

Г.А.Афанасьева¹, Н.П.Чеснокова¹, В.В.Кутырев², Г.Н.Маслякова¹, Ю.Ф.Хоркин¹**О РОЛИ АКТИВАЦИИ ПРОЦЕССОВ ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ
В СТРУКТУРНОЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ДЕЗОРГАНИЗАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ
В ДИНАМИКЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЭНДОТОКСИКОЗА**¹ГОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет»,²ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Целью настоящей работы явилось изучение патогенетической взаимосвязи выраженности патоморфологических проявлений и изменений активности процессов липопероксидации в органах, участвующих в инактивации и элиминации токсинов (печени, почках, кишечнике) в динамике эндотоксикоза, достигаемого введением ЛПС *Yersinia pestis*. Обнаружены выраженные дистрофические, некробиотические изменения, а также нарушения микроциркуляции в изучаемых органах, сочетающиеся с накоплением продуктов липопероксидации в гомогенатах и крови, коррелирующие с тяжестью клинических проявлений патологии. Полученные результаты позволяют предположить, что эфферентным звеном цитопатогенных эффектов ЛПС чумного микроба является активация свободнорадикального окисления в динамике чумной интоксикации.

Ключевые слова: *Y. pestis*, ЛПС, эндотоксикоз, липопероксидация.

Как известно, липополисахариды (ЛПС) – высокореактогенные компоненты эндотоксинов грамотрицательных бактерий, интенсивное исследование которых связано, с одной стороны, с их ведущей ролью в патогенезе ряда инфекций, а с другой стороны, перспективами использования этого биополимера для диагностики и профилактики инфекционных заболеваний. Являясь одним из основных компонентов наружной мембраны клеточной оболочки грамотрицательных бактерий, ЛПС находятся в тесном контакте с мембранными белками и обеспечивают стабильность мембраны, ее селективную проницаемость и межклеточные взаимодействия [5, 6, 9, 12].

В настоящее время установлена гетерогенность клеточноопосредованных системных эффектов эндотоксина. Так, основными биологическими свойствами ЛПС, обуславливающими системные проявления эндотоксикоза, являются токсичность, пирогенное действие, способность вызывать местный и генерализованный феномен Шварцмана, активировать продукцию белков острой фазы воспаления, обеспечивать развитие гиперлипидемии и диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови. Для системной эндотоксемии характерна сердечная недостаточность многофакторного генеза, которая обуславливает значительные нарушения кровотока в различных органах и тканях. Наиболее тяжелой клинической формой эндотоксикоза является шок [6, 9].

Ведущая роль в патогенезе чумы, как и ряда других заболеваний, индуцируемых грамотрицательными бактериями, принадлежит именно ЛПС. ЛПС *Y. pestis* выделяется во внеклеточную среду в основном при разрушении бактериальных клеток. Анализ данных литературы свидетельствует о множествен-

ности клеточных акцепторов ЛПС чумного микроба и разнообразии посредников, участвующих в реализации системных эффектов эндотоксина. Мишенями для эндотоксина являются клеточные элементы различных органов и тканей, в частности клетки крови, эндотелий сосудов [5, 9, 14, 15].

Рецепция эндотоксина может носить неспецифический характер, однако на поверхности клеток имеются и специфические для эндотоксина белковые рецепторы CD14, CD18, CD54, Toll-рецепторы и другие [9, 14, 15].

В настоящее время очевидно, что на высоте развития клинических проявлений чумной инфекции и интоксикации формируются такие типовые патологические процессы, как воспаление, лихорадка, нарушения кислотно-основного и электролитного баланса, гипоксия. В то же время развиваются геморрагический синдром, а также выраженные расстройства регионарного кровотока и микроциркуляции, определяющие в целом формирование полиорганной недостаточности и исход заболевания.

Установлено, что гипоксический синдром при чумной инфекции и интоксикации имеет сложный генез, включая циркуляторную, дыхательную, гемическую и тканевую гипоксию [6, 12]. Эфферентным звеном гипоксического некробиоза тканей является активация свободнорадикальной дезорганизации биологических мембран клеток [1–3, 8, 10, 12]. Между тем, до настоящего момента не систематизированы сведения о роли активации процессов липопероксидации (ЛПО) в развитии структурно-функциональных нарушений в различных органах и тканях при эндотоксикозе.

