено тенденцію до зниження AnnexinV⁺/7AAD⁻-лімфоцитів у дітей раннього віку незалежно від провідного збудника, тоді як AnnexinV⁺/7AAD⁺ та AnnexinV⁻/7AAD⁺-клітини були на рівні контрольних значень. Показник кількості живих клітин був недостовірно знижений у дітей з моно-інфекцією, що викликана *Escherichia coli*, й істотно знижений при змішаній інфекції, зумовленій *Escherichia coli* + *Enterococcus faecalis* та *Escherichia coli* + *Staphylococcus epidermidis*. У дітей середнього віку з вторинним пієлонефритом, зумовленим *Escherichia coli* + *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* + *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* + *Candida albicans*, *Escherichia coli* + *Proteus vulgaris* на фоні вродженого гідронефрозу, кількість AnnexinV⁻/7AAD⁻-клітин знижено в 1,4 раза, а при змішаній інфекції, зумовленій *Escherichia coli* + *Staphylococcus epidermidis* + *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* + *Pseudomonas aeruginosa* + *Candida albicans*, *Escherichia coli* + *Proteus mirabilis* + *Candida albicans*, – в 1,6 раза. Аналогічну картину спостерігаємо в дітей старшого віку: кількість AnnexinV⁻/7AAD⁻-лімфоцитів було достовірно знижено порівняно з контрольними значеннями та з відсотком живих клітин у дітей раннього та середнього віку з вторинним пієлонефритом. Показник LL у дітей старшого віку з вторинним пієлонефритом, зумовленим асоціацією мікроорганізмів *Escherichia coli* + *Klebsiella pneumoniae* + *Enterococcus faecalis* та *Escherichia coli* + *Candida albicans* + *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* + *Staphylococcus epidermidis* + *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* + *Klebsiella pneumoniae* + *Proteus mirabilis* + *Candida albicans*, знижується в 1,7 раза, *Klebsiella pneumoniae* + *Proteus mirabilis* + *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* + *Proteus mirabilis* + *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* + *Proteus mirabilis* + *Enterococcus faecalis* – в 1,6 раза. Відсоток апоптичних лімфоцитів UL у дітей середнього

віку з вторинним пієлонефритом був достовірно вищим за аналогічні показники контрольної групи та в дітей раннього віку, а саме: при вторинному пієлонефриті, зумовленому *Escherichia coli* + *Enterococcus faecalis* – у 6,9 рази, *Escherichia coli* + *Pseudomonas aeruginosa* та *Escherichia coli* + *Proteus mirabilis* + *Candida albicans*, – у 7,5 рази, *Escherichia coli* + *Candida albicans* – у 7,6 рази, *Escherichia coli* + *Proteus vulgaris* - у 7,1 рази, *Escherichia coli* + *Staphylococcus epidermidis* + *Klebsiella pneumoniae* – у 7,8 рази, *E.coli* + *Pseudomonas aeruginosa* + *Candida albicans* – у 7,7 рази. Кількість клітин UR у дітей даної групи збільшується: при пієлонефриті, зумовленому *Escherichia coli* + *Enterococcus faecalis*, – в 1,7 рази, *Escherichia coli* + *Pseudomonas aeruginosa* – в 1,6 рази, *Escherichia coli* + *Candida albicans* – в 1,9 рази, *Escherichia coli* + *Proteus vulgaris* – в 1,5 рази, *Escherichia coli* + *Staphylococcus epidermidis* + *Klebsiella pneumoniae* - у 2,5 рази, *Escherichia coli* + *Pseudomonas aeruginosa* + *Candida albicans* – у 2,4 рази, *E. coli* + *Proteus mirabilis* + *Candida albicans* – у 2,2 рази. Отже, найбільший відсоток апоптичних клітин спостерігався при міх-інфекціях, зумовлених *Escherichia coli* + *Staphylococcus epidermidis* + *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* + *Pseudomonas aeruginosa* + *Candida albicans* та *Escherichia coli* + *Proteus mirabilis* + *Candida albicans*. У дітей старшого віку кількість AnnexinV⁺/7AAD⁻-лімфоцитів була достовірно вищою за контрольні значення та показники в дітей раннього й середнього віку з вторинним пієлонефритом: кількість клітин UR у дітей старшого віку з вторинним пієлонефритом була підвищена при пієлонефриті, зумовленому асоціацією мікроорганізмів *Escherichia coli* + *Proteus mirabilis* + *Enterococcus faecalis* – у 2,1 рази, *Klebsiella pneumoniae* + *Proteus mirabilis* + *Enterococcus faecalis* – у 2,2 рази, *Escherichia coli* + *S. epidermidis*+ *Enterococcus faecalis* – у 2,3 рази, *Candida albicans* + *Proteus mirabilis* + *E.faecalis* та *Escherichia coli* + *Klebsiella pneumoniae* + *Enterococcus faecalis* – у 2,4 рази, *Escherichia coli* + *Candida albicans* + *Enterococcus faecalis* – у 2,6 рази, *Escherichia coli* + *Klebsiella pneumoniae* + *Proteus mirabilis* + *Candida albicans* - у 2,7 рази. Отже,

зростання кількості апоптичних клітин залежить від етіологічного чинника, асоціації збудників, вікової категорії хворої на пієлонефрит дитини та клінічної форми захворювання.

Дане дослідження демонструє підвищення рівня апоптотичних клітин на ранній стадії апоптозу в дітей усіх вікових категорій з хронічним пієлонефритом, що можна пояснити асоціаціями широкого кола збудників та наявністю ускладнень. Вивчення стадій апоптозу дає змогу повністю схарактеризувати динаміку апоптотичного процесу та доповнити патогенез пієлонефриту в дітей. Такі дослідження дають можливість впливати на модуляцію апоптозу, щоб регулювати або коригувати його, та сприяють пошуку інноваційних рішень у лікуванні, пов'язаних з впливом на імунну відповідь. Можна зробити висновок про підвищення апоптозу лейкоцитів периферичної крові при хронічній формі пієлонефриту, особливо в дітей раннього віку, завдяки поліетіології цієї форми пієлонефриту та розвитку ускладнень. При ускладненому перебігу, коли на тлі гнійного пієлонефриту розвивається уросепсис, летальність досягає 80%.

В останні роки ідея механізмів запрограмованої загибелі клітин різко змінилася, що дало змогу виділити фагоцитоз, некроз й апоптоз у самостійні форми, опосередковані розташуванням на клітинній мембрані кластерних молекул – сигналів смерті [59, 135]. Таким чином, особливе значення має виявлення феномену апоптозу клітин, унаслідок якого встановлено, що генетична програма в клітинах організму, що забезпечує їхній життєвий цикл, за певних фізіологічних чи патологічних умов запускає процес апоптозу [47]. Проте проблема запрограмованої клітинної смерті нейтрофілів у дітей з пієлонефритом залежно від віку й ускладнень залишається поза увагою. Безперечно, дослідження етапів апоптозу нейтрофілів та вивчені механізми індукції клітинної смерті допоможуть покращити уявлення про особливості патогенезу пієлонефриту в дітей. Отже, дослідження модуляції апоптозу нейтрофілів у дітей різних вікових категорій є перспективним

напрямом, який забезпечує елімінацію потенційно небезпечних клітин, пошкоджених організмом дитини.

У дослідженні апоптозу лейкоцитів було виявлено такі популяції клітин: ANX V⁻/7AAD⁻, ANX V⁺/7AAD⁻, ANX V⁺/7AAD⁺, ANX V⁻/7AAD⁺, які вважалися живими, ранніми апоптотичними, пізніми апоптотичними та некротичними відповідно. Вісь на точкових ділянках – це логарифм інтенсивності флуоресценції з мінімумом у точці «10⁰» та максимумом у точці «10⁴».

