

УДК 612.017.1-02:579.841.11

ИММУНОТОКСИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ЭКЗОТОКСИНА А PSEUDOMONAS AERUGINOSA У БЕЛЫХ КРЫС

Моррисон А.В., Попович В.И., Моррисон В.В.

ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Саратов, e-mail: morrison@sgmu.ru

В экспериментах на белых крысах в динамике синегнойной интоксикации (1, 2, 5 суток) изучено иммунотоксическое действие различных доз (0,1–1,0 LD₅₀) экзотоксина А (ЭТ-А) *Pseudomonas aeruginosa*. Исследованы массы тимуса, селезенки, общее количество лимфоцитов, процентное содержание Т- и В-лимфоцитов в тимусе и селезенке, количество циркулирующих иммунных комплексов в крови. Установлено, что имеется дозозависимый эффект ЭТ-А, заключающийся в изменении массы и клеточного состава лимфоидных органов нелинейных крыс во все сроки наблюдения.

Ключевые слова: синегнойный экзотоксин А, масса и клеточный состав лимфоидных органов

IMMUNOTOXIC EFFECT OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA EXOTOXIN A ON WHITE RATS

Morrison A.V., Popovich V.I., Morrison V.V.

Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovsky, Saratov, e-mail: morrison@sgmu.ru

Immunotoxic effect of different doses (0,1–1,0 LD₅₀) of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A has been determined in dynamics of intoxication process. The experiments have been held on white rates for the period of 1, 2 or 5 days. The following parameters have been detected in the study: the thymus mass, the spleen mass, the lymphocyte count, the percentage of T- and B-lymphocytes in thymus and spleen, the quantity of circulating immune complexes in blood. The dose dependant effect of exotoxin A has been found out. It resulted in the changes of mass and cellular composition of lymphoid organs of white rats in any period of the study.

Keywords: *Pseudomonas* infection exotoxin A, mass and cellular composition of lymphoid organs

В структуре инфекционной заболеваемости, связанной с условно-патогенными грамотрицательными бактериями, основное значение придается инфекции, вызванной *Pseudomonas aeruginosa* (синегнойной палочкой), являющейся грамотрицательным оппортунистическим патогеном. Тревожным фактом является распространенность данной инфекции без тенденции к снижению. Нозокомиальные инфекции, обусловленные *Pseudomonas aeruginosa*, ассоциируются с высоким уровнем смертности, значительно превышающим таковой для инфекций, вызванных другими бактериальными патогенами, сложностями в антимикробной терапии [3, 4, 15].

P. aeruginosa обладает многочисленными факторами вирулентности (пигменты, ферменты, токсины). Анализ данных литературы показал, что в патогенезе синегнойной инфекции ведущим экстраклеточным фактором патогенности является экзотоксин А (ЭТ-А), который продуцируется большинством (до 90%) клинических штаммов синегнойной палочки [1, 11, 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 [5, 7].

ЭТ-А обладает выраженным цитотоксическим действием в различных тканях. Выявлены доза и времязависимый эффект токсина на количественные и качественные показатели периферической крови белых мышей и крыс [2]. Через 30 мин после внутривенного введения мышам токсин уменьшает количество полиморфноядерных лейкоцитов более чем на 50%, но это снижение может быть предотвращено предварительным введением моноклональных антител к токсину. ЭТ-А также ингибирует фагоцитоз, образование IgM и IgG. Вероятно, вызванная токсином деструкция клеток иммунной системы, развитие иммуносупрессии может способствовать поддержанию синегнойной инфекции [10, 12, 13]. Больные, у которых до заболевания имелись антитела к ЭТ-А, реже умирают от псевдомонадного сепсиса [6]. Активная иммунизация мышей с помощью ослабленного токсина оказывает протективный эффект при синегнойной инфекции [9].

В этой связи представляется важным выяснить влияние ЭТ-А на некоторые показатели естественного иммунитета при экспериментальной синегнойной интоксикации.

