

Увеличивается содержание нейроспецифической енолазы в тучных клетках, число которых возросло более чем в 1,5 раза. Причем увеличилось процентное содержание молодых компактных клеток.

Обсуждение. В костном мозге через 40 мин после аутогенной пересадки костного мозга увеличивается число гранулярных люминесцирующих клеток и снижается число тучных клеток с увеличением в них биоаминов. Повышается дегрануляция тучных клеток, увеличивается выход нейроаминов из гранул люминесцирующих клеток в межклеточное пространство. У экспериментальных животных ярко люминесцируют ядра нейтрофилов. Возможно, все это говорит об активации иммунной реакции.

По данным Гордон (1982) [8], гамма-метахромазия свидетельствует о старении тучных клеток и об их усиленной сульфатации.

Увеличивается число митозов, образуются шаровидные скопления морфологически одинаковых клеток, по периферии которых располагаются гранулярные люминесцирующие клетки. В тканях происходит дифференцировка и пролиферация предшественников тучных клеток. Как известно, накопление катехоламинов, серотонина в цитоплазме клеток костного мозга способствует дифференцировке зрелых форм клеток, а накопление гистамина снижает дифференцировку и увеличивает число бластов. По сравнению с данными других авторов [3], мы предполагаем, что нейроамины регулируют гемопоэз, активируют ангиогенез посредством перераспределения нейроаминов в структурах костного мозга. Увеличенная активность ферментов приводит к усилению окислительно-восстановительных процессов.

Выводы:

1. Аутопересадка приводит к увеличению числа ГЛК и ТК, а в них повышается содержание нейроаминов, это приводит к изменению цитодифференцировки клеток.

2. Аутопересадка костного мозга стимулирует иммунные процессы.

2. Увеличивается активность ферментов, что активирует окислительно-восстановительные процессы.

Конфликт интересов отсутствует.

References (Литература)

1. Semenov EV, Stancheva NV, Bondarenko SN. Quality of patients with lymphoma in different terms after high-dose

chemotherapy with autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Clinical oncology: Basic research and clinical practice* 2014; 7 (4): 577–582. Russian (Семенова Е. В., Станчева Н. В., Бондаренко С. Н. Качество жизни больных лимфомами в разные сроки после высокодозной химиотерапии с аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток. *Клиническая онкогематология: фундаментальные исследования и клиническая практика* 2014; 7 (4): 577–582).

2. Abedi M, Foster BM, Wood KD, et al. Haematopoietic stem cells participate in muscle regeneration. *Br J Haematol.* 2007; 138 (6): 792–801.

3. Lyubovtseva EV. Bioaminsoderzhaschie structure of the bone marrow in systemic blood diseases. *Morphology* 2012; 3: 95–96. Russian (Любовцева Е. В., Любовцева Л. А. Биоаминсодержащие структуры костного мозга при системных заболеваниях крови. *Морфология* 2012; 3: 95–96).

4. Makarenkova VP, Coast NV, Schurin MR. The system of dendritic cells: their role in the induction of immunity in the pathogenesis of infectious diseases, autoimmune diseases and cancer. *Immunology* 2002; 2: 68–76. Russian (Макаренко В. П., Кост Н. В., Щурин М. П. Система дендритных клеток: роль в индукции иммунитета и в патогенезе инфекционных, аутоиммунных и онкологических заболеваний. *Иммунология* 2002; 2: 68–76).

5. Stavinskaya OA. The role of histamine and serotonin in the maintenance of immune homeostasis. In: National Conference "Allergology and Clinical Immunology: interdisciplinary problems". *Allergic Russian magazine* 2008; 1: 283–284. Russian (Ставинская О. А. Роль гистамина и серотонина в поддержании иммунного гомеостаза. В кн.: Национальная конференция «Аллергология и клиническая иммунология: междисциплинарные проблемы». *Российский аллергологический журнал* 2008; 1: 283–284).

6. Karkischenko NN, Grachev SV. Guide to laboratory animals and alternative models in biomedical technologies. M.: Medicine, 2010; 344 p. Russian (Каркищенко Н. Н., Грачева С. В. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях. М.: Медицина, 2010; 344 с.)

7. Cross SAM, Ewen SWB, Rost EWDA. Stind of the methods available for the cytochem: cal localization of histamine by fluorescence induced with o-phthalaldehyde or acetadehude. *J. Histochem* 1971; 6: 471–476.