В связи с вышеизложенным, целью настоящей

работы явилось изучение патогенетической взаимосвязи степени выраженности патоморфологических проявлений в печени, почках и тонком кишечнике, то есть в органах, обеспечивающих элиминацию бактериальных токсинов из системного кровотока с изменением состояния ЛПО и антирадикальной защиты клеток различной морфо-функциональной организации.

Материал и методы

Исследования проведены на стадиях ранних и выраженных клинических проявлений чумной интоксикации, развивающихся соответственно спустя 1,5–2,0 и 4,0 ч после внутрибрюшинного введения беспородным белым мышам обоего пола массой 18–20 г ЛПС чумного микроба штамма 358/12 в дозе, эквивалентной ЛД₅₀. ЛПС получен в ФГУЗ «Российский НИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора. Материал от 40 мышей, использованных в экспериментах, получали после декапитации животных в лабораторных условиях в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

В различных вариантах моделирования бактериального эндотоксикоза проведена сравнительная оценка патоморфологии паренхиматозных элементов и микроциркуляторного русла в печени, почках, кишечнике, участвующих в инактивации и элиминации токсинов, а также состояния процессов ЛПО тех же органов. Морфологические исследования проводились с использованием стандартных методов фиксации и проводки материала. Срезы окрашивались гематоксилином и эозином.

Для оценки активности процессов ЛПО крови и тканей исследовали содержание гидроперекисей липидов (ГПЛ) и малонового диальдегида (МДА) в плазме крови, эритроцитах и гомогенатах органов общепринятыми спектрофотометрическими методами [11]. Одновременно изучали состояние ферментного и неферментного звеньев антиоксидантной системы (АОС): определяли активность супероксиддисмутазы (СОД) в цельной крови и гомогенатах печени, почек и кишечника, активность каталазы и содержание α -токоферола в плазме крови, эритроцитах и гомогенатах указанных органов [4, 7, 13].

Результаты проведенных экспериментов обработаны параметрическим статистическим методом с использованием стандартных компьютерных программ (Microsoft «XL», «Statgraphics 5,0») с расчетом средней арифметической, критерия Стьюдента, достоверности различий.

Результаты исследования и их обсуждение

Оценка метаболического статуса и патоморфологии органов проведена в динамике интоксикации. Как оказалось, уже на стадии ранних клинических проявлений, то есть спустя 2 ч после введения ЛПС

белым мышам, в печени возникали выраженные изменения микроциркуляторного русла, характеризующиеся развитием ишемии и, соответственно, ишемического стаза. В то же время на фоне сохраненной балочной структуры долек появлялись признаки слабой пролиферации ретикулоэндотелиальных элементов, в цитоплазме определялась зернистость, хроматин в ядрах гепатоцитов становился «пылевидным».

В указанный период интоксикации отмечалось неравномерное кровенаполнение клубочков почек: сочетание полнокровия одних и малокровия других на фоне сохранения их структуры. В эпителии дистальных канальцев и собирательных трубочек обнаруживались явления зернистой и гидropической дистрофии.

В срезах препаратов тонкого кишечника определялись некроз и десквамация эпителия слизистой оболочки, умеренная инфильтрация лимфоцитами стромы ворсин, гиперплазия лимфоидных фолликулов. Указанные патоморфологические изменения сочетались с ишемией всех слоев стенки и развитием ишемического стаза.

Таким образом, результаты проведенных исследований позволяют заключить, что на ранней стадии чумной интоксикации в печени, почках и кишечнике возникают выраженные изменения тонуса сосудов в виде сочетания спазма и участков вазодилатации, а также развитие ишемического стаза и дистрофических изменений в органоспецифических элементах. Обнаруженные факты, безусловно, свидетельствуют о раннем формировании циркуляторной гипоксии в органах, обеспечивающих инактивацию и элиминацию токсина, а также о возможности образования активных форм кислорода в динамике гипоксического синдрома.