Унаслідок проведеного дослідження було виявлено, що кількість живих клітин при хронічній формі пієлонефриту в дітей різної вікової категорії достовірно знижена, особливо в дітей віком 0-3 роки, і становить $69,6 \pm 0,87\%$. Кількість лейкоцитів на ранній стадії апоптозу в дітей вікової категорії 0-3 роки з гострою формою пієлонефриту становила в середньому $4,4 \pm 0,08\%$; від 4 до 7 років - $3,3 \pm 0,06\%$ і від 8 до 18 років - $3,45 \pm 0,07\%$. Метод множинного порівняння вибірок показав, що $p < 0,001$ для гострого пієлонефриту та для хронічного пієлонефриту, що дало змогу відкинути H₀ про відсутність різниці між групами.

У дітей з хронічною формою пієлонефриту рівень лейкоцитів на ранній стадії апоптозу значно підвищений: у дітей раннього віку – $29,3 \pm 0,38\%$, у дітей середнього віку – $23,2 \pm 0,43\%$ і в дітей старшого віку – $17,2 \pm 0,51\%$, що можна пояснити насамперед поліетиологією хронічної форми пієлонефриту: найчастіше висівали такі асоціації мікроорганізмів, як: *Enterococcus faecalis* і *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae* і *Escherichia coli*; *Enterococcus faecalis* і *Klebsiella pneumoniae*; *Proteus mirabilis* і *Klebsiella pneumoniae*.

Водночас підвищену модуляцію апоптозу нейтрофілів при хронічній формі пієлонефриту можна пояснити виникненням ускладнень. Так, у дітей раннього віку найчастіше діагностували інфекцію сечовивідних шляхів (54,5%), дисметаболічну нефропатію (18,2%), дисплазію нирок (9,1%) і порушення пуринового обміну (9,1%); у дітей середнього віку – інфекцію

сечовивідних шляхів (66,6%), нейром'язову дисфункцію сечового міхура (16,7%), полікістоз нирок (16,7%); у дітей старшого віку, крім інфекції сечовивідних шляхів (37,7%), було виявлено дисметаболічну нефропатію (43%), дисплазію нирок (7,1%) і нейром'язову дисфункцію сечового міхура.

У дітей раннього віку ускладнення гострого пієлонефриту становили 15,4%, що в 6,5 раза менше, ніж при хронічному пієлонефриті. У дітей віком від 4 до 7 років ускладнення спостерігалися у 20% випадків, половина – пієлоектазія, половина – дисметаболічна нефропатія. У дітей старшого віку з гострим пієлонефритом у половині випадків були такі ускладнення, як дисметаболічна нефропатія.

Дослідження стадій апоптозу дає змогу більш повно схарактеризувати динаміку процесу апоптозу та повного патогенезу пієлонефриту в дітей. Вивчення різних стадій апоптозу дає можливість певним чином впливати на його модуляцію з метою регуляції або корекції. Визначення ролі апоптозу в порушенні лейкоцитів при пієлонефриті в дітей різних вікових категорій сприяє пошуку нових способів лікування, пов'язаних з впливом на імунну відповідь, ефективність таких препаратів може бути оцінена за допомогою визначення модуляції апоптозу.

Порівняння результатів цього дослідження з аналогічними показало, що в деяких випадках виявляється збільшення апоптозу моноцитів і лімфоцитів [99], тоді як в інших – посилення апоптозу лейкоцитів [104] та зменшення апоптозу В-лімфоцитів [111] або відсутність різниці в апоптозі [98]. Наше дослідження демонструє, що відсотки апоптозу лейкоцитів на ранній стадії є значно вищими в дітей молодшого віку з гострою формою пієлонефриту, ніж у дітей старшого віку та контрольної групи, але є меншими за аналогічні показники на стадії пізнього апоптозу. У дітей з хронічною формою пієлонефриту показники апоптозу нейтрофілів знижені як на ранній, так й на пізній стадіях.

Особливості індукції апоптозу в культурі лімфоцитів периферичної крові хворих з різними формами гострого пієлонефриту було вивчено

Ходиревою Л. А. із співавторами [59], які встановили, що гнійні ускладнення гострого пієлонефриту супроводжувалися достовірним підвищенням умісту апоптотичних клітин серед лімфоцитів периферичної крові. При культивуванні лімфоцитів було виявлено істотні відмінності в зростанні кількості апоптотичних клітин, що визначалися як умовами культивування, так і тяжкістю захворювання. При гнійних ускладненнях рівень їх був набагато вищим, ніж у здорових людей. У хворих з гострим пієлонефритом з неускладненим перебігом інфекційно-запального процесу рівень апоптозу лімфоцитів у культурах достовірно не відрізнявся від норми. У доступній літературі є велика кількість повідомлень щодо визначення апоптозу імунних клітин при різних гнійно-запальних процесах. Так, Meier P., Dayer E., Blanc E., Wauters J. P. [112] виявили активацію апоптозу в культурі лімфоцитів периферичної крові хворих з хронічною нирковою недостатністю. Roger P. з колегами надали результати про зміну чутливості до апоптозу лімфоцитів, які виявляються при культивуванні, при септичному шоці внаслідок гострого пієлонефриту [124]. У роботах, присвячених вивченню апоптозу в клінічній практиці, як правило, враховується тільки стадія раннього апоптозу, оскільки лише на цій стадії можна відрізнити апоптотичні клітини від некротичних, використовуючи проточну цитометрію. Отже, відомо, що поширеною причиною рубцювання ниркової кори та гіпопластичних нирок у дітей є пієлонефрит. Фахівці зі Стокгольму вивчили зміни, що відбуваються в нирках унаслідок пієлонефриту, на щурах в експерименті та з'ясували, що через чотири доби після зараження спостерігалось тимчасове збільшення апоптотичних клітин у клітинах кори поза межами запальних ділянок, тоді як через 10 діб після зараження збільшення апоптотичних клітин у корі не було. У контрольних нирках було виявлено лише кілька апоптотичних клітин. Ці дані вказують на те, що пригнічення проліферації клітин та посилення апоптозу може сприяти втраті ниркової паренхіми після пієлонефриту в дітей [126]. Процеси модуляції апоптозу імунних клітин при пієлонефритах у дітей залежать від багатьох

причин, у тому числі від дії етіологічних чинників.

В окремих роботах з визначення причин виникнення пієлонефритів, зокрема в дослідженні фахівців з Кореї [107, 135], зазначено, що, хоч безсимптомну бактеріурію, цистит і гострий пієлонефрит віднесено до категорії інфекцій сечовивідних шляхів, імунопатогенез кожної хвороби різний. При гострому пієлонефриті відіграє провідну роль вікова схильність та стать: більшість дітей (понад 70-80%) з гострим пієлонефритом мають вік до 2 років з переважанням хлопчиків. Після 2 років зафіксовано переважання дівчаток. Цей висновок говорить про те, що незрілий імунний стан немовляти може бути пов'язаний з патогенезом гострого пієлонефриту. Дослідники з'ясували, що основним етіологічним чинником гострого пієлонефриту є кишкова паличка, яка разом з іншими уропатогенами походить від нормальної мікрофлори господаря, що постійно змінюється чинниками навколишнього середовища. Тому уропатогени можуть мати характеристики, відмінні від характеристик сторонніх бактеріальних збудників. Хоч стійкі до антибіотиків уропатогени, включаючи штами, що продукують β -лактамази, розширеного спектра дії, зростають у всьому світі, недостатність лікування є рідкісною в імунокомпетентних дітей [93].

Загальновідомо [107], що нирка немовляти більш уразлива до інфекцій, ніж нирка дорослої людини, і що гострий пієлонефрит у грудному та ранньому дитинстві спричиняє затримку росту нирок, що призводить до хронічної ниркової недостатності. Щоб зрозуміти механізм, що лежить в основі ураження кірки, учені з Кореї експериментально відтворили інфекцію сечових шляхів та після проведення гістопатологічного дослідження із залученням показників запалення, фіброзу й атрофії канальців, визначили індекс апоптозу в клітинах канальців кортикальної ділянки та встановили, що апоптотичний індекс канальцевих клітин був значно підвищеним у незапальних ділянках кори протягом першого тижня, але знизився на третьому тижні. Експресію білка фактора росту було локалізовано в зоні запалення та не спостерігалось в канальцях незапальної ділянки, що свідчить

про зв'язок затримки росту нирок в експериментальних немовлят щурів не тільки із самою запальною реакцією, але й з посиленням апоптозу трубчастих клітин у незапальній області. Водночас дослідники з Кореї виявили, що застосована протимікробна терапія ні усуває запалення, ні ефективно запобігає затримці росту [135].