8. Gordon BM. Mathematical justification specificity lyuminestsentno- histochemical reactions autolyuminestsentnyh structures. *Morphology and histochemistry of normal tissue, pathology and exsperimente* 1982; 2: 71–76. Russian (Гордон Б. М. Математическое обоснование специфичности люминесцентно- гистохимических реакций на аутолюминесцентных структурах. *Морфология и гистохимия тканей в норме, патологии и эксперименте* 1982; 2: 71–76).

УДК 612.9-002-022.7

Оригинальная статья

ГЕПАТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ СИНЕГНОЙНОГО ЭКЗОТОКСИНА А У БЕЛЫХ МЫШЕЙ В ДИНАМИКЕ ИНТОКСИКАЦИИ

А. В. Моррисон — ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» Минздрава России, доцент кафедры кожных и венерических болезней, кандидат медицинских наук; **В. И. Попович** — 33 Центральный научно-исследовательский испытательный институт (ЦНИИИ) МО России, начальник отдела, кандидат медицинских наук; **В. В. Моррисон** — ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» Минздрава России, профессор кафедры патологической физиологии им. А. А. Богомольца, профессор, доктор медицинских наук.

PSEUDOMONAS AERUGINOSA EXOTOXIN A-INDUCED HEPATOTOXICITY IN DYNAMICS: AN ANIMAL MODEL IN WHITE MICE

A. V. Morrison — *Saratov State Medical University n.a. V. I. Razumovsky, Department of Skin and Venereal Diseases, Candidate of Medical Science; V. I. Popovich* — *Central Scientific Research Experimental Institute 33, Head of Department, Candidate of Medical Science; V. V. Morrison* — *Saratov State Medical University n.a. V. I. Razumovsky, Department of Pathological Physiology, Professor, Doctor of Medical Science.*

Дата поступления — 1.10.2015 г.

Дата принятия в печать — 10.12.2015 г.

Моррисон А. В., Попович В. И., Моррисон В. В. Гепатотоксическое действие синегнойного экзотоксина А у белых мышей в динамике интоксикации. *Саратовский научно-медицинский журнал* 2015; 11 (4): 526–529.

Цель: исследовать биохимические показатели периферической крови, отражающие функциональные органные изменения. **Материал и методы.** Эксперименты проведены на белых мышах в динамике развития синегнойной интоксикации, вызванной внутрибрюшинным введением различных доз экзотоксина А. **Результаты.** Обнаружены дозозависимые нарушения активности трансаминаз, α -ГБДГ, содержания белка, липидов и холестерина. Полученные данные свидетельствуют о гепатотропном действии синегнойного экзотоксина А, проявляющемся в изменении в крови биохимических маркеров функционального состояния печени. **Заключение.** Установлено выраженное гепатотоксическое действие экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa* во все сроки наблюдения, проявляющееся даже при воздействии сублетальных доз токсина.

Ключевые слова: синегнойная инфекция, экзотоксин А, гепатотоксическое действие.

Morrison AV, Popovich VI, Morrison VV. *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A-induced hepatotoxicity in dynamics: an animal model in white mice. *Saratov Journal of Medical Scientific Research* 2015; 11 (4): 526–529.

Purpose: to study biochemical indices of peripheral blood which show organs functional changes. **Material and Methods.** The experiments were carried out on white mice in dynamics development of *pseudomonas aeruginosa* caused by intraperitoneal injection of various dosage of exotoxin A. **Results.** The dosage-dependent disturbances in activity of transaminases, α -HBDH, in content of proteins, lipids and cholesterol were revealed. The received data have determined the hepatotoxic effect of *pseudomonas aeruginosa* exotoxin A on changes of biochemical blood markers of liver function. **Conclusion.** The expressed hepatotoxic effect of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A has been determined during all the phases of experiment even at sublethal toxin dose.

Key words: *pseudomonas aeruginosa* infection, exotoxin A, hepatotoxic effect.

Введение. Возрастающая роль синегнойной палочки как возбудителя госпитальных инфекций определяется не только достаточно высокой частотой ее распространения, но и тяжестью течения вызываемых ею заболеваний, трудностями в терапии вследствие низкой ее чувствительности к большинству антибиотиков. Ее возбудитель в ожоговых, онкологических, урологических стационарах нередко преобладает над грамположительными кокками [1–3].