Материалы и методы исследования

Эксперименты проведены на нелинейных белых крысах весом 180–250 г после внутрибрюшинного введения ЭТ-А в дозе 0,1, 0,5 и 1,0 LD₅₀ в динамике развития интоксикации. Для анализа иммунологических, патоморфологических и клинико-биохимических показателей кровь забирали у крыс прижизненно из подязычной вены через 1, 2 и 5 суток.

Оценку иммунного статуса нелинейных крыс проводили по показателям массы лимфоидных органов (тимуса и селезенки) и количеству лимфоцитов в них, а также по популяционному составу лимфоцитов селезенки, по функциональной активности лимфоцитов, концентрации циркулирующих иммунных комплексов и лизоцима в сыворотке крови.

Для активации Т-лимфоцитов использовали фитогемагглютинин (ФГА), для активации В-лимфоцитов – липополисахарид (ЛПС).

Активность кислороднезависимого механизма фагоцитоза оценивали по уровню катионных белков в нейтрофилах на основании лизосомально-катионного теста (ЛКТ). В качестве показателя гуморальной защищенности определяли активность лизоцима.

Результаты исследования и их обсуждение

Представленные данные свидетельствуют о том, что при воздействии ЭТ-А на организм нелинейных крыс происходят изменения массы и клеточного состава лимфоидных органов подопытных животных. Интоксикация дозой 0,1 LD₅₀ токсина приводит к достоверному снижению массы тимуса на 5 сутки наблюдения, в то время как при поражении дозой 1,0 LD₅₀ уже на первые сутки интоксикации наблюдается значительное снижение массы лимфоидных органов.

Оценивая приведенные экспериментальные данные, можно отметить, что воздействие ЭТ-А в дозе 0,1 LD₅₀ приводит к уменьшению клеточного состава лимфоцитов селезенки в ранние сроки после начала интоксикации. Эти отклонения затрагивают в основном В-клеточное звено иммунной системы.

При воздействии более высокой дозы токсина общее количество клеток в селезенке на первые сутки интоксикации остается в пределах нормы благодаря значительному увеличению количества Т-лимфоцитов, несмотря на то, что количество В-лимфоцитов достоверно снижается. Но уже на вторые сутки после воздействия токсина количество этих клеток резко возрастает. Это, на наш взгляд, связано с активацией В-системы за счет Т-клеточного звена иммунной системы, одна из субпопуляций которого вырабатывает лимфокины, стимулирующие пролиферацию В-клеток. Этот процесс, по нашему мнению, является компенсаторной реакцией иммунной системы на воздействие токсина, направленной на поддержание иммунологического гомеостаза. Проведенные исследования свиде-

тельствует о глубине поражения клеточного звена иммунной системы, что подтверждает ранее полученные данные [12, 13].

Добавление Т- и В-митогенов животным, отравленным ЭТ-А в дозе 0,1 LD₅₀, на ранней стадии интоксикации способствовало возрастанию индекса стимуляции, однако из-за большого разброса данных это увеличение не было статистически значимым.

Как видно из таблицы, при введении больших доз ЭТ-А имеется значительное дозо- и времязависимое падение уровня катионных белков нейтрофилов. Так, на 2-е сутки после воздействия токсина у животных, получивших дозу токсина на уровне 0,5 и 1 LD₅₀, содержание катионных белков в нейтрофилах крайне низкое. Так после введения ЭТ-А в дозе, равной 1 LD₅₀, содержание катионных белков уменьшилось в 5 раз. Это свидетельствует о резком нарушении функционально-метаболического статуса клеток этого типа. На это же указывает и тенденция к общему снижению численности лейкоцитов, а также такой признак, как существенное уменьшение относительной доли нейтрофилов в составе лейкоцитарной популяции. Падение ЛКТ принято считать неблагоприятным прогностическим признаком при различного рода тяжелых инфекционных заболеваниях и химических интоксикациях.

При введении различных доз ЭТ-А ни на одной стадии интоксикации не было обнаружено изменение активности лизоцима.