Подібну закономірність з боку апоптичного процесу було виявлено в дослідженнях Joza N. та ін. [99], де фахівці показали збільшення показників апоптозу моноцитів і лімфоцитів при запальних захворюваннях. Водночас інші дослідження наголошують на збільшенні показників апоптозу лейкоцитів [104] та зниженні апоптозу В-лімфоцитів [111] або відсутності різниці в показниках апоптозу [98]. Таким чином, дані про зміну чутливості до апоптозу лімфоцитів при різних формах пієлонефриту підтверджуються багатьма дослідниками.

Дане дослідження дає змогу з'ясувати зміни, які відбуваються на рівні апоптотичної загибелі лейкоцитів, у тому числі й нейтрофілів, шляхом застосування методу флуоресцентного маркування лімфоцитів з подальшим роздільним аналізом їх на проточному цитофлуориметрі для оцінювання параметрів стадій апоптозу лейкоцитів, зокрема раннього та пізнього апоптозу лейкоцитів периферичної крові, при пієлонефритах у дітей різного віку залежно від провідних збудників захворювання. Як наслідок, було встановлено виражену готовність до раннього апоптозу лейкоцитів крові дітей, хворих на хронічний пієлонефрит, та збільшення апоптичних клітин на пізній стадії апоптозу, яке спостерігалось в дітей з пієлонефритами від народження до семи років. Отримані дані свідчать про те, що стимуляція апоптозу лейкоцитів на різних стадіях залежить від віку дитини, форми перебігу пієлонефриту та виду інфекційного процесу.

Таким чином, значення одержаних результатів полягає в науковому обґрунтуванні механізмів розвитку та прогресування пієлонефритів у дітей. На основі визначення здатності до формування біоплівки збудників пієлонефритів у дітей, провідних показників неспецифічної резистентності

організму та механізмів утворення нейтрофільних позаклітинних пасток можливо мікробіологічне й імунологічне обґрунтування нових підходів до комплексної терапії пієлонефритів у дітей і вдосконалення способів застосування антимікробних препаратів з урахуванням віку дитини залежно від клінічної форми захворювання.

ВИСНОВКИ

У роботі представлено теоретичне узагальнення й обґрунтовано науково-практичне вирішення актуального завдання – установлення особливостей процесу утворення біоплівок провідними збудниками пієлонефритів залежно від змін факторів неспецифічної резистентності в дітей різного віку. На підставі визначення мікробіологічних, імунологічних та цитологічних особливостей з'ясовано провідні показники вродженого й адаптивного імунітету в дітей з первинними й вторинними пієлонефритами залежно від віку дитини та збудника захворювання.

1. Виявлено, що найчастіше первинні пієлонефрити викликали *Escherichia coli* та *Enterococcus faecalis* як у моноінфекції, так і в змішаній, залежно від вікової категорії, а у дітей із вторинним пієлонефритом на фоні вродженого гідронефрозу раннього віку виявлялася моноінфекція, зумовлена переважно грампозитивною флорою, а в дітей середнього та старшого віку збудниками захворювання були переважно представники родини *Enterobacteriaceae* у вигляді мікст-інфекції.
2. Доповнено наукові дані щодо стадій формування біоплівок мікроорганізмами, збудниками пієлонефритів у дітей, а саме: до класичних 5 стадій (адгезія, фіксація, коагрегація, кластеризація, дисперсія) додано 6-й етап – дисемінація планктонних клітин, що утворилися всередині первинної біоплівки і внаслідок дисперсії (розділення біоплівки на фрагменти з утворенням отворів); 7-й етап – реадсорбція планктонних клітин на субстратах (відбувається у 2-3 рази швидше, ніж у стадії фіксації); 8-й етап – реагрегація, що включає формування моношару з одночасним угрупованням бактеріальних клітин та формуванням біоматриксу; 9-й етап – сегментація бактеріальної вторинної біоплівки.

3. Адгезія ізолятів при пієлонефритах у дітей з уродженим гідронефрозом відбувається швидше при формуванні вторинної біоплівки ізолятами пієлонефритів у дітей старшої вікової категорії, ніж при формуванні первинної біоплівки, що обумовлює можливість виникнення хронізації процесу та розвитку рецидивів.
4. У дітей молодшого віку формування зрілої біоплівки ізолятів відбувається повільніше, на відміну від дітей середнього та старшого віку, щільність біоплівки є нижчою за щільність добових біоплівок у дітей середнього та старшого віку. Показники оптичної щільності біоплівок ізолятів у дітей, хворих на хронічний пієлонефрит, вірогідно вищі, ніж у дітей, хворих на гострий пієлонефрит.
5. Похідні нітрофуранів у терапевтичній дозі ефективно діють на планктонні форми мікроорганізмів за впливу на первинні біоплівки як при гострих, так і при хронічних пієлонефритах у дітей, що запобігає утворенню вторинних біоплівок за рахунок утворення «отворів», крізь які в біоплівку проникають антибактеріальні препарати та ефективно призначати з метою профілактики розвитку пієлонефритів і як протирецидивну терапію хронічних пієлонефритів у дітей різного віку.
6. Установлено порушення імунного статусу з пригніченням субпопуляції лімфоцитів CD3⁺ CD4⁺, CD8⁺, CD25⁺; підвищенням субпопуляції клітин – активаторів апоптозу CD95⁺ у дітей середньої і старшої вікової категорії з одночасним підвищенням рівнів прозапальних цитокінів, причому рівень їх залежав від етіологічного фактору і віку дитини.
7. Установлено, що в дітей старшого віку, хворих на хронічний пієлонефрит, при збільшенні щільності біоплівок достовірно підвищується показник умісту антигенів у NETs, тобто здатність нейтрофілів у момент загибелі до захоплення більшої кількості збудників хронічного пієлонефриту. Інтенсивність фагоцитозу й здатність до формування NETs із найбільшим умістом антигенів

виявлено в дітей з хронічним пієлонефритом, зумовленим *Enterococcus faecalis*, та в дітей старшої групи з вторинним пієлонефритом в активній стадії захворювання.

8. Спостерігається посилення клітинної загибелі лімфоцитів у дітей з пієлонефритами незалежно від віку, клінічної форми захворювання та етіологічного чинника на фоні підвищення концентрації прозапальних цитокінів, ЦК та NETs з одночасним зниженням загальної кількості лімфоцитів.
9. Установлено, що *Enterococcus faecalis* та *Escherichia coli* індукували швидкий апоптоз нейтрофілів, рівень якого був значно більшим, ніж такий, що викликаний іншими збудниками. Доведено, що втрата лімфоцитів через апоптоз є компонентом фізіологічних змін неспецифічного імунітету, який має місце при пієлонефритах у дітей середнього та старшого віку, особливо на фоні вродженого гідронефрозу.

ПРАКТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ

Практичне значення одержаних результатів полягає в науковому обґрунтуванні механізмів розвитку та прогресування пієлонефритів у дітей. На основі визначення здатності до формування біоплівки збудників пієлонефритів у дітей та механізмів утворення нейтрофільних позаклітинних пасток можливо мікробіологічне обґрунтування нових підходів до комплексної терапії пієлонефритів у дітей і вдосконалення способів застосування антимікробних препаратів з урахуванням дослідження комунікативних властивостей мікроорганізмів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Аляев Ю, Газимиев М, Еникеев Д. Современные аспекты диагностики острого пиелонефрита. *Врач*. 2009;6:76-8.
2. Архипова ЕН, Черепов АБ, Медведева ЮС. Участие системы комплемента в реализации цитотоксичности биологических жидкостей в норме и патологии. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2012;153(5):611-4.
3. Балалаева ИЮ, Булавина АС, Коноплина ВВ, Масневская ТА, Платова НП. Исходы пиелонефрита, начавшегося у детей раннего возраста. Лекции и тезисы докладов второго съезда педиатров-нефрологов. Москва; 2000, с. 122.
4. Білько ІП. Вимоги до взяття та доставки матеріалу для мікробіологічних досліджень. *Сучасні інфекції*. 2001;(3):106-9.
5. Брилис В. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов. *Лабораторное дело*. 1986;(4): 210-2.
6. Вакуленко ЛІ, Кондратьєв ВО, Різник ТК. Вікова етіологічна структура піелонефриту у дітей і раціональна антибактеріальна терапія. *Современная педиатрия*. 2012;4(32):193-6.
7. Вознесенский НА. Биопленки – терапевтическая мишень при хронических инфекциях. *Пульмонология и аллергология*. 2008;(3):56-64.
8. Возрастные особенности иммунитета у детей. Лекция для врачей. Москва; 2008. 36 с.
9. Волосовець АП, Кривоустов СП. Антимікробна терапія інфекцій сечової системи у дітей. *Педіатрія, акушерство та гінекологія*. 2004;1:5-12.

10. Галеева АВ. Клинико-лабораторные особенности пиелонефрита у детей раннего возраста в зависимости от антенатального анамнеза [диссертация]. Казань; 2007. 138 с.
11. Галкін МБ, Іваниця ВО, Галкін БМ, Філіпова ТО. Матрикс біоплівки – хімічний склад, структура, властивості. Мікробіологія і біотехнологія. 2016;(4):6-27.
12. Глушен СВ., Романовская ТВ., Гринев ВВ. Комплексный подход при оценке программируемой гибели (апоптоза) клеток человека: метод. пособие к лабораторным занятиям по специальному курсу «Патология клетки». Минск: БГУ. 2009; 43 с.
13. Гостев ВВ, Сидоренко СВ. Бактериальные биопленки и инфекции. Журнал инфектологии. 2010;2(3):4-15. Доступно на: <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2010-2-3-4-15>.
14. Грузина ВД. Коммуникативные сигналы бактерий. Антибиотики и химиотерапия. 2003;48(10):32-9.
15. Данилова ИЕ. Клинико-микробиологическое обоснование антибактериальной терапии инфекции мочевой системы у детей [диссертация]. Москва; 2002. 25 с.
16. Добрик ОО, Секунда МО, Деркач ІМ. Сучасні підходи до лікування інфекції сечових шляхів у дітей з урахуванням утворення бактеріальних біоплівок. Здоровье ребенка. 2017;12(4):27-37.
17. Долгушин ИИ, Андреева ЮС, Савочкина АЮ. Нейтрофильные внеклеточные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов. Монография. Издательство: РАМН; 2009. 208 с.
18. Дранник ГН, Петербургский ВФ, Дриянская ВЭ. Исследование про- и противовоспалительных цитокинов у детей с уропатиями верхних мочевых путей. Проблемы здоровья и экологии. 2014;3(41):82-7.
19. Ермишина ВИ. Оценка клинико-биохимических и иммунологических показателей в диагностике и лечении осложненного хронического пиелонефрита [диссертация]. Тюмень; 2014. 143 с.

20. Ермоленко ВМ. Инфекция мочевых путей и её лечение в возрастном аспекте. Лечащий врач. 2012;(8):8-11.
21. Зигангирова НА, Гинцбург АЛ. Роль апоптоза в регуляции инфекционного процесса. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2004; 6:106–113. [130]
22. Ильина ТС, Романова ЮМ, Гинцбург АЛ. Биопленки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития. Генетика. 2004;40(11):1-12.
23. Іваниця ВО, Галкін МБ. Сучасні уявлення щодо механізмів формування біоплівки. Мікробіологія і біотехнологія. 2011;(2):8-22.
24. Карсанов АМ, Маскин СС, Слепушкин ВД. Клинико-эпидемиологическое значение системного воспаления и сепсиса. Вестник хирургии. 2015;174(4):99-103.
25. Кириллов ВИ, Зайцева ОВ, Богданова НА. Эффективность иммунокоррекции с помощью синтетического дипептида при пиелонефрите у детей. Вопросы современной педиатрии. 2013;12(1):24-9.
26. Колесник МО, Степанова НМ. Етіологічний спектр інфекцій сечової системи. Український журнал нефрології та діалізу. 2007;3(15):16-29.
27. Корнева ЭГ. Применение полистироловых пластин при определении чувствительности бактерий к антибиотикам. Лабораторное дело. 1987;(9):709-10.
28. Кременчуцький ГМ, Степанський ДО, Юргель ЛГ. Інформаційні Комунікації мікроорганізмів. Вісник Дніпропетровського університу. 2010;1(10):66-70.
29. Кузьменко ВВ, Тураев АМ, Бугримов ДЮ. Иммуный статус – как диагностическо-прогностический критерий эффективности терапии больных острым пиелонефритом в условиях стационара. Вестник новых медицинских технологий. Электронный журнал. 2013;(1):67-72.

30. Лабис ВВ, Базикян ЭА, Козлов ИГ. Роль иммунной системы в патогенезе репаративных процессов. Российский стоматологический журнал. 2014;(4):21-4.
31. Лапач СН, Чубенко АВ, Бабич ПН. Статистические методы в медико – биологических исследованиях с использованием Excel. Киев: МОРИОН; 2000. 320 с.
32. Леонова ЛВ. Патологическая анатомия врожденных обструктивных уропатий у детей [диссертация]. Москва; 2009. 55 с.
33. Лефковитс И, Пернис П. Иммунологические методы исследований. Швейцария: Базельский институт иммунологии; 1988. 527 с.
34. Литвинов В, Черепахина Н, Санаев А. Хронический пиелонефрит: особенности иммунопатогенеза и принципы клинической иммуногенодиагностики. Врач. 2008;(1):12-7.
35. Лолаева БМ, Джелиев ИШ. Цитокиновый профиль у детей раннего возраста при мегауретере, осложненном пиелонефритом. Кубанский научный медицинский вестник. 2014;2(144):80-2.
36. Майданик ВГ. Ефективність антибактеріальної терапії пієлонефриту у дітей за результатами систематичних оглядів та мета-аналізу. Педіатрія, акушерство та гінекологія. 2007;1:5-13.
37. Макарова ТП, Булатова АВ, Маянский АН. Динамика продукции иммуноглобулинов и секреторного IgA при хроническом пиелонефрите у детей. Практическая медицина. 2009;8(40):53.
38. Мальцев СВ, Мансурова ГШ. Показатели аутоиммунитета как биомаркеры риска развития и хронизации пиелонефрита. Практическая медицина. 2009;39(7):99-104.
39. Методические указания по применению унифицированных микробиологических (бактериологических) методов исследования в клинико-диагностических лабораториях. Приложение I к Приказу Министерства здравоохранения № 535. Москва; 1985. 123 с.