В патогенезе синегнойной инфекции ведущим экстраклеточным фактором патогенности является экзотоксин А (ЭТ-А), отличающийся тропизмом ко многим органам и системам и обладающий во много сотен раз большей токсичностью, чем липополисахарид [4, 5]. ЭТ-А обладает как местным, так и системным действием. Гистологически выявляются клеточный некроз, геморрагические поражения легких, тубулярный некроз почек, уменьшается количество полиморфно-ядерных лейкоцитов, вызывается иммунотоксическое действие у белых мышей [6–9]. В основе молекулярного механизма действия ЭТ-А лежит ферментативный гидролиз никотинамидадинуклеотида (НАД) и рибозилирование фактора элонгации 2, что приводит к ингибированию белкового синтеза и апоптозу [3, 10].

В связи с этим для оценки развития патологического процесса при синегнойной инфекции немаловажное значение имеют экспериментальные данные комплексного исследования биохимических показателей периферической крови, отражающие функциональные органные изменения.

Материал и методы. Эксперименты проводили на половозрелых белых нелинейных мышах весом 25–30 г. Животные содержались на стандартной диете вивария и имели свободный доступ к воде.

Кровь забирали декапитацией через 1, 2 и 5 суток после внутрибрюшинного введения синегнойного экзотоксина А (ЭТ-А) в дозах 0,1LD₅₀, LD₅₀ и 5 LD₅₀ для мышей. Для определения биохимических показателей сыворотки собирали кровь от пяти мышей в одну пробирку, анализировали по пять образцов в каждой из десяти экспериментальных групп. Всего использовали 250 мышей. Сыворотку крови получали оса-

ждением кровавого сгустка центрифугированием при 900g в течение 10 минут.

В рамках эксперимента для определения степени повреждения печени в сыворотке определяли активность аланиновой (АЛТ) и аспарагиновой (АСТ) трансаминаз, α -гидроксибутиратдегидрогеназы (α -ГБДГ — изофермента лактатдегидрогеназы сердечной фракции), креатинкиназы (КК), лейцинаминопептидазы (ЛАП — фермента лизосомального происхождения), общее содержание белка, билирубина, липидов и холестерина стандартными методами с помощью наборов реактивов фирм «Boehringer», «Ciba-Corning», «Diasys» на двухлучевом спектрофотометре 557 фирмы «Hitachi» и фотометре 1101M фирмы «Eppendorf».

Обработку полученных результатов проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента. Критический уровень значимости критериев принимался равным 0,05.

Результаты. Исследование активности индикаторных (АЛТ, АСТ, α -ГБДГ, ЛАП) ферментов, общего билирубина, белка в крови при моделировании синегнойной интоксикации позволило провести сравнительную оценку выраженности нарушения функционального состояния гепатоцитов при введении различных доз ЭТ-А в динамике интоксикации.

Как видно из данных, представленных в таблице, активность АСТ возрастала в 7–8 раз только при введении сверхлетальной дозы ЭТ-А. Активность же АЛТ достоверно увеличивалась после введения токсина в дозах 0,1 и 1 LD₅₀ спустя 5 суток и начиная с первых суток при введении 5 LD₅₀. Диагностическое значение имеет не только содержание в крови АСТ и АЛТ само по себе, но и их соотношение — коэффициент Де Ритиса, который при экспериментальной синегнойной интоксикации возрос в несколько раз.

Известно, что активность трансаминаз, высвобождающихся при распаде структур гепатоцитов, должна рассматриваться в комплексе с активностью α -ГБДГ и КК. Активность α -ГБДГ возрастает уже на вторые сутки интоксикации даже при введении сублетальных доз ЭТ-А, а при введении 5 LD₅₀ уже через одни сутки. Гиперферментемия α -ГБДГ сохранялась до конца срока наблюдения.

Активность креатинкиназы повышается уже через сутки после введения всех изученных доз ЭТ-А и увеличивается по мере возрастания доз токсина.

