

УДК 612.017.1-02:579.841.11

ИММУНОТОКСИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ЭКЗОТОКСИНА A PSEUDOMONAS AERUGINOSA У БЕЛЫХ МЫШЕЙ

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

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

В экспериментах на белых мышах в динамике синегнойной интоксикации (1, 2, 5 суток) изучено иммунотоксическое действие различных доз (0,1, 1,0 и 5,0 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, катионных белков в нейтрофилах. Установлено, что имеется дозозависимый эффект ЭТ-А, заключающийся в изменении массы и клеточного состава лимфоидных органов, падении содержания катионных белков нейтрофилов у нелинейных белых мышей во все сроки наблюдения.

Ключевые слова: синегнойный экзотоксин А, масса и клеточный состав лимфоидных органов, лизосомально-катионный тест

IMMUNOTOXIC EFFECT OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA EXOTOXIN A ON WHITE MICE

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; 5,0 LD₅₀) of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A has been determined in dynamics of intoxication process. The experiments have been held on white mice 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, and cation proteins of neutrophils. The dose dependant effect of exotoxin A has been found out. It resulted in the changes of mass and cellular composition of lymphoid organs, decrease in cation proteins of neutrophils concentration in white mice in any period of the study.

Keywords: *Pseudomonas* infection, exotoxin A, mass and cellular composition of lymphoid organs, lysosome-cation test

В последние годы отмечено увеличение инфекций, вызываемых синегнойной палочкой, продуцирующей различные факторы патогенности. Нозокомиальные инфекции, обусловленные *Pseudomonas aeruginosa*, ассоциируются с высоким уровнем смертности, значительно превышающим таковой для инфекций, вызванных другими бактериальными патогенами, сложностями в антимикробной терапии [1,3,13]. Наиболее сильнодействующим фактором патогенности *Pseudomonas aeruginosa* признан экзотоксин А (ЭТ-А): его токсичность (LD₅₀) для мышей, по различным данным, составляет от 2,3 мкг/кг до 7 мкг/кг [5-7]. Смерть животных при внутрибрюшинном введении токсина наблюдается в течение 5 дней [2, 10].

Установлено, что синегнойный экзотоксин А обладает тропизмом ко многим жизненно важным органам и системам, вызывая в них цитотоксический эффект. При действии его на клетки эукариот наблюдается набухание митохондрий, повышение проницаемости мембран и нарушение транспорта электронов в цитохромной системе. В опытах *in vivo* обнаружено, что экзотоксин уменьшает поглощение кислорода клетками

почек и повышает – клетками печени [4,7]. Однако эти изменения являются вторичными, так как главным нарушением, приводящим к гибели изолированных клеток или организма животного, является нарушение синтеза белка. Впервые это установлено О.Р. Павловским, 1974 [9] и подтверждено многими исследователями [4,7,12].

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:

$$\text{НАД} + \text{токсин АДФР} + \text{никотинамид} + \text{H}^+$$

$$\text{НАД} + \text{токсин} + \text{ФЭ-2 АДФР-ФЭ-2} + \\ + \text{никотинамид} + \text{H}$$

При этом комплекс АДФР-ФЭ-2 становится неактивным и не может участвовать в синтезе белка.

Система факторов естественной защиты оказывает решающее влияние на генерализацию синегнойной инфекции, во многом определяя течение и исход заболевания.

В этой связи представляется важным выяснить влияние экзотоксина *A Pseudomonas aeruginosa* на некоторые показатели естественного иммунитета.

Материалы и методы исследования

Эксперименты проведены на 110 половозрелых белых нелинейных мышах весом 25-30 г. через 1, 2 и 5 суток после внутрибрюшинного введения экзотоксина в дозах 0,1LD₅₀, 1,0 LD₅₀ и 5,0 LD₅₀. Животные содержались на стандартной диете вивария и имели свободный доступ к воде. для анализа ткани у мышей забирали декапитацией.

