

УДК 616.34-098

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ И КАЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ДЕЙСТВИИ СИНЕГНОЙНОГО ЭКЗОТОКСИНА

Моррисон В.В., Моррисон А.В.

Саратовский государственный медицинский университет

Подробная информация об авторах размещена на сайте

«Учёные России» - <http://www.famous-scientists.ru>

В работе представлены данные относительно изменения состояния периферической крови мышей и белых крыс в динамике развития синегнойной интоксикации, вызванной введением экзотоксина А. У обоих видов животных имеется сходный доза- и времязависимый эффект токсина на количественные и качественные показатели периферической крови.

В структуре инфекционной заболеваемости, связанной с условно-патогенными грамотрицательными бактериями, основное значение придается инфекции, вызванной *Pseudomonas aeruginosa* (синегнойной палочкой). Наибольшее значение она имеет как госпитальная инфекция: синегнойная палочка является второй по частоте после стафилококка причиной раневых инфекций. Слабой чувствительностью или даже нечувствительностью к большинству антибиотиков объясняется возрастающая роль синегнойной палочки при ожоговой болезни. Среди других заболеваний отмечены гнойные плевриты, абсцессы легких, поражения кожи, заболевания мочевыводящих путей, менингиты, пищевые токсикоинфекции. Клиническая картина синегнойной инфекции часто соответствует септикопиемии [2, 5, 7, 10, 16].

P. aeruginosa обладает многочисленными факторами вирулентности (пигменты, ферменты, токсины) и самыми различными механизмами устойчивости, что и обуславливает потенциальную опасность и тяжесть инфекций, вызываемых ею. Анализ данных литературы показал, что в патогенезе синегнойной инфекции основное значение имеет экзотоксин А (ЭТ-А), который обладает избирательным тропизмом ко многим жизненно важным органам и системам [1, 4, 11, 12, 13, 15].

В работах по выяснению механизма действия ЭТ-А показано, что при действии его на клетки эукариот наблюдается набухание митохондрий, нарушение их проницаемости и нарушение транспорта электронов в цитохромной системе.

Главным нарушением, приводящим к гибели изолированных клеток или организма животного, является нарушение синтеза белка [1, 3, 4, 6, 8, 14]. Доказано, что в основе молекулярного механизма действия экзотоксина А лежит ферментативный гидролиз никотинамидадениндинуклеотида (НАД) и рибозилирование фактора элонгации 2 (ФЭ-2), который принимает участие в удлинении полипептидной цепи на рибосомах клетки. При этом комплекс АДФР-ФЭ-2 становится неактивным и не может участвовать в синтезе белка [8, 9, 15].

В связи с вышеизложенным дальнейшее изучение биологических эффектов синегнойного экзотоксина А представляется весьма актуальной задачей.

Важными показателями биологической активности синегнойного ЭТ-А является оценка морфологических и цитохимических изменений клеток периферической крови, отражающих характер патологических процессов в организме биообъектов при экзогенных воздействиях.

Эксперименты проводили на половозрелых белых нелинейных мышах весом

25-30 г. и белых нелинейных крысах весом 180-250 г.

Кровь у мышей и белых крыс исследовали через 1, 2, 5 суток после внутрибрюшинного введения ЭТ-А в дозах 0,1, 1 и 5 LD50 для мышей и в дозах 0,1, 0,5 и 1 LD50 - для крыс.

Оценку состояния периферической крови проводили с помощью комплекса

морфологических и цитохимических методов, включавшего в себя подсчет общей численности эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов, определение лейкоцитарной формулы, а также выявление и количественную оценку катионных белков в нейтрофилах на основании лизосомально-катионного теста (ЛКТ).

Таблица 1. Динамика морфологических и цитохимических показателей периферической крови мышей после внутрибрюшинного введения экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa*