Биохимические показатели сыворотки крови мышей после внутрибрюшинного синегнойного экзотоксина

Биохимический показатель, ед. измерения	Группа животных	Значение показателя в динамике интоксикации		
		1 сутки	2 суток	5 суток
АСТ, мкмоль/ (мин × л)	контроль	147±19		
	0,1LD ₅₀	129±3	163±9	272±56
	LD ₅₀	137±5	146±24	225±32
	5LD ₅₀	1026±168*	1208±153*	-
АЛТ, мкмоль/ (мин × л)	контроль	36±3		
	0,1LD ₅₀	39±3	41±8	71±9*
	LD ₅₀	65±15	50±10	71±5*
	5LD ₅₀	933±194*	754±129*	-
α — ГБДГ, мкмоль/ (мин × л)	контроль	245±23		
	0,1LD ₅₀	269±41	758±28*	1435±66*
	LD ₅₀	250±33	675±33*	1435±192*
	5LD ₅₀	1094±602*	3270±947*	-
КК, мкмоль/ (мин × л)	контроль	436±9		
	0,1LD ₅₀	691±70*	1215±60*	1919±276*
	LD ₅₀	1150±177*	1140±76*	1527±232*
	5LD ₅₀	1086±151*	1223±187*	-
ЛАП, мкмоль/ (мин × л)	контроль	11,3±1,0		
	0,1LD ₅₀	16±2	9±0,5	5±0,3*
	LD ₅₀	11±1	9±0,5	5±0,2*
	5LD ₅₀	15±2	11±1	-
Общие липиды, мг/дл	контроль	564±22		
	0,1LD ₅₀	599±22	432±12*	557±37
	LD ₅₀	523±19	531±53	466±12*
	5LD ₅₀	294±68*	338±49*	-
Холестерин, ммоль/л	контроль	1,3±0,1		
	0,1LD ₅₀	3,7±0,1*	3,1±0,1*	3,5±0,1*
	LD ₅₀	2,9±0,1*	1,0±0,1	1,0±0,1
	5LD ₅₀	2,3±0,2	2,6±0,2	-
Общий билирубин, мкмоль/л	контроль	4,1±0,8		
	0,1LD ₅₀	2,6±0,3	3,2±1,3	3,5±0,3
	LD ₅₀	5,9±0,9	1,6±0,3*	2,9±0,9
	5LD ₅₀	7,9±2,7	3,1±0,1	-
Общий белок, г/дл	контроль	5,2±0,17		
	0,1LD ₅₀	3,8±0,1*	3,5±0,1*	4,9±0,1
	LD ₅₀	5,1±0,1	5,3±0,2	3,4±0,3*
	5LD ₅₀	2,7±0,1*	2,4±0,1*	-

Примечание: данные представлены как среднее ± ошибка среднего; * — достоверность отличий показателей от контрольных по t-критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$. Набор показателей на пятые сутки для дозы 5 LD₅₀ отсутствует в связи с падежом особей данной группы.

Активность лейцинаминопептидазы (ЛАП) при развитии синегнойной интоксикации снижается только спустя 5 суток после введения ЭТ-А.

Таким образом, при синегнойной интоксикации отмечено многократное повышение цитолитических ферментов в сыворотке крови экспериментальных животных.

Исследование одного из ключевых показателей пигментного обмена — билирубина крови не выяви-

ло достоверного изменения его содержания даже при введении сверхлетальной дозы ЭТ-А.

Изменение липидного метаболизма у подопытных животных состояло в развитии выраженной гиперхолестеринемии, связанной с увеличением содержания общего холестерина.

Результаты исследования белкового обмена выявили выраженное нарушение белоксинтезирующей функции печени.

Обсуждение. Полученные данные свидетельствуют о значительных изменениях состояния гепатоцитов, проявляющихся в изменении содержания в крови биохимических маркеров функционального состояния печени, характеризующих повреждение клеток печени. Повреждение мембранных структур гепатоцитов подтверждается более выраженным увеличением активности АЛТ — фермента, характеризующегося цитоплазматической локализацией, в отличие от изменения активности АСТ, имеющей митохондриально-цитоплазматическую локализацию.

В настоящее время важным или даже ведущим патогенетическим фактором повреждения печени при действии различных токсикантов является повышение проницаемости мембран [11], дисбаланс между интенсивностью процессов свободно-радикального окисления и функциональной активностью антиоксидантных систем. Установлено, что при развитии экспериментальной синегнойной интоксикации имеет место активация процесса перекисного окисления липидов, о чем свидетельствует нарастание концентрации вторичных продуктов липопероксидации. В то же время в крови животных было выявлено уменьшение активности ферментов антиоксидантной защиты — супероксиддисмутазы и каталазы [12, 13].

