

Г.А.Афанасьева<sup>1</sup>, Н.П.Чеснокова<sup>1</sup>, В.В.Кутырев<sup>2</sup>**О ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ВЗАИМОСВЯЗИ НЕДОСТАТОЧНОСТИ  
АНТИРАДИКАЛЬНОЙ ЗАЩИТЫ ЭРИТРОЦИТОВ И НАРУШЕНИЙ  
РЕОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КРОВИ ПРИ БАКТЕРИАЛЬНОМ ЭНДОТОКСИКОЗЕ**<sup>1</sup>ГОУ ВПО Саратовский государственный медицинский университет,  
<sup>2</sup>ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

К числу ведущих патогенетических факторов расстройств регионарного кровотока и микроциркуляции при чумной интоксикации, индуцируемой липополисахаридом (ЛПС) *Y.pestis*, относятся снижение вязкости крови при различных скоростях сдвига, индексов деформируемости и агрегации эритроцитов, коррелирующее с тяжестью клинических проявлений патологии. Эфферентным звеном цитопатогенных эффектов ЛПС чумного микроба является активация свободнорадикального окисления и формирование недостаточности антиоксидантной системы.

**Ключевые слова:** чума, патогенез, ЛПС, антиоксидантная система.

Высокореактогенным компонентом эндотоксинов различных грамотрицательных бактерий, в том числе возбудителя чумы, является липополисахарид (ЛПС), обладающий полимодальными биологическими эффектами в виде расстройств системной гемодинамики, регионарного кровотока, микроциркуляции, нарушений тромбоцитарно-сосудистого, коагуляционного гемостаза и развития циркуляторной гипоксии [3, 5, 9, 13, 15].

Установлено, что эфферентным звеном гипоксического некробиоза тканей является активация процессов липопероксидации (ЛПО), сопровождающаяся дестабилизацией цитоплазматических, митохондриальных и лизосомальных мембран, закономерными последствиями которой является нарушение функций клеток и развитие цитолиза [1, 2, 10, 11].

До настоящего момента остается неизученной роль недостаточности антирадикальной защиты клеток крови в механизмах нарушений реологических свойств, расстройств микроциркуляции при чумной ЛПС-интоксикации.

Целью настоящей работы явилось установление взаимосвязи между изменением интегративных показателей состояния реологических свойств крови при различных скоростях сдвига, а также состоянием активности антиоксидантной системы (АОС) крови, в частности количеством эритроцитов, степенью выраженности нарушений стабильности их мембран в динамике чумной ЛПС-интоксикации, уровнем активности супероксиддисмутазы и содержанием витамина Е в крови.

**Материалы и методы**

Исследования проведены на стадиях ранних и тяжелых клинических проявлений чумной ЛПС-интоксикации, которые развивались, соответственно, спустя 1,5–2 и 4 ч после внутрибрюшинного введения беспородным белым мышам обоего пола массой

18–20 г фракции ЛПС эндотоксина в дозе, эквивалентной ЛД<sub>50</sub>. ЛПС приготовлен в ФГУЗ «РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора из штамма *Yersinia pestis* 358/12 методом Вестфаля-Людеритца и осажден смесью спирта и ацетона [5, 13].

Для оценки состояния АОС системы крови исследовали активность супероксиддисмутазы (СОД) цельной крови, уровень витамина Е сыворотки крови, а также перекисную резистентность эритроцитов (ПРЭ) общепринятыми спектрофотометрическими методами [4, 6, 12].

Количественные и качественные характеристики форменных элементов периферической крови изучены с помощью аппарата Sysmex K-1000.

Для изучения вязкости крови использован анализатор крови реологический (АКР-2, АОЗТ «Мелт», Россия). Оценка состояния реологических свойств крови проведена при различных скоростях сдвига (от 5 до 300 с<sup>-1</sup>) с последующим расчетом индексов деформируемости (ИДЭ) и агрегации (ИАЭ) эритроцитов [8].

**Результаты и обсуждение**

При исследовании реологических свойств крови в экспериментах, проведенных спустя 1,5–2 ч после введения ЛПС белым мышам, обнаружено снижение вязкости крови при всех скоростях сдвига ( $p < 0,001$ ) (рис. 1), а также ИДЭ ( $p < 0,001$ ) и ИАЭ ( $p < 0,001$ ).

Как известно, основными факторами, определяющими состояние реологических свойств крови, являются количество эритроцитов, деформируемость их мембран, содержание высокомолекулярных белков, полисахаридов в крови, а также адгезивно-агрегационная способность клеток крови и эндотелия сосудов [8].