Таким образом, можно сделать вывод, что при воздействии на организм нелинейных крыс малой дозы токсина благодаря активации и работе компенсаторных механизмов иммунной системы к пятым суткам интоксикации практически все исследуемые показатели приближаются к значениям нормы. А при оценке влияния большей дозы токсина (1,0 LD₅₀) полученные данные свидетельствуют о значительной глубине поражения клеточного звена иммунной системы, выходящего за пределы адаптационных возможностей иммунокомпетентных клеток.

Снижение концентрации циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови на первые сутки интоксикации токсином в дозе, равной 0,1 LD₅₀, свидетельствует о снижении антителообразования у подопытных животных. Это вполне согласуется со снижением количества В-лимфоцитов, которые ответственны за выработку антител.

Таким образом, установлено выраженное иммунотоксическое действие экзотоксина *A Pseudomonas aeruginosa* на организм нелинейных белых крыс во все сроки наблюдения, проявляющееся даже при воздействии сублетальных доз токсина.

Иммунотоксические свойства экзотоксина *A. Ps. aeruginosa* для нелинейных крыс

Иммунологический показатель, ед. измерения	Группа животных	Значение показателя в динамике интоксикации		
		1 сутки	2 суток	5 суток
Масса тимуса, г	контроль	0,153 ± 0,016	0,153 ± 0,016	0,153 ± 0,016
	0,1LD ₅₀	0,124 ± 0,02	0,167 ± 0,024	0,094 ± 0,006*
	LD ₅₀	0,102 ± 0,014*	0,117 ± 0,012	–
Количество лимфоцитов в тимусе, млн	контроль	30,8 ± 6,9	30,8 ± 6,9	30,8 ± 6,9
	0,1LD ₅₀	20,2 ± 4,31	11,33 ± 2,48*	15,0 ± 3,03
	LD ₅₀	16,83 ± 2,79	19,25 ± 6,0	–
Масса селезенки, г	контроль	1,20 ± 0,12	1,20 ± 0,12	1,20 ± 0,12
	0,1LD ₅₀	1,06 ± 0,19	0,93 ± 0,08	1,15 ± 0,14
	LD ₅₀	0,76 ± 0,08*	1,09 ± 0,20	–
Количество лимфоцитов в селезенке, млн	контроль	87,17 ± 21,45	87,17 ± 21,45	87,17 ± 21,45
	0,1LD ₅₀	24,8 ± 4,65*	29,5 ± 10,56*	101,83 ± 22,17
	LD ₅₀	84,33 ± 27,69	23,5 ± 3,57*	–
Количество В-лимфоцитов в селезенке, %	контроль	31,33 ± 2,92	31,33 ± 2,92	31,33 ± 2,92
	0,1LD ₅₀	18,17 ± 1,05*	33,83 ± 4,38	26,67 ± 2,87
	LD ₅₀	20,17 ± 2,46*	48,40 ± 5,73*	–
Количество Т-лимфоцитов в селезенке, %	контроль	21,5 ± 1,88	21,5 ± 1,88	21,5 ± 1,88
	0,1LD ₅₀	27,0 ± 2,82	24,5 ± 1,34	19,0 ± 1,21
	LD ₅₀	31,67 ± 3,73*	27,6 ± 3,41	–
ЦИК, компл/100 мл	контроль	71,9 ± 4,47	71,9 ± 4,47	71,9 ± 4,47
	0,1LD ₅₀	45,5 ± 9,26*	81,4 ± 12,25	62,17 ± 5,97
	LD ₅₀	74,2 ± 13,32	59,6 ± 10,45	–
Лизоцим, мкг/мл	контроль	2,77 ± 0,28	2,77 ± 0,28	2,77 ± 0,28
	0,1LD ₅₀	3,36 ± 0,30	3,01 ± 0,19	2,17 ± 0,18
	LD ₅₀	3,94 ± 0,67	3,17 ± 0,24	–
Индекс стимуляции (ФГА)	контроль	1,01 ± 0,06	1,01 ± 0,06	1,01 ± 0,06
	0,1LD ₅₀	1,27 ± 0,13	0,99 ± 0,06	1,1 ± 0,14
	LD ₅₀	1,08 ± 0,05	0,90 ± 0,08	–
Индекс стимуляции, (ЛПС)	контроль	1,36 ± 0,08	1,36 ± 0,08	1,36 ± 0,08
	0,1LD ₅₀	1,52 ± 0,15	1,27 ± 0,09	1,72 ± 0,21
	LD ₅₀	1,24 ± 0,06	1,46 ± 0,09	–
ЛКТ, ед	контроль	1,70 ± 0,10	1,70 ± 0,15	1,80 ± 0,12
	0,1LD ₅₀	1,10 ± 0,08*	1,50 ± 0,18	1,50 ± 0,11
	0,5LD ₅₀	0,50 ± 0,05*	0,80 ± 0,07*	1,10 ± 0,14*
	LD ₅₀	0,30 ± 0,03*	0,40 ± 0,09*	–