Заключение. Установлено выраженное гепатотоксическое действие экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa* во все сроки наблюдения, проявляющееся даже при воздействии сублетальных доз токсина.

Конфликт интересов отсутствует.

References (Литература)

1. Rudnov VA, Belsky DV, Dekhnich FV, Research group of resuscitation department. Infections at Resuscitation departments in Russia: results of national multicenter research. *Clinical microbiology and microbial chemotherapy* 2011; 13 (4): 294–303. Russian (Руднов В.А., Бельский Д.В., Дехнич Ф.В., исследовательская группа РИОРИТА. Инфекции в ОРИТ России: результаты национального многоцентрового исследования. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия* 2011; 13 (4): 294–303).
2. Reshedko GK, Ryabkova EL, Krechnikova OI, et al. Resistency to antibiotics of gram-negative agents of nosocomial infections at resuscitation department in general hospitals of Russia. *Clinical microbiology and microbial chemotherapy*. 2008; (10): 96–112. Russian (Решедько Г.К., Рябкова Е.Л., Кречникова О.И. и др. Резистентность к антибиотикам грамотрицательных возбудителей нозокомиальных инфекций в ОРИТ многопрофильных стационаров России. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия* 2008; (10): 96–112).
3. Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs* 2007; 67 (3): 351–368.
4. Miyazaki S, Matsumoto T, Tateda K, et al. Role of exotoxin A in inducing severe *Pseudomonas aeruginosa* infections in mice. *J Med Microbiol* 1995; 43 (3): 169–175.
5. Nikbin VS, Aslani MM, Sharafi Z, et al. Molecular identification and detection of virulence genes among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different infectious origins. *Iran J Microbiol* 2012; 4 (3): 118–123.
6. Morrison VV, Morrison AV. Qualitative and quantitative changes of cellular composition of peripheral blood in experimental animals effected by *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin. *Fundamental research* 2008; (4): 19–25. Russian (Моррисон В.В., Моррисон А.В. Количественные и качественные изменения клеточного состава периферической крови экспериментальных животных при действии синегнойного экзотоксина. *Фундаментальные исследования* 2008; (4): 19–25).
7. Morrison AV, Popovich VI, Morrison VV. Immunotoxic effects of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A in white mice. *Modern advances of natural sciences* 2015; 1 (6): 966–968. Russian (Моррисон А.В., Попович В.И., Моррисон В.В. Иммунотоксические эффекты экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa* у белых мышей. *Успехи современного естествознания* 2015; 1 (6): 966–968).
8. Borkar DS, Fleiszig SM, Leong C, et al. Association between cytotoxic and invasive *Pseudomonas aeruginosa* and clinical outcomes in bacterial keratitis. *JAMA Ophthalmol* 2013; 131 (2): 147–153.
9. Chiu CC, Chen HH, Chuang HL, et al. *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A-induced hepatotoxicity: an animal model in rats. *J Vet Med Sci* 2009; 71 (1): 1–8.
10. Tafesse FG, Guimaraes CP, Maruyama T, et al. GPR107, a G-protein-coupled Receptor Essential for Intoxication by *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A, Localizes to the Golgi and Is Cleaved by Furin. *J Biol Chem* 2014; 289 (35): 24005–24018.
11. Alhazmi Allaa *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis and pathogenetic mechanisms. *Int J Biol* 2015; 7 (2): 44–67.
12. Morrison VV, Kudin GB, Nefedova NA. The state of processes of lipid peroxidation and antioxidant system in experimental *pseudomonas aeruginosa* intoxication in dynamics. *Anesthesiology and Emergency medicine* 2000; 3: 41–43. Russian (Моррисон В.В., Кудин Г.Б., Неведова Н.А. Состояние процессов перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы в динамике экспериментальной синегнойной интоксикации. *Анестезиология и реаниматология* 2000; (3): 41–43).
13. Morrison VV, Morrison AV. The changes in lipid peroxidation and the state of antioxidant system in experimental *Pseudomonas aeruginosa* intoxication dynamics. In: *Oxygen and antioxidants*. Volgograd, 2009; Vol. 1. P. 91–92. Russian (Моррисон В.В., Моррисон А.В. Изменение перекисного окисления липидов и состояние антиоксидантной системы в динамике экспериментальной синегнойной интоксикации. В кн.: *Кислород и антиоксиданты*. Волгоград, 2009; Т. 1, с. 91–92).