Показатель, ед. измерения	Группа животных	Значение показателя в динамике интоксикации		
		1 сутки	2 суток	5 суток
Эритроциты, 106 кл.	контроль	6,9 ± 0,5		
	0,1LD50	7,0 ± 0,6	6,8 ± 0,4	6,8 ± 0,5
	LD50	10,5 ± 0,4*	6,6 ± 0,3	4,7 ± 0,2*
	5LD50	9,4 ± 0,37*	5,1 ± 0,2*	-
Лейкоциты, 103 кл.	контроль	16,3 ± 0,4		
	0,1LD50	16,9 ± 0,9	17,1 ± 1,1	15,9 ± 1,5
	LD50	19,1 ± 1,5*	10,4 ± 1,6*	6,5 ± 2,0*
	5LD50	20,4 ± 1,5*	9,8 ± 2,1*	-
Тромбоциты, 106 кл.	контроль	6,0 ± 0,2		
	0,1LD50	6,5 ± 0,2	6,9 ± 0,5	6,6 ± 0,5
	LD50	7,8 ± 0,3*	11,2 ± 0,3*	5,1 ± 0,4*
	5LD50	7,7 ± 0,3*	4,7 ± 0,3*	-
Нейтрофилы, %	контроль	40,0 ± 6,2		
	0,1LD50	54,1 ± 5,3*	52,4 ± 4,2*	45,3 ± 5,7
	LD50	66,7 ± 8,2*	59,7 ± 7,7*	58,7 ± 7,2*
	5LD50	70,1 ± 6,6	68,8 ± 5,2	-
Моноциты, %	контроль	3,9 ± 0,4		
	0,1LD50	3,5 ± 0,2	3,7 ± 0,5	3,8 ± 0,5
	LD50	2,3 ± 0,2*	4,5 ± 0,3	7,1 ± 0,4*
	5LD50	2,0 ± 0,1*	1,1 ± 0,1*	-
Лимфоциты, %	контроль	55,3 ± 7,4		
	0,1LD50	39,2 ± 4,3	43,0 ± 5,8	49,8 ± 5,5
	LD50	30,3 ± 5,5*	35,3 ± 5,9*	34,0 ± 5,8*
	5LD50	27,4 ± 3,8*	29,7 ± 3,7*	-
ЛКТ, ед.	контроль	1,58 ± 0,14		
	0,1LD50	1,02 ± 0,10*	1,08 ± 0,15*	1,31 ± 0,20
	LD50	0,43 ± 0,12*	0,96 ± 0,09*	1,10 ± 0,13*
	5LD50	0,27 ± 0,06*	0,13 ± 0,04*	-

Примечание: здесь и в табл. 2, результаты представлены как среднее ± ошибка среднего. *- достоверность отличий средних значений показателей в опытных группах от контрольных по *t*-критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$. Набор показателей на 5 сутки для дозы 5 LD50 отсутствует в связи с падежом особей данной группы

Результаты экспериментов (табл. 1) свидетельствуют, что через 1 сутки после воздействия токсина в дозе 0,1LD50 единственными изменениями у мышей являются умеренный сдвиг лейкоцитарной формулы в сторону увеличения относительно числа нейтрофилов, а также существенное снижение уровня содержания катионных белков в клетках этого типа (показатель ЛКТ). Последнее можно расценивать как признак активации метаболизма и функций нейтрофилов в ответ на токсическое воздействие. При воздействии ЭТ-А дозе LD50 в эти же сроки отмечается статистически значимое повышение численности всех основных популяций форменных элементов крови – эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов – с одновременным сдвигом лейкоцитарной формулы в сторону увеличения процента нейтрофилов и снижения лимфоцитов. Цитохимические изменения характеризуются значительным падением уровня катионных белков. Аналогичная картина крови, но с более резкими и глубокими количественными изменениями, отмечается и при введении токсина в дозе 5 LD50.

Через 2 суток интоксикации у мышей, получивших дозу 0,1LD50, величины исследуемых показателей крови в целом соответствуют картине, описанной выше на 1 сутки для дозы этой категории. При поражениях ЭТ-А в дозе 1 LD50 происходит снижение количества эритроцитов примерно до уровня нормы, тогда как численность лейкоцитов падает ниже контрольного уровня. Продолжает также сохраняться умеренный тромбоцитоз. Показатель ЛКТ, отражающий цитохимический статус нейтрофильной субпопуляции лейкоцитов, по-прежнему остается на низком уровне. При дозе 5 LD50 обнаруживаются еще более тяжелые изменения, главными из которых являются эритро-, лейко- и тромбоцитопения, выраженный патологический сдвиг лейкоцитарной формулы и глубокое угнетение метаболизма нейтрофилов, показателем которого является крайне низкий уровень катионных белков, что принято считать неблагоприятным прогностическим признаком при различного рода тяжелых инфекционных заболеваниях и химических интоксикациях.

На 5 сутки после воздействия ЭТ-А в дозе 0,1 LD50 наблюдается практически полное восстановление параметров крови до состояния физиологической нормы. При воздействии ЭТ-А в дозе LD50 сохраняется целый ряд патологических сдвигов, прежде всего, в виде эритро- и лейкопении, а также тромбоцитопении, которая приходит на смену ранее имевшему место тромбоцитозу. Кроме того, продолжает сохраняться смещение лейкоцитарной формулы в сторону пониженного удельного содержания лимфоцитов и, наконец, по-прежнему остается относительно низким показатель ЛКТ, что в данный период интоксикации является индикатором общего истощения функционально-метаболических резервов клеток нейтрофильной субпопуляции.