Примечание. Данные представлены как среднее ± ошибка среднего. * – достоверность отличий показателей от контрольных по t-критерию Стьюдента при p 0,05. Набор показателей на 5 сутки для дозы 1,0 LD₅₀ отсутствует в связи с падежом особей данной группы. Каждая группа включала 10 животных.

Список литературы

1. Мороз А.Ф., Анциферова Н.Г., Баскакова Н.В. Синегнойная инфекция. – М.: Медицина, 1988. – 256 с.
2. Моррисон В.В., Моррисон А.В. Количественные и качественные изменения клеточного состава периферической крови экспериментальных животных при действии синегнойного экзотоксина // *Фундаментальные исследования*. – 2008. – № 4. – С. 19–25.
3. Руднов В.А., Бельский Д.В., Дехнич Ф.В., исследовательская группа РИОРИТа // *Клин. микробиол. антимикроб. химиотер.* – 2011. – Т. 13, № 4. – С. 294–303.
4. Chastre J., Trouillet J.L. Problem pathogens (*Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter*) // *Semin Respir Infect.* – 2000. – Vol.15. – P. 287–298.
5. Deng Q., Barbieri J.T. Molecular mechanisms of the cytotoxicity of ADP-ribosylating toxins // *Annu Rev Microbiol.* – 2008. – Vol. 62. – P. 271–288.
6. Denis-Mize K.S. Analysis of immunization with DNA encoding *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. / Denis-Mize K.S., Price B.M., Baker N.R., et al. // *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2000. – № 27(2). – P. 147–154.
7. Jger D., Werdan K., Muller-Werdan U. Endogenous ADP-ribosylation of elongation factor-2 by interleukin-1 β . // *Mol Cell Biochem.* – 2011. – Vol.348. – № 1–2. – P. 125–128.
8. Malterud K., Thesen J. Whirlpool and pseudomonas infection--a local outbreak // *Tidsskr. Nor. Laegeforen.* – 2007. – Vol. 127, № 13. – P. 1779–1781.
9. Manafi A. Active immunization using exotoxin A confers protection against *Pseudomonas aeruginosa* infection in a mouse burn model / Manafi A., Kohanteb J., Mehrabani D. et al. // *BMC Microbiol.* – 2009. – Vol.9. – № 23. – available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19183501>.
10. Miyazaki S. Role of exotoxin A in inducing severe *Pseudomonas aeruginosa* infections in mice / Miyazaki S., Matsumoto T., Tateda K., et al. // *J Med Microbiol.* – 1995. – Vol.43, № 3. – P. 169–175.
11. Nikbin V.S. Molecular identification and detection of virulence genes among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different infectious origins / Nikbin V.S., Aslani M.M., Sharafi Z. et al. // *Iran J Microbiol.* – 2012. – Vol.4, № 3. – P. 118–123.
12. Pearson J.P., Pesci E.C., Iglewski B.H. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes // *J Bacteriol.* – 1997. – Vol. 179, № 18. – P. 5756–5767.
13. Vidal D.R., Garrone P., Banchereau J. Immunosuppressive effects of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin-a on human lymphocytes-B // *Toxicon.* – 1993. – Vol. 31. – P. 27–34.
14. Yates S.P. Stealth and mimicry by deadly bacterial toxins / Yates S.P., Jorgensen R., Andersen G.R., Merrill A.R. // *Trends Biochem. Sci.*, 2006. – Vol. 31, № 2. – P. 123–133.
15. Zar H.J., Cotton M.F. Nosocomial pneumonia in pediatric patients: practical problems and rational solutions // *Paediatr Drugs.* – 2002. – Vol. 4. – № 2. – P. 73–83.