Касаясь механизмов развития выявленного нами феномена уменьшения вязкости крови при низких скоростях сдвига при чумной ЛПС-интоксикации,

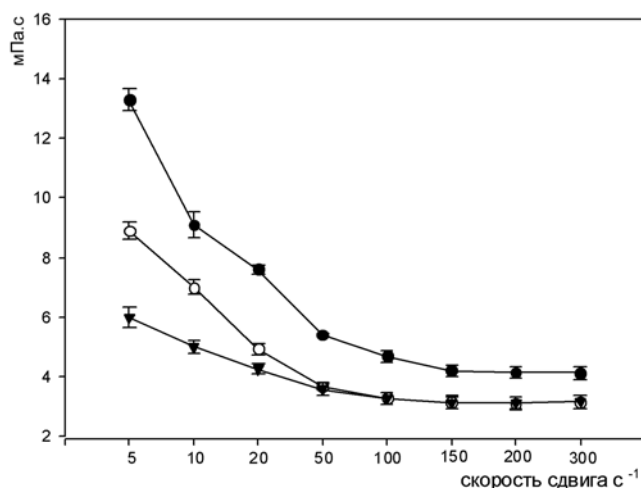


Рис. 1. Изменения вязкости крови у белых мышей в динамике чумной ЛПС-интоксикации (ЛПС в дозе, эквивалентной ЛД<sub>50</sub>):  
● — контроль; □ — через 1,5–2 ч; ▼ — через 4 ч

следует отметить, в соответствии с данными литературы, определенную патогенетическую значимость снижения коагуляционного потенциала крови, активации процессов фибринолиза и уменьшения уровня фибриногена [7].

Результаты проведенных нами экспериментальных исследований количественных сдвигов со стороны красной крови на стадии ранних клинических проявлений ЛПС-интоксикации, действительно свидетельствуют о развитии эритропении ( $p < 0,001$ ) (рис. 2), увеличении процента гемолизированных эритроцитов (таблица), что, безусловно, указывает на гемолитическое происхождение выявленной анемии.

В связи с этим очевидна важная роль обнаруженных нами количественных изменений со стороны эритроцитарного звена в нарушениях вязкости крови

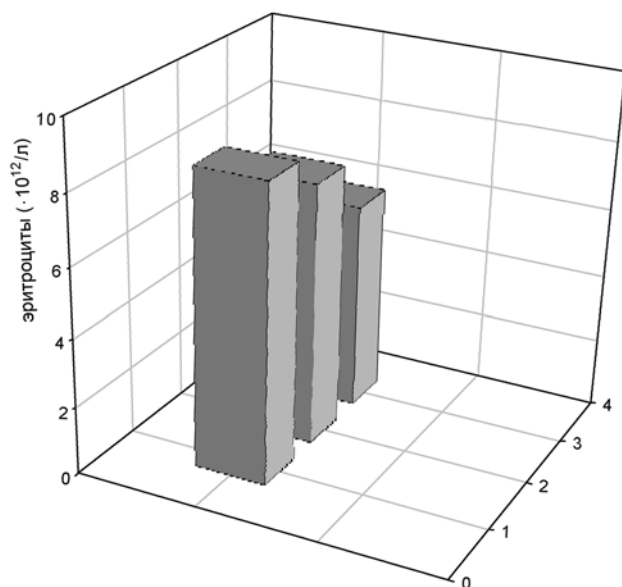


Рис. 2. Количество эритроцитов в крови белых мышей в динамике чумной ЛПС-интоксикации (ЛПС в дозе, эквивалентной ЛД<sub>50</sub>):  
1 — контроль; 2 — через 1,5–2 ч; 3 — через 4 ч

на ранней стадии чумной ЛПС-интоксикации.

Известно, что вязкостные свойства крови при высоких скоростях сдвига в значительной степени определяются не только количеством эритроцитов, но и состоянием структуры их мембран, способностью эритроцитов к адгезии, агрегации и деформируемости [8].

В проведенных нами ранее исследованиях в аналогичных условиях экспериментов установлено избыточное накопление в крови промежуточных продуктов ЛПО, обеспечивающих модификацию липидных и белковых компонентов цитоплазматических мембран клеток крови и эндотелия сосудов [1, 2].

В связи с этим не исключено, что обнаруженное нами снижение вязкости крови при средних и высоких скоростях при чумной интоксикации связано с дезорганизацией структуры эритроцитарных мембран на фоне активации ЛПО и недостаточности АОС клеток крови. Однако до настоящего момента в литературе мы не встретили данных, устанавливающих патогенетическую взаимосвязь между недостаточностью АОС крови и нарушением ее реологических свойств.

Как показали результаты проведенных нами далее исследований, дестабилизация эритроцитарных мембран и развитие гемолиза эритроцитов в ранний период интоксикации происходили на фоне уменьшения содержания  $\alpha$ -токоферола в сыворотке крови экспериментальных животных. Известно, что  $\alpha$ -токоферол является одним из неферментных антирадикальных факторов, способных нейтрализовать кислородные радикалы на этапах продолжения и разветвления цепей свободнорадикального окисления [4, 11].

В последующих экспериментах представлялось целесообразным установить, сохраняется ли выявленная нами закономерность взаимосвязи снижения вязкости крови при высоких и низких скоростях сдвига с недостаточностью антирадикальной защиты клеток крови по мере прогрессирования чумной ЛПС-интоксикации.