Таким образом, выявленный в периферической крови белых мышей спектр патологических изменений позволяет сделать вывод о том, что исследуемое вещество обладает достаточно выраженными гематотоксическими свойствами, которые проявляются в отношении всех типов форменных элементов.

Далее были проведены исследования тех же показателей периферической крови у нелинейных белых крыс (табл. 2).

Проведенные исследования показывают, что на 1 сутки после введения ЭТ-А в дозе 0,1LD50 единственным достоверным признаком интоксикации является достоверное снижение показателя лизосомально-катионного теста (ЛКТ). При дозах 0,5 LD50 и LD50 к этому признаку присоединяется увеличение численности эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов, а также сдвиг лейкоцитарной формулы в сторону повышения относительного количества нейтрофилов с одновременным падением процента лимфоцитов и моноцитов.

На 2-е сутки после воздействия токсина у животных двух экспериментальных групп (получивших дозу токсина на уровне 0,5 и 1 LD50) содержание катионных белков в нейтрофилах продолжает оставаться крайне низким, что свидетельствует о резком нарушении функционально-метаболического статуса клеток этого типа. На это же указывает и тенденция к об-

шему снижению численности лейкоцитов, а также такой признак, как существенное уменьшение относительной доли нейтрофилов в составе лейкоцитарной популяции, которое при дозе 0,5 LD50 достигает примерно двукратного уровня по сравне-

нию с контролем. Глубоким патологическим изменениям подвергается также тромбоцитарная составляющая периферической крови, отражением чего является выраженная тромбоцитопения взамен наблюдавшегося ранее тромбоцитоза.

Таблица 2. Динамика морфологических и цитохимических показателей периферической крови белых крыс после внутрибрюшинного введения экзотоксина A *Pseudomonas aeruginosa*

Показатель, ед. измерения	Группа животных	Значение показателя в динамике интоксикации		
		1 сутки	2 суток	5 суток
Эритроциты, 106 кл.	контроль	5,9 ± 0,4	6,7 ± 0,6	6,5 ± 0,7
	0,1LD50	6,4 ± 0,3	7,0 ± 0,4	6,3 ± 0,6
	0,5LD50	8,9 ± 0,7*	8,2 ± 0,9	5,6 ± 0,3
	LD50	9,4 ± 0,5*	7,7 ± 0,5*	-
Лейкоциты, 103 кл.	контроль	13,7 ± 0,8	12,6 ± 1,0	12,8 ± 0,4
	0,1LD50	13,0 ± 0,6	12,2 ± 0,5	14,1 ± 0,7
	0,5LD50	18,6 ± 1,4*	15,4 ± 1,7*	8,5 ± 1,1*
	LD50	17,1 ± 0,5*	10,8 ± 0,9	-
Тромбоциты, 106 кл.	контроль	5,8 ± 0,5	5,2 ± 0,6	5,7 ± 0,4
	0,1LD50	4,2 ± 1,0	3,5 ± 0,8	4,0 ± 0,9
	0,5LD50	7,4 ± 0,5*	3,3 ± 0,4*	3,8 ± 0,4*
	LD50	7,0 ± 0,6*	2,6 ± 0,2*	-
Нейтрофилы, %	контроль	40,0 ± 6,3	39,7 ± 4,5	38,0 ± 7,1
	0,1LD50	46,3 ± 4,2*	39,4 ± 3,6	32,7 ± 4,0
	0,5LD50	80,3 ± 3,9*	51,0 ± 5,9	41,4 ± 4,5
	LD50	75,8 ± 4,6*	20,5 ± 2,4*	-
Моноциты, %	контроль	2,6 ± 0,8	3,7 ± 1,0	2,9 ± 0,6
	0,1LD50	2,0 ± 0,6	2,8 ± 0,8	2,3 ± 0,7
	0,5LD50	0,7 ± 0,3*	1,7 ± 0,2*	2,0 ± 0,5
	LD50	0,5 ± 0,1*	2,0 ± 0,2*	-
Лимфоциты, %	контроль	53,0 ± 1,1	60,1 ± 4,3	59,3 ± 4,5
	0,1LD50	49,2 ± 3,1	56,8 ± 3,5	64,0 ± 3,9
	0,5LD50	14,3 ± 3,2*	46,0 ± 5,0	52,0 ± 4,6
	LD50	19,8 ± 3,0*	76,6 ± 2,8*	-
ЛКТ, ед.	контроль	1,70 ± 0,10	1,70 ± 0,15	1,80 ± 0,12
	0,1LD50	1,10 ± 0,08*	1,50 ± 0,18	1,50 ± 0,11
	0,5LD50	0,50 ± 0,05*	0,80 ± 0,07*	1,10 ± 0,14*
	LD50	0,30 ± 0,03*	0,40 ± 0,09*	-