- 40.Музыченко ЗН. Осложненные инфекции мочевыводящих путей у детей. Педиатрический журнал. 2010;(1):28-32.
- 41.Назарчук ОА, Палій ВГ, Гончар ОО, Олійник ДП, Назарчук ГГ, Палій ІГ. Мікробіологічна оцінка ефективності сучасних антисептиків, антимікробних матеріалів. Клінічна фармація. 2014;18(4):8-11.
- 42.Наказ МОЗ України № 167 від 05.04.2007 «Про затвердження методичних вказівок "Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів". Київ; 2007. 56 с.
- 43.Недашківська ВВ, Дронова МЛ, Вринчану НО. Біоплівки та їх роль в інфекційних захворюваннях. Український науково-медичний молодіжний журнал. 2016;4(98):10-9.
- 44.Нестерова ИВ. Нейтрофильные гранулоциты: взгляд в будущее. Аллергология и иммунология. 2014;15(4):269-74.
- 45.Никуличева ВИ, Сафуанова ГШ, Карпина НС. Иммуновоспалительные маркеры хронического пиелонефрита. Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2014;95(1):45-9.
- 46.Осипов ВП, Лукьянова ЕМ, Антипкин ЮГ. Методика статистической обработки медицинской информации в научных исследованиях. Киев: планета людей; 2002. 200 с.
- 47.Остапченко ЛЛ, Синельник ТБ, Рибальченко ТВ, Рибальченко ВК. Біохімічні механізми апоптозу: навч. посібник. Київ: ВПЦ «Київський університет»; 2010. 312 с.
- 48.Пекарева НА. Патогенетическое значение изучения динамики цитокинов при хроническом обструктивном пиелонефрите у детей. Педиатрия. 2008;87(3):23-7.
- 49.Покас ОВ. Формування біоплівок клінічними штамми умовно-патогенних мікроорганізмів, виділених з різного біологічного матеріалу. Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П. Л. Шупика. Київ; 2013. Вип. 22(2). С. 342-348

- 50.Реброва ОЮ. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. Москва: «МедиаСфера»; 2000. 312 с.
- 51.Свіжак ВК, Дейнека СЄ. Антибіотикорезистентність: багатогранність проблеми. Клінічна та експериментальна патологія. 2014;XIII(2(48)):222-4.
52. Сидашенко ОИ, Воронкова ОС, Сирокваша ЕА, Винников АИ. Влияние цефтриаксона и тетрациклина на формирование биопленки штаммами *Staphylococcus epidermidis*. Вісник Дніпровського університету. Серія: Біологія. Медицина. 2014;5(1):7-11. Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/vdubm_2014_5%281%29_4.
- 53.Сідашенко ОІ, Воронкова ОС, Сірокваша ОА, Вінніков АІ. Біоплівка як особлива форма організації бактерій та її роль в інфекційних процесах. Вісник проблем біології і медицини. 2013;3(2):36-41.
- 54.Страчунский ЛС, Коровина НА. Практические рекомендации по антибактериальной терапии инфекций мочевой системы внебольничного происхождения у детей. Пособие для врачей. Москва; 2002. 22 с.
- 55.Тарадий НН., Багдасарова ІВ., Мандзюк ЯП., Багдасарова РВ., Терещенко ВС., Распопа ЯМ. Маркери апоптоза при хронічному пієлонефриті у дітей. Державна установа «Інститут нефрології НАМНУ», Україна Дитяча клінічна лікарня №7, Київ, Україна Современная педиатрия. 2013; 1(49):150-6.
- 56.Тец ВВ, Артеменко НК, Заславская НВ, Тец ГВ. Биопленки возбудителей уроинфекций и использование фторхинолонов. Рациональная фармакотерапия в урологии. 2008;10(4):110-4.
- 57.Туш ЕВ, Шиленок ИГ, Нестеров СЛ. Некоторые аспекты диагностики и лечения воспалительных заболеваний мочевых путей у детей. Педиатрия. 2005;6:115-8.

58. Хаитов РВ, Пинегин БВ, Ярилин АА. Руководство по клинической иммунологии. Диагностика заболеваний иммунной системы: руководство для врачей. Москва: Гэотар-Медиа; 2009. 352 с.
59. Ходырева ЛА, Синюхин ВН, Харламова ЛА. Особенности индукции апоптоза в культуре лимфоцитов периферической крови больных с различными формами острого пиелонефрита. Экспериментальная и клиническая урология. 2010;(2):147-62.
60. Цветикова ЛН, Атякшин ДА, Лобеева НВ. Роль факторов некроза опухоли- α в развитии оксидативного стресса и воспаления. Научно-медицинский вестник Центрального Черноземья. 2015;(61):20-4.
61. Циганенко АЯ, Мішина ММ, Курбанов РА, винахідники; ХНМУ, патентовласник. Спосіб відтворення біоплівки мікроорганізмів *in vitro*. Патент України на корисну модель № 47944. 2010 лют. 25.
62. Цыгин АН. Инфекция мочевыводящих путей у детей. Педиатрическая фармакология. 2010;7(6):39-43.
63. Ширококов ВП, Майданник ВГ, Мітюряєва ІО. Сучасні уявлення про значення біоплівки у розвитку інфекцій сечових шляхів у дітей. Міжнародний журнал педіатрії, акушерства та гінекології. 2016;9(2):13-18.
64. Шкаруба АЮ, Воронкова ОС, Вінніков АІ. Антибіотикочутливість та здатність до утворення біоплівки у стафілококів, виділених з різних біотопів. Вісник проблем біології і медицини. 2015;3(1(122)):287-290.
65. Эрман МВ. Нефрология детского возраста: руководство для врачей. СПб: Спец. МТ; 2010. 683 с.
66. Ярилин АА. Иммунология. Москва: «ГЭОТАР-Медиа»; 2010. 749 с.
67. Ярошевская ТВ, Коренюк ЕС, Минакова ВА. Современные особенности этиологической структуры пиелонефрита у детей. Здоровье ребенка. 2016;7(75):80-84.
68. Ameisen JC. On the origin, evolution and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. Cell Death Differ. 2002;9: 367–393.

69. Ashida H, Mimuro H, Ogawa M, Kobayashi T, Sanada T, Kim M, Sasakawa Ch. Cell death and infection: a double-edged sword for host and pathogen survival. *J. Cell Biol.* 2011; 195(6): 931–942.
70. Bartoli F, Gesualdo L, Paradies G, Caldarulo E, Infante B, Grandaliano G, et al. Renal expression of monocyte chemotactic protein-1 and epidermal growth factor in children with obstructive hydronephrosis. *J Pediatr Surg.* 2000 Apr;35(4):569-72. DOI: 10.1053/jpsu.2000.0350569.
71. Baumann S, Krueger A., Kirchhoff S, Krammer PH. Regulation of T cell apoptosis during the immune response. *Curr. Mol. Med.* 2002; 2: 257–272.
72. Bidet P, Bonarcorsi S, Bingen E. Facteurs de pathogénicité et physiopathologie des *Escherichia coli* extra-intestinaux [Virulence factors and pathophysiology of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*]. *Arch Pediatr.* 2012 Nov;19 Suppl 3:S80-92. French. DOI: 10.1016/S0929-693X(12)71279-4.
73. Bjarnsholt T, Tolker-Nielsen T, Høiby N, Givskov M. Interference of *Pseudomonas aeruginosa* signalling and biofilm formation for infection control. *Expert Rev Mol Med.* 2010 Apr 7;12:e11. DOI: 10.1017/S1462399410001420.
74. Bloomfield P, Hodson EM, Craig JC. Antibiotics for acute pyelonephritis in children. *Cochrane Database Syst Rev.* 2003;(3):CD003772. DOI: 10.1002/14651858.CD003772.
75. Cepas V, López Y, Muñoz E, Rolo D, Ardanuy C, Martí S, et al. Relationship Between Biofilm Formation and Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Microb Drug Resist.* 2019 Jan/Feb;25(1):72-79. DOI: 10.1089/mdr.2018.0027.
76. Cheng CH, Tsau YK, Kuo CY, Su LH, Lin TY. Comparison of extended virulence genotypes for bacteria isolated from pediatric patients with urosepsis, acute pyelonephritis, and acute lobar nephronia. *Pediatr Infect Dis J.* 2010 Aug;29(8):736-40. DOI: 10.1097/INF.0b013e3181dab249.