References

1. Moroz A.F., Antsiferova N.G., Baskakova N.V., *Sinegnoinaya infektsia*, Moscow, Meditsina, 1988. 256 p.
2. Morrison V.V., Morrison A.V., *Kolichestvennye i kachestvennye izmeneniya kletocznego sostava perifericheskoy krovi eksperimentalnykh zhivotnykh pri deystvii sinegnoynogo*

go ekzotoksina // *Fundamentalnye issledovaniya*, 2008, no. 4, pp. 19–25.

3. Rudnov V.A., Belsky D.V., Dekhnic F.V., *issledovatel'skaya gruppa RIORITa* // *Klin.mikrobiol antimikrob khimioter*, 2011, vol. 13, no. 4, pp. 294–303.

4. Chastre J., Trouillet J.L. Problem pathogens (*Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter*) // *Semin Respir Infect.* 2000. Vol. 15. pp. 287–298.

5. Deng Q., Barbieri J.T. Molecular mechanisms of the cytotoxicity of ADP-ribosylating toxins // *Annu Rev Microbiol.* 2008. Vol. 62. pp. 271–288.

6. Denis-Mize K.S. Analysis of immunization with DNA encoding *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. / Denis-Mize K.S., Price B.M., Baker N.R., et al. // *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2000; 27(2): 147–154.

7. Jger D., Werdan K., Muller-Werdan U. Endogenous ADP-ribosylation of elongation factor-2 by interleukin-1 β . // *Mol Cell Biochem.* 2011. Vol.348. no. 1–2. pp. 125–128.

8. Malterud K., Thesen J. Whirlpool and pseudomonas infection--a local outbreak // *Tidsskr. Nor. Laegeforen.* 2007. Vol. 127, no. 13. pp. 1779–1781.

9. Manafi A. Active immunization using exotoxin A confers protection against *Pseudomonas aeruginosa* infection in a mouse burn model / Manafi A., Kohanteb J., Mehrabani D. et al. // *BMC Microbiol.* 2009. Vol. 9. no. 23. available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19183501>.

10. Miyazaki S. Role of exotoxin A in inducing severe *Pseudomonas aeruginosa* infections in mice / Miyazaki S., Matsumoto T., Tateda K., et al. // *J Med Microbiol.* 1995. Vol. 43, no. 3. pp. 169–175.

11. Nikbin V.S. Molecular identification and detection of virulence genes among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different infectious origins. / Nikbin V.S., Aslani M.M., Sharafi Z. et al. // *Iran J Microbiol.* 2012. Vol. 4, no. 3. pp. 118–123.

12. Pearson J.P., Pesci E.C., Iglewski B.H. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. // *J Bacteriol.* 1997. Vol. 179, no. 18. pp. 5756–5767.

13. Vidal D.R., Garrone P., Banchereau J. Immunosuppressive effects of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin-a on human lymphocytes-B // *Toxicon.* 1993. Vol. 31. pp. 27–34.

14. Yates S.P. Stealth and mimicry by deadly bacterial toxins. / Yates S.P., Jorgensen R., Andersen G.R., Merrill A.R. // *Trends Biochem. Sci.*, 2006. Vol. 31, no. 2. pp. 123–133.

15. Zar H.J., Cotton M.F. Nosocomial pneumonia in pediatric patients: practical problems and rational solutions // *Paediatr Drugs.* 2002. Vol. 4. no. 2. pp. 73–83.

Рецензенты:

Чеснокова Н.П., д.м.н., профессор кафедры патологической физиологии, ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского», г. Саратов;

Пучиньян Д.М., д.м.н., заместитель директора по науке Саратовского НИИ травматологии и ортопедии Минздрава РФ, г. Саратов.

Работа поступила в редакцию 02.03.2015.