В связи с этим, представлялось целесообразным установить значение активации процессов ЛПО в механизмах опосредования цитопатогенных эффектов эндотоксина *Y. pestis* в указанный период интоксикации. Результаты проведенных экспериментов позволили выявить общую закономерность метаболических сдвигов в органах и тканях различной морфофункциональной организации в ранний период интоксикации. Последняя заключалась в чрезмерном накоплении продуктов ЛПО в крови и гомогенатах изучаемых органов (таблица, рис. 1).

Полученные результаты делали очевидной необходимость установления патогенетической значимости недостаточности механизмов антиоксидантной защиты крови и тканей в патогенезе свободнорадикальной дезорганизации клеток различных органов и тканей.

Как показали результаты проведенных экспериментов, имело место снижение активности СОД только в гомогенатах почек ($p < 0,001$). Как известно, все разновидности СОД, различаясь по строению активного центра и полипептидной цепи, являются металлоферментными факторами АОС, инактивирующими супероксидный анион-радикал в реакции

Содержание продуктов липопероксидации
в крови белых мышей при острой ЛПС-интоксикации
(ЛПС в дозе, эквивалентной ЛД₅₀)

Показатели	Контроль	Стадии интоксикации	
		ранняя	выраженных клинических проявлений
	M±m	M±m	M±m
МДА (плазма), мкмоль/мл	0,89±0,03	1,14±0,04*	1,24±0,05*
МДА (эритроциты), мкмоль/мл	2,23±0,03	5,57±0,2*	6,35±0,17*
ГПЛ (плазма), Ед/ мл	1,55±0,05	1,66±0,06	3,58±0,04*
ГПЛ (эритроциты), Ед/мл	21,2±0,4	37,3±0,7*	48,3±2,0*

* Достоверные различия с соответствующими показателями контрольной серии ($p < 0,001$). Во всех сериях экспериментов $n = 15-20$.

дисмутации с образованием перекиси водорода [13].

В то же время в гомогенатах всех изучаемых органов имело место снижение активности каталазы ($p < 0,001$), которая разлагает перекись водорода [7]. СОД и каталаза представляют собой единую сбалансированную ферментную систему антирадикальной защиты клеток.

В сериях экспериментов по изучению содержания α -токоферола – одного из неферментных антирадикальных факторов, способных нейтрализовать кислородные радикалы на этапах продолжения и разветвления цепей свободнорадикального окисления – было обнаружено уменьшение его уровня в плазме крови ($p < 0,001$), эритроцитах ($p < 0,001$), а также в гомогенатах почек ($p < 0,001$) и тонкого кишечника ($p < 0,001$) (рис. 2).

Касаясь значимости выявленного нами феномена активации процессов ЛПО, следует отметить, что избыточное накопление ГПЛ и МДА в крови, печени, почках, кишечнике на фоне недостаточности ферментного и неферментного звеньев АОС являет-

ся весомым механизмом дезорганизации липидных компонентов биологических мембран клеток и субклеточных структур. Причем, как известно, активация ЛПО носит неспецифический характер и, по всей вероятности, является ведущим патогенетическим фактором развития нарушений микроциркуляции, эндотелиальной дисфункции, а также гипоксической дистрофии и некробиоза тканей при условии недостаточности антирадикальной защиты клеток.

Последующие эксперименты, проведенные по мере прогрессирования интоксикации спустя 4 ч после введения ЛПС белым мышам, свидетельствовали об усилении расстройств микроциркуляции, дистрофии и некроза в изучаемых органах и тканях. Выраженные расстройства кровотока отмечались в ткани почек, где в мозговом веществе ишемический стаз сопровождался появлением мелких и крупных полей некроза, а в корковом веществе чередовались участки малокровных и полнокровных венул. В этом звене микроциркуляторного русла развивалась агрегация эритроцитов. В корковом слое наряду с сохранившимися встречались спавшиеся сосудистые клубочки. В сохранившихся клубочках отмечено значительное повреждение внутренней стенки микрососудов: отек и набухание эндотелиальных клеток, их вакуолизация и десквамация, что отражает реакцию эндотелия на действия эндотоксина.