77. Cho SH, Naber K, Hacker J, Ziebuhr W. Detection of the *icaADBC* gene cluster and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* isolates from catheter-related urinary tract infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2002 Jun;19(6):570-5. DOI: 10.1016/s0924-8579(02)00101-2.
78. Choong S, Whitfield H. Biofilms and their role in infections in urology. *BJU Int*. 2000 Nov;86(8):935-41. DOI: 10.1046/j.1464-410x.2000.00949.x.
79. Costerton J. W. *The Biofilm. Primer*. Berlin: Springer; 2007. Vol.1. 200 p.
80. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol*. 1987;41:435-64. DOI: 10.1146/annurev.mi.41.100187.002251.
81. Craig JC, Hodson EM. Treatment of acute pyelonephritis in children. *BMJ*. 2004 Jan 24;328(7433):179-80. DOI: 10.1136/bmj.328.7433.179.
82. Das T, Sharma PK, Busscher HJ, van der Mei HC, Krom BP. Role of extracellular DNA in initial bacterial adhesion and surface aggregation. *Appl Environ Microbiol*. 2010 May;76(10):3405-8. DOI: 10.1128/AEM.03119-09.
83. Del Pozo JL. Biofilm-related disease. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2018 Jan;16(1):51-65. doi: 10.1080/14787210.2018.1417036.
84. Desai J, Kumar SV, Mulay SR, Konrad L, Romoli S, Schauer C, et al. PMA and crystal-induced neutrophil extracellular trap formation involves RIPK1-RIPK3-MLKL signaling. *Eur J Immunol*. 2016 Jan;46(1):223-9. DOI: 10.1002/eji.201545605.
85. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002 Apr;15(2):167-93. DOI: 10.1128/cmr.15.2.167-193.2002.
86. Fanning S, Mitchell AP. Fungal biofilms. *PLoS Pathog*. 2012;8(4):e1002585. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002585.
87. Fuchs T.A., Abed U., Goosmann C., Hurwitz R., Schulze I., Wahn V., Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol*. 2007; 176(2): 231–241.

88. Garcia MC, Lee JT, Ramsook CB, Alsteens D, Dufrêne YF, Lipke PN. A role for amyloid in cell aggregation and biofilm formation. *PLoS One*. 2011 Mar 8;6(3):e17632. DOI: 10.1371/journal.pone.0017632.
89. Grabe M, Bishop MC, Bjerklund-Johansen TE et al. Guidelines on Urological Infections. *Eur Urol*. 2012;61:110-18.
90. Grassme H, Jendrossek V, Gulbins E. Molecular mechanisms of bacteria induced apoptosis. *Apoptosis*. 2001; 6: 441–445.
91. Günther F, Scherrer M, Kaiser SJ, DeRosa A, Mutters NT. Comparative testing of disinfectant efficacy on planktonic bacteria and bacterial biofilms using a new assay based on kinetic analysis of metabolic activity. *J Appl Microbiol*. 2017 Mar;122(3):625-633. DOI: 10.1111/jam.13358.
92. Hacker G., Kirschnek S., Fischer S.F. Apoptosis in infectious diseases: how bacteria interfere with the apoptotic apparatus. *Med. Microbiol. Immunol*. 2006; 195: 11–19.
93. Han JW, Lee KY, Hwang JY, Koh DK, Lee JS. Antibody status in children with steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Yonsei Med J*. 2010 Mar;51(2):239-43. DOI: 10.3349/ymj.2010.51.2.239.
94. Hilbert DW, Paulish-Miller TE, Tan CK, Carey AJ, Ulett GC, Mordechai E, et al. Clinical *Escherichia coli* isolates utilize alpha-hemolysin to inhibit in vitro epithelial cytokine production. *Microbes Infect*. 2012 Jul;14(7-8):628-38. DOI: 10.1016/j.micinf.2012.01.010.
95. Hogley L, Harkins C, MacPhee CE, Stanley-Wall NR. Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. *FEMS Microbiol Rev*. 2015 Sep;39(5):649-69. DOI: 10.1093/femsre/fuv015.
96. Hogley L, Wood J., Bin L., Kim L., Sok H. Spermidine promotes *Bacillus subtilis* biofilm formation by activating expression of the matrix regulator slrR *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 2017; 292(29), 12041-12053.

97. Holling N, Dedi C, Jones CE, Hawthorne JA, Hanlon GW, Salvage JP, et al. Evaluation of environmental scanning electron microscopy for analysis of *Proteus mirabilis* crystalline biofilms in situ on urinary catheters. *FEMS Microbiol Lett.* 2014 Jun;355(1):20-7. DOI: 10.1111/1574-6968.12451.
98. Holmström TH, Eriksson JE. Phosphorylation-Based signaling in Fas receptor-mediated apoptosis. *Crit Rev Immunol.* 2000;20(2):121-52.
99. Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature.* 2001 Mar 29;410(6828):549-54. DOI: 10.1038/35069004.
100. Kennedy AD, DeLeo FR. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunol. Res.* 2009; 43(1–3): 25–61.
101. Keren R, Chan E. A meta-analysis of randomized, controlled trials comparing short- and long-course antibiotic therapy for urinary tract infections in children. *Pediatrics.* 2002 May;109(5):70-0. DOI: 10.1542/peds.109.5.e70.
102. Kobayashi SD., Braughton KR., Whitney AR., Voyich JM., Schwan TG., Musser JM., DeLeo FR. Bacterial pathogens modulate an apoptosis differentiation program in human neutrophils. *PNAS.* 2003; 100(19): 10948–10953.
103. Kostakioti M, Hadjifrangiskou M, Hultgren SJ. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013 Apr 1;3(4):a010306. DOI: 10.1101/cshperspect.a010306.
104. Kumagai N, Inoue CN, Kondo Y, Iinuma K. Mitogenic action of lysophosphatidic acid in proximal tubular epithelial cells obtained from voided human urine. *Clin Sci (Lond).* 2000 Dec;99(6):561-7.
105. Kurihara S, Miyazaki Y, Kohno S. [Acute bacterial pyelonephritis: Pathogenesis, pathophysiology, and therapy]. *Nihon Rinsho.* 2006 Feb;64 Suppl 2:572-5.

106. Lassek C, Burghartz M, Chaves-Moreno D, Otto A, Hentschker C, Fuchs S, et al. A metaproteomics approach to elucidate host and pathogen protein expression during catheter-associated urinary tract infections (CAUTIs). *Mol Cell Proteomics*. 2015 Apr;14(4):989-1008. DOI: 10.1074/mcp.M114.043463.
107. Lee KY. New Insights for Febrile Urinary Tract Infection (Acute Pyelonephritis) in Children. *Child Kidney Dis*. 2016;20(2):37-44.
108. Liu W, Røder HL, Madsen JS, Bjarnsholt T, Sørensen SJ, Burmølle M. Interspecific Bacterial Interactions are Reflected in Multispecies Biofilm Spatial Organization. *Front Microbiol*. 2016 Aug 31;7:1366. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01366.
109. Liu W, Røder HL, Madsen JS, Bjarnsholt T, Sørensen SJ, Burmølle M. Interspecific Bacterial Interactions are Reflected in Multispecies Biofilm Spatial Organization. *Front Microbiol*. 2016 Aug 31;7:1366. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01366.
110. Mak RH, Kuo HJ. Pathogenesis of urinary tract infection: an update. *Curr Opin Pediatr*. 2006 Apr;18(2):148-52. DOI: 10.1097/01.mop.0000193276.39495.0d.
111. Mattsby-Baltzer I, Hanson LA, Kaijser B, Larsson P, Olling S, Svanborg-Edén C. Experimental *Escherichia coli* ascending pyelonephritis in rats: changes in bacterial properties and the immune response to surface antigens. *Infect Immun*. 1982 Feb;35(2):639-46. doi: 10.1128/IAI.35.2.639-646.1982.
112. Meier P, Dayer E, Blanc E, Wauters JP. Early T cell activation correlates with expression of apoptosis markers in patients with end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2002 Jan;13(1):204-12.
113. Mohamed JA, Huang DB. Biofilm formation by enterococci. *J Med Microbiol*. 2007 Dec;56(Pt 12):1581-1588. DOI: 10.1099/jmm.0.47331-0.
114. Moons P, Michiels CW, Aertsen A. Bacterial interactions in biofilms. *Crit Rev Microbiol*. 2009;35(3):157-68. DOI: 10.1080/10408410902809431.