Оценку иммунного статуса нелинейных мышей проводили по показателям массы лимфоидных органов (тимуса и селезенки) и количеству лимфоцитов в них, концентрации циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови, по состоянию неспецифической резистентности животных, которое оценивалось по изменению смертности отравленных экзотоксином животных после введения им кишечной палочки в количестве, вызывающем в контроле 20% смертность

и количеству катионных белков в нейтрофилах на основании лизосомально-катионного теста (ЛКТ).

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты исследования иммунного статуса нелинейных мышей представлены в таблице. Из данных таблицы видно, что уже на первые сутки интоксикации отмечаются достоверные изменения массы и клеточного состава лимфоидных органов. В это время наибольшие отклонения показателей от контрольных значений отмечаются в селезенке. В дальнейшем (на 2 и 5 сутки интоксикации) резко снижается количество лимфоцитов в тимусе, что свидетельствует о глубоком угнетении клеточного звена иммунной системы, что особенно заметно при введении животным больших доз экзотоксина (1 и 5 LD₅₀).

Иммунотоксические свойства экзотоксина *A Pseudomonas aeruginosa* для нелинейных мышей при его внутрибрюшинном воздействии в различных дозах

Иммунологический показатель, ед. измерения	Группа животных	Значение показателя в динамике интоксикации		
		1 сутки	2 суток	5 суток
Масса тимуса, г.	контроль	0,0370,004		
	0,1LD ₅₀	0,0480,015	0,0620,013	0,0520,008
	LD ₅₀	0,0460,006	0,050 0,014	0,0410,002
	5LD ₅₀	0,0570,014	0,0450,006*	-
Количество лимфоцитов в тимусе, млн.	контроль	13,12,5		
	0,1LD ₅₀	21,85,7	22,02,1	27,51,1*
	LD ₅₀	36,87,3*	7,62,4*	5,81,6*
	5LD ₅₀	11,42,3	8,02,5	-
Масса селезенки, г.	контроль	0,2250,018		
	0,1LD ₅₀	0,1330,018*	0,1960,027	0,2130,027
	LD ₅₀	0,1450,019	0,510,020*	0,2440,052
	5LD ₅₀	0,1240,023*	0,1660,017	-
Количество лимфоцитов в селезенке, млн.	контроль	52,14,9		
	0,1LD ₅₀	40,43,6*	54,64,8	39,82,1*
	LD ₅₀	39,84,6*	41,45,7	39,04,5*
	5LD ₅₀	59,616,1	55,06,1	-
ЦИК, компл./100 мл	контроль	105,619,2		
	0,1LD ₅₀	74,310,3	55,210,8*	47,217,5*
	LD ₅₀	100,00,20	91,828,6	78,235,7
	5LD ₅₀	56,720,6	77,561,4	-
ЛКТ, ед	контроль	1,58 ± 0,14		
	0,1LD ₅₀	1,02±0,1	1,08 ± 0,15*	1,31 ± 0,20
	LD ₅₀	0,43 ± 0,12*	0,96 ± 0,09*	1,10 ± 0,13*
	5LD ₅₀	0,27 ± 0,06*	0,13 ± 0,04*	-
Смертность после введения <i>E.coli</i>	контроль	21	21	21
	0,1LD ₅₀	0	50	75
	LD ₅₀	33	84	80
	5LD ₅₀	100	84	-

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 5LD₅₀ отсутствует в связи с падежом особей данной группы. Каждая группа включала 10 животных.

Во все сроки наблюдения происходит резкое дозозависимое снижение неспецифической резистентности организма, определяемое как увеличение смертности подопытных животных после введения им кишечной палочки. Наибольшие изменения резистентности организма наблюдаются на 2 и 5 сутки интоксикации, причем они отмечаются в эти сроки во всем исследованном интервале доз токсина (от 0,1 до 5 LD₅₀).