В период выраженных клинических проявлений интоксикации в паренхиме печени обнаруживались расстройства микроциркуляции в виде умеренного венозного полнокровия центральных вен, отека с расширением пространств Диссе. Нарушения микроциркуляции в ткани печени сопровождалась появлением отдельных некротизированных гепатоцитов.

В стенке кишечника обнаружено малокровие, причем сосуды были в состоянии умеренного спазма, не содержали форменных элементов крови. В срезах препаратов кишечника наблюдались признаки повышенной проницаемости сосудов, десквамация эн-

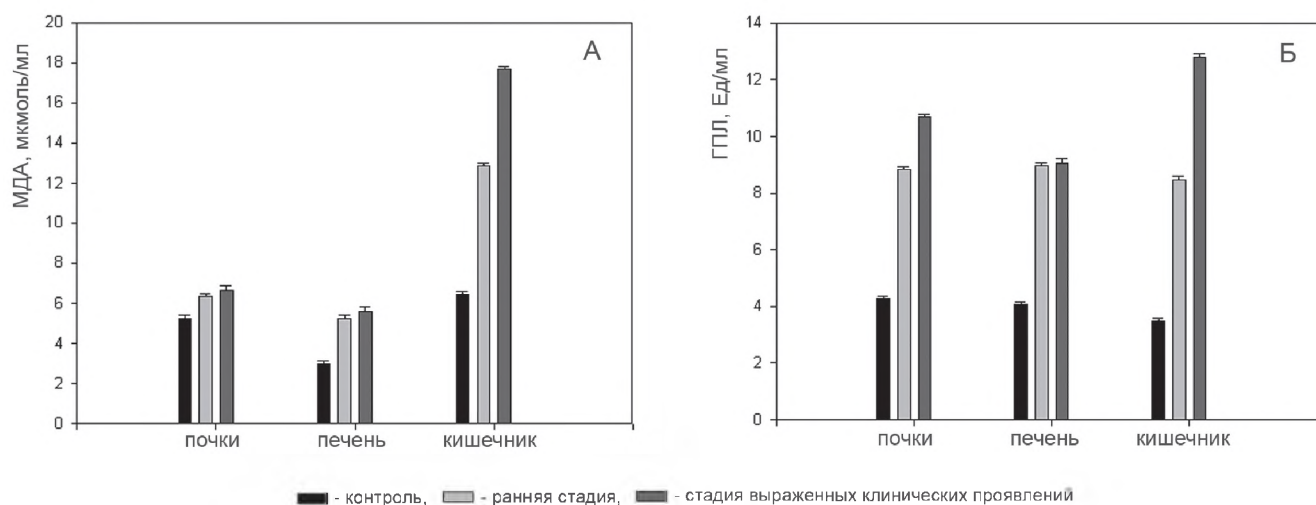


Рис. 1. Изменения содержания малонового диальдегида (А) и гидроперекисей липидов (Б) в гомогенатах органов белых мышей в динамике острой ЛПС-интоксикации

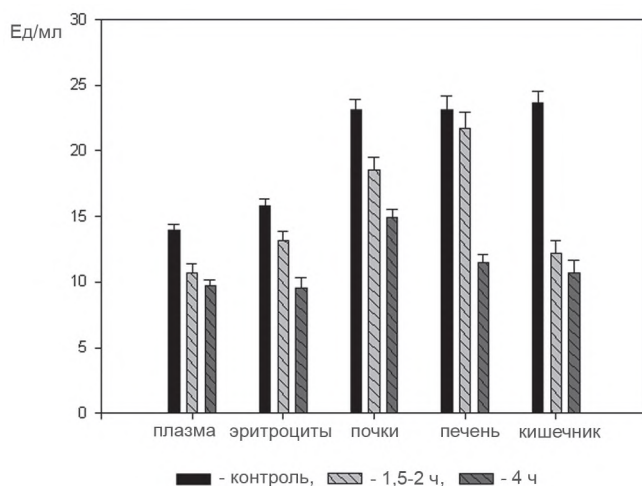


Рис. 2. Содержание α -токоферола в крови и гомогенатах тканей в динамике чумной ЛПС-интоксикации (ЛПС в дозе, эквивалентной ЛД₅₀)

дотелиоцитов, явления сладжа, агрегации и адгезии форменных элементов в микрососудах. В слизистой оболочке кишечника отмечались некротические изменения в апикальных отделах ворсин, умеренная лимфоцитарная инфильтрация их стромы.