115. Muadcheingka T, Tantivitayakul P. Distribution of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species in oral candidiasis patients: Correlation between cell surface hydrophobicity and biofilm forming activities. *Arch Oral Biol.* 2015 Jun;60(6):894-901. doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.03.002.
116. Nan G.J., Richmond J.E., Schlesinger A., Jennings E.G., Lander E.S., Young R.A Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, vol. 99, pp. 1503–1508.
117. Odds FC. Secreted proteinases and *Candida albicans* virulence. *Microbiology (Reading)*. 2008 Nov;154(Pt 11):3245-3246. DOI: 10.1099/mic.0.2008/023671-0.
118. Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res.* 2002 Apr;66(2):86-92.
119. Olson PD, Hunstad DA. Subversion of Host Innate Immunity by Uropathogenic *Escherichia coli*. *Pathogens*. 2016 Jan 4;5(1):2. DOI: 10.3390/pathogens5010002.
120. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol.* 2000;54:49-79. DOI: 10.1146/annurev.micro.54.1.49.
121. Pace JL. *Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy*. Boca Raton: Taylor & Francis Group;2006. 495 p.
122. Park SJ, Han KH, Park JY, Choi SJ, Lee KH. Influence of bacterial presence on biofilm formation of *Candida albicans*. *Yonsei Med J.* 2014 Mar;55(2):449-58. DOI: 10.3349/ymj.2014.55.2.449.
123. Parrino J., Hotchkiss R.S., Bray M. Prevention of immune cell of apoptosis as potential therapeutic strategy for severe infections. *Emerg. Infect. Dis.*, 2007, vol. 13, №. 2, pp. 191–197.
124. Roger PM, Hyvernats H, Breittmayer JP, Dunais B, Dellamonica J, Bernardin G, et al. Enhanced T-cell apoptosis in human septic shock is

- associated with alteration of the costimulatory pathway. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009 Jun;28(6):575-84. DOI: 10.1007/s10096-008-0673-5.
125. Rydell-Tormanen K., Ulter L., Erjefalt J.S. Direct evidence of secondary necrosis of neutrophils during intense lung inflammation. *Eur. Respir. J.*, 2006, vol. 28, pp. 268–274.
126. Serlachius E, Sundelin B, Eklöf AC, Jahnke M, Laestadius A, Aperia A. Pyelonephritis provokes growth retardation and apoptosis in infant rat renal cortex. *Kidney Int.* 1997 Jun;51(6):1855-62. DOI: 10.1038/ki.1997.253.
127. Shaikh N, Ewing AL, Bhatnagar S, Hoberman A. Risk of renal scarring in children with a first urinary tract infection: a systematic review. *Pediatrics.* 2010 Dec;126(6):1084-91. doi: 10.1542/peds.2010-0685.
128. Silva-Dias A, Miranda IM, Branco J, Monteiro-Soares M, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: relationship among *Candida* spp. *Front Microbiol.* 2015 Mar 12;6:205. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00205.
129. Simmons WL, Bolland JR, Daubenspeck JM, Dybvig K. A stochastic mechanism for biofilm formation by *Mycoplasma pulmonis*. *J Bacteriol.* 2007 Mar;189(5):1905-13. DOI: 10.1128/JB.01512-06.
130. Smith K, Perez A, Ramage G, Lappin D, Gemmell CG, Lang S. Biofilm formation by Scottish clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol.* 2008 Aug;57(Pt 8):1018-1023. DOI: 10.1099/jmm.0.2008/000968-0.
131. Soto GE, Hultgren SJ. Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *J Bacteriol.* 1999 Feb;181(4):1059-71. DOI: 10.1128/JB.181.4.1059-1071.1999.
132. Stewart PS. Antibiotic tolerance in biofilms and its role in persistent infections [DVD]. 11th International congress on infectious diseases. Cancun Mexico; 2014. 1 DVD: 56. 002.

133. Stickler DJ. Clinical complications of urinary catheters caused by crystalline biofilms: something needs to be done. *J Intern Med.* 2014 Aug;276(2):120-9. DOI: 10.1111/joim.12220.
134. Suh W, Kim BN, Kang HM, Yang EA, Rhim JW, Lee KY. Febrile Urinary Tract Infection in Children: Changes in Epidemiology, Etiology, and Antibiotic Resistance Patterns Over a Decade. *Clin Exp Pediatr.* 2020 Oct 14. DOI: 10.3345/cep.2020.00773.
135. Sung SH, Woo S, Lee SJ. Correlation between Renal Growth Retardation and Apoptosis of Cortical Tubules in Experimentally Induced Acute Ascending Pyelonephritis in Infant Rat. *The Korean Journal of Pathology.* 2000;34(12):1001-8.
136. Tittel AP, Heuser C, Ohliger C, Knolle PA, Engel DR, Kurts C. Kidney dendritic cells induce innate immunity against bacterial pyelonephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2011 Aug;22(8):1435-41. DOI: 10.1681/ASN.2010101072.
137. Ulett GC., Adderson EE. Regulation of apoptosis by Gram-positive bacteria: Mechanistic diversity and consequences for immunity. *Curr. Immunol. Rev.* 2006; 2: 119–141.
138. Umesha L, Shivaprasad SM, Rajiv EN, Kumar MMS, Leelavathy V, Sreedhara CG, et al. Acute Pyelonephritis: A Single-center Experience. *Indian J Nephrol.* 2018 Nov-Dec;28(6):454-461. DOI: 10.4103/ijn.IJN_219_16.
139. Urinary tract infection in children: diagnosis, treatment and long-term management. NICE guideline. London: National Institute for Health and Clinical Excellence. 2007; 30 p.
140. Van Acker H, Coenye T. The Role of Efflux and Physiological Adaptation in Biofilm Tolerance and Resistance. *J Biol Chem.* 2016 Jun 10;291(24):12565-72. doi: 10.1074/jbc.R115.707257.
141. Van Laar TA, Chen T, You T, Leung KP. Sublethal concentrations of carbapenems alter cell morphology and genomic expression of *Klebsiella*

- pneumoniae biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Mar;59(3):1707-17. DOI: 10.1128/AAC.04581-14.
142. Wächtler B, Citiulo F, Jablonowski N, Förster S, Dalle F, Schaller M, et al. *Candida albicans*-epithelial interactions: dissecting the roles of active penetration, induced endocytosis and host factors on the infection process. *PLoS One.* 2012;7(5):e36952. DOI: 10.1371/journal.pone.0036952.
143. Wang L, Di Luca M, Tkhilaishvili T, Trampuz A, Gonzalez Moreno M. Synergistic Activity of Fosfomycin, Ciprofloxacin, and Gentamicin Against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Front Microbiol.* 2019 Nov 6;10:2522. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02522.
144. Whiteside SA, Razvi H, Dave S, Reid G, Burton JP. The microbiome of the urinary tract--a role beyond infection. *Nat Rev Urol.* 2015 Feb;12(2):81-90. DOI: 10.1038/nrurol.2014.361.
145. Wickman G., Julian L., Olson M.F. How apoptotic cells aid in the removal of their own cold dead bodies. *Cell Death Differ.*, 2012, vol. 19, pp. 735–742.
146. Yaroshevskaya TV, Korenyuk ES, Minakova VA, Medvedskaya EV. Sovremennye osobennosti etiologicheskoy struktury pielonefrita u detey. *Klinichna pediatriya.* 2016;7(75):80-4.
147. Zhang B., Hirahashi J., Cullere X., Mayadas T. *Escherichia coli* induces bovine neutrophil cell death independent from caspase-3/-7/-1, but with phosphatidylserine exposure prior to membrane rupture. *J. Biol. Chem.*, 2003, vol. 278, pp. 28443–28454.
148. Zychlinsky A., Sansonetti P. Apoptosis as a proinflammatory event: what can we learn from bacteria-induced cell death. *Trends Microbiol.*, 2007, vol. 5, no. 5, pp. 201–204.