Анализ корреляционных связей между исследованными показателями иммунной системы показал наличие линейной зависимости между количеством лимфоцитов в тимусе и смертностью животных, которым вводили кишечную палочку ($r=0,80$, $F=9,33$).

Известно, что уровень катионных белков позволяет оценить активность кислороднезависимого механизма бактерицидности нейтрофильных гранулоцитов и является показателем резистентности организма к инфекциям. Как видно из табл., при введении больших доз ЭТ-А имеются значительное дозо- и времязависимое падение уровня катионных белков нейтрофилов. Так через 2 суток после введения ЭТ-А в дозе равной 5LD₅₀ содержание катионных белков уменьшилось в 12 раз. Падение ЛКТ принято считать неблагоприятным прогностическим признаком при различного рода тяжелых инфекционных заболеваниях и химических интоксикациях.

Наименее выражено изменение концентрации циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови экспериментальных животных, наблюдающееся только при введении малых доз экзотоксина.

Таким образом, при воздействии на организм нелинейных мышей экзотоксина А синегнойной палочки наблюдаются значимые нарушения функционирования иммунной системы. Проведенные исследования свидетельствуют о глубине поражения

клеточного звена иммунной системы, что подтверждает ранее полученные данные [8,10,11]. Особенно следует отметить стойкое снижение неспецифической резистентности организма биообъектов во все сроки наблюдения, проявляющееся даже при воздействии сублетальных доз исследуемого токсина.

Список литературы

1. Руднов В.А., Бельский Д.В., Дехнич Ф.В., исследовательская группа РИОРИТа. Инфекции в ОРИТ России: результаты национального многоцентрового исследования // Клини. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2011. – Т. 13. № 4. – С. 294-303.
2. Синегнойная инфекция / А.Ф. Мороз, Н.Г. Анциферова, Н.В. Баскакова; Под ред. А.Ф. Мороз – М.: Медицина, 1988. – 256 с.;
3. Chastre J., Trouillet J.L. Problem pathogens (*Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter*) // *Semin. Respir. Infect.* 2000. Vol. 15. P. 287-298.
4. Deng Q., Barbieri J.T. Molecular mechanisms of the cytotoxicity of ADP-ribosylating toxins // *Annu. Rev. Microbiol.* 2008. Vol. 62. P. 271-288.
5. Essam F., Al-Jumaily, Bushra H. Saleh, Shalal M. Hussain Determination of lethal dose (LD50) of Exotoxin A from *Pseudomonas aeruginosa* 26A in mice histopathology // *IOSR J. Pharm. Biol. Sci.* 2013. Vol.7. Issue 6. P. 49-54.
6. 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. V ol. 43. N 3. P. 169-175.
7. Morlon-Guyot J., Méré J., Bonhoure A., Beaumelle B. Processing of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A is dispensable for cell intoxication // *Infect. Immun.* 2009. Vol. 77. N 7. P. 3090-3099.
8. Mühlen K.A., Schümann J., Wittke F., Stenger S., Van Rooijen N., Van Kaer L., Tiegs G. NK cells, but not NKT cells, are involved in *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A-induced hepatotoxicity in mice // *J. Immunol.* 2004. Vol. 172. N 5. P.3034-3041.
9. Pavlovskis O.R., Shackelford A.H. *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin in mice: localization and effect on protein synthesis // *Infect. Immun.* 1974. Vol. 9. N 3. P. 540-546.
10. Pollack M. The role of exotoxin A in *Pseudomonas* disease and immunity // *Rev. infect. Dis.* 1983. Vol. 5. P. 878-984.
11. 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.
12. Wretling B., Pavlovski O.R. The role of proteases and exotoxin A in the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* infections // *Scand. J. Infect. Dis.* 1981. Suppl. 29. P.13-19.
13. Zar H.J., Cotton M.F. Nosocomial pneumonia in pediatric patients: practical problems and rational solutions // *Paediatr. Drugs.* 2002. Vol. 4. N 2. P. 73-83.