Обнаруженные нами расстройства микроциркуляции, дистрофические и некротические изменения в тканях на стадии выраженных клинических проявлений интоксикации, как и на более ранней стадии, сочетались с активацией процессов ЛПО. Об этом свидетельствовало избыточное накопление ГПЛ и МДА в крови и гомогенатах тканей. Причем содержание МДА в эритроцитах и ГПЛ в плазме крови и эритроцитах прогрессирующе нарастало по сравнению с таковым в ранний период интоксикации (таблица). В почках уровень МДА оставался высоким, как и на предыдущей стадии интоксикации, а ГПЛ – прогрессирующе нарастал. В гомогенатах печени спустя 4 ч после введения токсина экспериментальным животным сохранялось чрезмерно высокое содержание промежуточных продуктов ЛПО, как и на стадии ранних клинических проявлений (рис. 1). Между тем, наиболее выраженное прогрессирующее накопление ГПЛ и МДА отмечалось в гомогенатах кишечника.

Одновременно усугублялась и недостаточность АОС: прогрессирующе снижалась активность СОД крови ($p < 0,001$). Аналогичная недостаточность активности указанного фермента отмечалось в гомогенатах печени ($p < 0,001$) и кишечника ($p < 0,001$) как по сравнению с предыдущей стадией интоксикации, так и по сравнению с показателями контрольной группы животных. Причем, в гомогенатах почек обнаруживалась корреляция тяжести интоксикации и прогрессирующего снижения активности СОД ($p < 0,001$). Результаты экспериментов свидетельствовали также о прогрессирующей абсолютной недостаточности каталазы в гомогенатах всех исследованных органов

($p < 0,001$). При одновременном исследовании неферментного звена АОС обнаружено низкое содержание α -токоферола в плазме крови ($p < 0,001$), гомогенатах печени ($p < 0,001$) и тонкого кишечника ($p < 0,001$). Обнаружена коррелятивная взаимосвязь между углублением тяжести клинических проявлений интоксикации и прогрессирующим снижением уровня α -токоферола в эритроцитарной массе ($p < 0,001$) и гомогенатах почек ($p < 0,001$) (рис. 2).

Полученные нами результаты позволяют заключить, что в динамике чумной интоксикации, достигаемой введением ЛПС *Y. pestis* в дозе, эквивалентной ЛД₅₀, возникают выраженные изменения в микроциркуляторном русле и органоспецифических элементах органов и тканей, участвующих в инактивации и элиминации токсина, коррелирующие с тяжестью клинических проявлений патологии, избыточным накоплением продуктов ЛПО и недостаточностью механизмов антиоксидантной защиты.

Активация ЛПО является одним из признаков усиленного образования активных форм кислорода (синглетного кислорода, гидроксильных и супероксидных анион-радикалов, перекиси водорода и др.) и свободнорадикальной дезинтеграции биомембран. Образование свободных радикалов в условиях циркуляторной гипоксии, сопровождающей развитие эндотоксикоза при чумной интоксикации, может быть обеспечено утечкой электронов из дыхательной цепи митохондрий, в связи с их набуханием и образованием активных форм кислорода в процессе одно- и трехэлектронного его восстановления [8, 10, 12].