ДОДАТОК А
СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ НДР

1. Мішина М.М., Макєєва Н.І., Давиденко В.Б., Бабійчук Л.А., Марченко І.А., Головачова В.О., Мозгова Ю.А., Маланчук С.Г., Дукаров С.В., Дубовик О.С., Мішина Ю.М., Зубова П.М. пієлонефрит у дітей: роль бактеріальної комунікації. *Монографія, ХНМУ*. 2020.121с.
2. Мішина М.М. Марченко І.А. Макєєва Н.І. Головачова В.О. Етіологічна характеристика збудників мікробно – запальних захворювань нирок і сечових шляхів у дітей залежно від віку та статі. *Український журнал медицини, біології та спорту*. 2019. Т.4, №2(18). С.81-86.
3. Mishyna M., Marchenko I., Malanchuk S., Makeeva N., Mozgova Yu.. Ability to form biofilms by pyelonephritis causative agents in children. *Georgian Medical News*. 2019; №9(294). P.132-136.
4. Marchenko I. A., Babiichuk L. O., Mishyna M. M., Makieieva N. I., Zubov P. M. Peculiarities of leukocytes apoptosis modulation in children with pyelonephritis. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2020. № 11 (1). С. 88-92.
5. Мішина М. М., Макєєва Н. І., Марченко І. А., Головачова В. О., Осолодченко Т. П. Формування біоплівки збудниками пієлонефритів у дітей раннього віку, як один з механізмів виникнення стійкості до антимікробних препаратів. *Український журнал медицини, біології та спорту*. 2020. Т.5, №2(24). С.104-111.
6. Mozgova Yu., Mishyna M., Malanchuk S., Marchenko I., Mishyn Yu. Primary and Secondary biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from patients with purulent inflammatory processes. *International Conference on Virology, Bacteriology & Infectious*

Diseases. November 26-28, 2018 Holiday Inn Rome, Aurelia, Italy.

P.25. www.infectiousdiseasesconference.org

7. Mishyna M., Marchenko I., Makeeva N., Mozgova Yu., Mishyn Yu. Etiologic Structure of Pyelonephritis in Children and Ability of Causative Agents to Form Biofilms. *International Conference on Virology, Bacteriology & Infectious Diseases*. November 26-28, 2018 Holiday Inn Rome, Aurelia, Italy. P.27. www.infectiousdiseasesconference.org
8. Mishyna M., Marchenko I., Mozgova Yu. Neutrophils phagocytic activity and nets forming ability in young children with acute pyelonephritis. *EUSER 4th International Conference on Medicine and Natural Sciences Published*, 2019. Amsterdam, 26-27 April 2019. P.41.
9. Mishyna M., Marchenko I., Malanchuk S., Hololobova O. The effect of dnaase activity of *Pseudomonas aeruginosa*, causative agents of pyelonephritis, on the ability to form biofilms. *EUSER 4th International Conference on Medicine and Natural Sciences Published*, 2019. Amsterdam, 26-27 April 2019. P.40.
10. Мішина М.М., Марченко І.А., Бабічук Л.О., Бабічук Г.А., Макєєва Н.І., Мозгова Ю.А., Головачова В.О., Мішин Ю.М. Оцінка стадій апоптозу лімфоцитів у дітей старшого віку з гострої і хронічної формами пієлонефриту. *Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Актуальні питання сучасної мікробіології та імунології», присвячена 90-річчю акад. А.Я. Циганенка 24-26 червня 2019 р., Харків. С. 62-64.*
11. Мішина М.М., Марченко І.А., Маланчук С.Г., Макєєва Н.І., Головачова В.О., Мозгова Ю.А., Мішин Ю.М. Формування біоплівки грамнегативними бактеріями, збудниками пієлонефритів у дітей. *Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Актуальні питання сучасної мікробіології та імунології», присвячена 90-річчю акад. А.Я. Циганенка. 24-26 червня 2019 р., Харків. С. 64-65.*

12. Мішина М.М., Марченко І.А., Давиденко В.Б., Мозгова Ю.А., Дубовик О.С. Утворення біоплівки збудниками пієлонефритів у дітей з вродженим гідронефрозом. *Матеріали конференції «Актуальні проблеми мікробіології, вірусології та імунології», присвяченої 100-річчю з дня заснування кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця МОЗ України, 05 листопада 2019, м. Київ, Україна.* С. 94-95.
13. Maryna Mishyna, Iryna Marchenko, Svitlana Malanchuk. Evaluation Of Peripheral Blood Neutrophils Apoptosis Stages In Children With Acute And Chronic Pyelonephritis. *Scitech World conference on Immunology&infectious diseases. Annual Conference on Nephrology and kidney diseases.* October 08-09, 2019, Dubai, UAE.
14. Марченко І.А. Визначення стану ключових компонентів системи комплементу у дітей молодшого віку з вродженим гідронефрозом, що ускладнений пієлонефритом, зумовленим *E.coli*. *Матеріали конференції ISIC-2019.* 18-20 вересня 2019. Харківський національний медичний університет, Харків, Україна. С.32-33.
15. Марченко І.А. Формування NETs при гострому обструктивному пієлонефриті у дітей. *Збірник тез міжвузівської конференції молодих вчених та студентів «Медицина третього тисячоліття» до 215-ої річниці утворення Харківської вищої медичної школи, 30 - 31. 01.2019, Харків.* С.30-31.
16. Марченко І.А. Оцінка стану клітинної ланки імунітету у дітей раннього віку з пієлонефритом на фоні гідронефрозу. *Збірник матеріалів конференції «Медицина III тисячоліття», 20-22 січня 2020, Харків.* С. 56-57.
17. Malanchuk S., Mishyna M., Marchenko I., Davydenko V., Mozgova Yu. Modulation of the immune status in pyelonephritis caused by *Pseudomonas aeruginosa* in children with hydronephrosis. *30th*

European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), France (Paris), Abstract Book. 2020. P.2566.

18. Мішина М. М., Марченко І. А., Давиденко В. Б., Дубовик О. С., Мішин Ю. М. Визначення адгезивної активності збудників пієлонефриту у дітей із вродженим гідронефрозом. Медичні та фармацевтичні науки: аналіз сучасності та прогноз майбутнього: *Збірник матеріалів міжнародної науково-практичної конференції (м. Дніпро, 13–14 листопада 2020 р.). – Дніпро: Організація наукових медичних досліджень «Salutem», 2020. – С.18-23.*
19. Марченко І.А. Рівень компонентів системи комплементу у дітей старшої вікової категорії з вродженим гідронефрозом, що ускладнений пієлонефритом. *Матеріали науково-практичної конференції студентів та молодих вчених «Мікробіологія – перспективи розвитку», яка присвячена 140-річчю проф. Д.П. Гриньова. Харківський національний медичний університет, Харків, Україна. 10 грудня 2020. С.32-33.*
20. Патент на корисну модель № 139320.МПК (2019.01) А61К 45/00 А 61Р 31/00 Спосіб пригнічення біоплівкоутворення патогенними мікроорганізмами, збудниками гострих пієлонефритів у дітей. Власник ХНМУ, Макеєва Н.І., Мішина М.М., Марченко І.А., Вовк О.О., Мозгова Ю.А., Головачова В.А., Мішин Ю.М. № заяв.у2019 07222, опубл.26.12.2019, Бюл. №24.
21. Патент на корисну модель №144851. МПК G01N33/48 (2006.01). Спосіб оцінки імунного статусу дітей з пієлонефритами різних форм за станом апоптозу нейтрофілів венозної крові. Власник ХНМУ, Макеєва Н.І., Мішина М.М., Марченко І.А., Вовк О.О., Головачова В.А., Бабітчук Л.О. №заяв.у202003529, опубл.26.10.2020, бюл. №20.

ДОДАТОК Б



УКРАЇНА



ПАТЕНТ

НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

№ 144851

**СПОСІБ ОЦІНКИ ІМУННОГО СТАТУСУ ДІТЕЙ ІЗ
ПІСЛОНЕФРИТАМИ РІЗНИХ ФОРМ ЗА СТАНОМ АПОПТОЗУ
НЕЙТРОФІЛІВ ВЕНОЗНОЇ КРОВІ**

Видано відповідно до Закону України "Про охорону прав на винаходи і корисні моделі".

Зареєстровано в Державному реєстрі України корисних моделей
26.10.2020.

Генеральний директор
Державного підприємства
«Український інститут
інтелектуальної власності»

А.В. Кудін