Примечание: набор показателей на 5 сутки для дозы LD50 отсутствует в связи с падежом особей данной группы

На 5-е сутки в группе крыс, получивших дозу 0,1 LD50, можно констатировать полную нормализацию всех исследуемых гематологических показателей, в то время как при дозе 0,5 LD50 остаются значительные отклонения от нормы в виде

продолжающихся тромбоцитопении, общей лейкопении, и внутриклеточные резервы катионных белков в нейтрофилах этих животных не достигают полного восстановления. Оценить уровень исследуемых показателей при максимальной дозе

ЭТ-А (1 LD₅₀) в указанный срок не представилось возможным в связи с гибелью всех животных данной группы.

Таким образом, анализ полученных данных позволяет сделать вывод о том, что общая динамика развития изменений периферической крови, которыми сопровождается острое поражение экзотоксином А *Pseudomonas aeruginosa* у нелинейных крыс, в целом, соответствует картине, отмечавшейся ранее у мышей.

Суть этих изменений состоит в наличии первичной гематологической реакции в виде повышения численности всех основных типов форменных элементов в первые сутки интоксикации, которая затем сменяется более и или менее глубоким снижением количественных морфологических и цитохимических параметров крови, связанных с нарастанием цитотоксического эффекта исследуемого вещества. Последствиями такой дезорганизации клеточного гомеостаза на уровне целостного организма являются, как правило, геморрагический синдром, синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания, септические состояния вследствие снижения неспецифической противоинфекционной защиты и другие тяжелые клинические осложнения, совокупность которых во многих случаях определяет возможность наступления летального исхода у пораженного биообъекта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Вертиев Ю.В., Бродина Н.С., Мороз А.Ф. // ЖМЭИ. – 1981. - № 2. – С.13-19.

2. Горбунов В.А. //Медицинские новости. – 2004.- № 10. - С.24-28.

3. Езепчук Ю.В. Патогенность как функция биомолекул. – М.: Медицина, 1985. – 238 с.

4. Мороз А.Ф., Анциферова Н.Г., Баскакова Н.В. Синегнойная инфекция. – М.: Медицина, 1988. – 256 с.

5. Руднов В.А. //Инфекции и антимикробная терапия. - 2002. - Т. 4, № 6. – С.32

6. Carty N.L., Layland N., Colmer-Yamood J.A. et al. //Mol. Microbiol. - 2006, Vol. 61, № 3. – P.782-794

7. Colovic N., Grubor N., Tanaslovic S., Colovic R. //Vojnosanit Pregl. - 2007.- Vol.64, № 6. - P.413-416

8. Delden C., Iglewski B.H. // Emerging infection diseases. - 1998.- Vol. 4, № 4.- P.551-560

9. Jorgensen R., Merrill A.R, Andersen G.R. // Biochem. Soc.Trans. – 2006. - Vol. 34, Pt. 1. – P. 1-6.

10. Malterud K., Thesen J. //Tidsskr. Nor. Laegeforen. - 2007.- Vol. 127, № 13.- P.1779-1781

11. Masuda N, Sakagawa E, Ohya S. //Antimicrob Agents Chemother. – 1995. - Vol. 39, №3. – P. 645–649

12. Mizgerd J.P., Brrain J.D. //Curr. Microbiol. - 1995.- Vol. 31, № 2. - P.124-128

13. Pastrana D.V., Hanson A.J., Knisely J., Bu G., Fitzgerald D.J. //Biochim. Biophys. Acta. – 2005. - Vol. 1741, № 3. – P.234-239.

14. Somerville G., Mikoryak C.A., Reitzer L. //J. Bacteriology. - 1999.- Vol.181, № 4. – P.1072-1078

15. Yates S.P., Jorgensen R., Andersen G.R., Merrill A.R. //Trends Biochem. Sci., 2006. - Vol. 31, № 2. - P.123-133

16. Yetkin G., Otlu B., Cicek A., Kuzucu C., Durmaz R. //Am. J. Infect. Control. - 2006. - Vol. 34, № 4. – P.188-192.

QUANTITATIVE AND QUALITATIVE CHANGES IN CELL CONTENT OF PERIPHERIAL BLOOD INDUCED BY PSEUDOMONAS AERUGINOSA EXOTOXIN IN EXPERIMENTAL ANIMALS

Morrison V.V., Morrison A.V.
Saratov State Medical University

Changes in peripheral blood counts of white mice and rats in dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A intoxication were investigated. In both species, similar dose- and time-dependent and qualitative parameters of peripheral blood were observed.