Вышеизложенное позволяет заключить, что активация процессов ЛПО в условиях недостаточности ферментного и неферментного звеньев АОС при чумной ЛПС-интоксикации, по всей вероятности, являются одними из ведущих патогенетических факторов развития нарушений микроциркуляции, гипоксической дистрофии и некробиоза в различных тканях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Афанасьева Г.А., Чеснокова Н.П. О новых объективных критериях оценки степени тяжести чумной интоксикации. Паллиативная медицина и реабилитация. 2006; 2:6.
2. Афанасьева Г.А., Чеснокова Н.П. О роли активации процессов перекисного окисления липидов в патогенезе бактериального эндотоксикоза. Фундаментальные исследования. 2008; 3:53–6.
3. Афанасьева Г.А., Чеснокова Н.П., Будник И.А. О патогенетической значимости активации процессов липопероксидации в механизмах нарушений реологических свойств крови при бактериальном эндотоксикозе. Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. 2008; 1:3–8.
4. Габриэлян Н.И., Левцкий Э.Г., Щербакова О.И. Методы определения витамина Е в сыворотке крови. Тер. архив. 1983; 6:76–8.
5. Дальвадянц С.М., Белобородов Р.А. Изучение токсических свойств антигена, изолированного из чумного микроба по методу Вестфал-Людеритца. Пробл. особо опасных инф. 1969; 2(6):138–42.
6. Домарадский И.В. Чума. М.: Медицина; 1998.
7. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. и др. Метод определения активности каталазы. Лаб. дело. 1988; 1:16–9.
8. Ленинджер А. Молекулярные основы структуры и функ-

ции клетки. Биохимия. М.: Мир; 1999. С. 390–422.

9. Рябиченко Е.В., Бондаренко В.М. Роль кишечной бактериальной микрофлоры и ее эндотоксина в патологии человека. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2007; 3:103–11.

10. Скулачев В.П. Явления запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: роль активных форм кислорода. Соровский Образовательный Журнал. 2001; 7(6):4–10.

11. Сулотов С.Н., Баркова Э.Н. Суточные и сезонные ритмы перекисей липидов и активности супероксиддисмутазы в эритроцитах у жителей средних широт и крайнего Севера. Лаб. дело. 1986; 8:459–63.

12. Чеснокова Н.П., Моррисон В.В., Бриль Г.Е. и др. Инфекционный процесс. М.: Академия естествознания; 2006.

13. Fried R. Enzymatic and non-enzymatic assay of Superoxide Dismutase. Biochimie. 1975; 57:657–60.

14. Heumann D. CD14 and LPB in endotoxemia and infections caused by Gram-negative bacteria. J. Endotox. Res. 2001; 7(6):439–41.

15. Savidge T.C., Newman P.G., Pan W.H. Lipopolysaccharide-induced human enterocyte tolerance to cytokine mediated interleukin-8 production may occur independently of TLR-4/MD-2 signaling. Pediatr. Res. 2006; 59(1):89–95.

Об авторах:

Афанасьева Г.А., Чеснокова Н.П., Маслякова Г.Н., Хоркин Ю.Ф. Саратовский государственный медицинский университет. 410012, Саратов, ул. Б. Казачья, д. 112. Тел. (845-2) 66-97-91. E-mail: gafanaseva@yandex.ru

Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, д. 46. Тел. (845-2) 26-21-31. E-mail: microbe@san.ru

G.A.Afanasieva, N.P.Chesnokova, V.V.Kutyrev, G.N.Maslyakova, Yu.F.Khorkin

The Role of Lipoperoxidation Processes in Structural and Functional Disorganization of Biological Systems in Dynamics of Bacterial Endotoxemia

Saratov State Medical University, Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov

The purpose of the study was to investigate the pathogenetic interrelation between the intensity of lipoperoxidation and pathomorphological changes in organs that are responsible for toxin inactivation and elimination (liver, kidneys, bowels) in dynamics of intoxication caused by *Yersinia pestis* lipopolysaccharide (LPS). We have demonstrated that dystrophic and necrobiotic changes as well as microcirculation disturbances in the organs progressed as lipoperoxidation products in homogenates and blood accumulated. Noted abnormalities correlated with severity of clinical manifestations of the pathology. The results obtained in this study allow to suppose that activation of free radical oxidation in dynamics of plague intoxication is an efferent segment of cytopathogenic effects of *Y. pestis* LPS.

Key words: *Y. pestis* LPS, bacterial endotoxemia, lipoperoxidation

Authors:

Afanasieva G.A., Chesnokova N.P., Maslyakova G.N., Khorkin Yu.F. Saratov State Medical University. 410012, Saratov, B.Kazach'a St., 112. E-mail: gafanaseva@yandex.ru

Kutyrev V.V. Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 23.09.08.