Как оказалось, утяжеление клинических проявлений патологии, развитие адинамии, лихорадки, цианоза, единичных летальных исходов эксперимен-

Показатели активности антиоксидантной системы крови при чумной ЛПС-интоксикации (доза ЛПС, эквивалентная ЛД<sub>50</sub>)

Показатели	Контроль	Стадии патологии	
		через 1,5–2 ч	через 4 ч
	M±m	M±m	M±m
Каталаза (плазма), мкатал/мл	110,9±2,2	120,3±4,6	104,2±3,7
Каталаза (эритроциты), мкатал/мл	1288,4±36,8	1377,9±16,9**	1344,7±60,5
СОД (цельная кровь), усл.ед	356,8±3,7	389,9±5,7*	332,5±6,9*
$\alpha$ -токоферол, Ед/мл (сыворотка крови)	13,98±0,4	10,18±0,54*	7,44±0,59*
ПРЭ, %	4,54±0,08	20,67±0,28*	47,78±1,59*

Примечания:

1. Звездочками отмечены достоверные различия с соответствующими показателями контрольной серии: \* —  $p < 0,001$ , \*\* —  $p < 0,02$ .
2. n = 15–20 во всех сериях экспериментов.

тальных животных спустя 4 ч после введения животным ЛПС в дозе, эквивалентной ЛД<sub>50</sub>, коррелировало с дальнейшим снижением вязкости крови при низких и средних скоростях сдвига (рис. 1). Уменьшение перекисной устойчивости эритроцитов (таблица), ИДЭ ( $p < 0,001$ ), ИАЭ ( $p < 0,001$ ) закономерно сочеталось с прогрессирующей анемией ( $p < 0,001$ ) (рис. 2). Одновременно усугублялась недостаточность антирадикальной защиты клеток: снижалось содержание  $\alpha$ -токоферола в сыворотке крови, уменьшалась активность СОД цельной крови как по сравнению с таковыми показателями предыдущей стадии интоксикации, так и по сравнению с показателями группы контрольных животных (таблица).

Таким образом, одним из патогенетических факторов прогрессирующего снижения вязкости крови в динамике чумной ЛПС-интоксикации лежит недостаточность антирадикальной защиты клеток крови, в том числе эритроцитов, и развитие эритропении.

Касаясь детализации молекулярно-клеточных механизмов влияния свободных радикалов на реологические свойства крови, в частности, состояние деформируемости и агрегации эритроцитов, следует отметить, что активные формы кислорода способны модифицировать плазменные белки и, тем самым, подавлять их способность к ингибированию сериновых лейкоцитарных протеаз широкой субстратной специфичности, освобождающихся под влиянием летальных доз ЛПС [14].

Однако свободные радикалы, являющиеся акцепторами  $H^+$  и, соответственно, мощными окислителями, обладают способностью прежде всего модифицировать липидные и белковые компоненты биологических мембран клеток различной морфофункциональной организации, обеспечивая повышение проницаемости цитоплазматических мембран, индуцировать процессы дегрануляции клеток крови и/или развитие синдрома цитолиза [1].

Таким образом, полученные нами результаты позволяют заключить, что к числу ведущих патогенетических факторов расстройств регионарного кровотока и микроциркуляции при чумной интоксикации, индуцируемой ЛПС *Y. pestis*, относятся снижение вязкости крови при различных скоростях сдвига, а также индексов деформируемости и агрегации эритроцитов, коррелирующее с тяжестью клинических проявлений патологии. Эфферентным звеном цитопатогенных эффектов ЛПС чумного микроба является активация свободнорадикального окисления.

На ранней стадии чумной ЛПС-интоксикации возникает абсолютный дефицит  $\alpha$ -токоферола – ферментного фактора антирадикальной защиты клеток различной морфофункциональной организации. По мере прогрессирования ЛПС-интоксикации присоединяется недостаточность активности СОД – одного из ферментов АОС клеток.

Активация процессов свободнорадикального окисления является одним из факторов дестабилизации биологических мембран клеток крови, повыше-

ния их проницаемости, индукции процессов дегрануляции и/или цитолиза.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Афанасьева Г.А., Чеснокова Н.П. О роли активации процессов перекисного окисления липидов в патогенезе бактериального эндотоксикоза. Фундаментальные исследования. 2008; 3:53–6.
2. 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.
3. Бондаренко В.М., Рябиченко Е.В., Веткова Л.Г. и др. Молекулярные аспекты повреждающего действия бактериальных липополисахаридов. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2004; 3:98–105.
4. Габриэлян Н.И., Левицкий 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. Корлюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. и др. Метод определения активности каталазы. Лаб. дело. 1988; 1:16–9.
7. Понукалина Е.В., Маслякова Г.Н., Ковалев В.И. и др. Патогенез геморрагического синдрома при чумной интоксикации. Саратов; 1990. С. 9–20.
8. Ройтман Е.В., Фирсов Н.Н., Дементьева М.Г. и др. Термины, понятия и подходы к исследованиям реологии крови в клинике. Тромбоз, гемостаз и реология. 2000; 3(3):5–12.
9. Сварваль А.В., Ценева Г.Я., Шендерович О.А. Липополисахарид иерсиний и его биологическая активность. Журн. микробиол. 2006; 3:100–4.
10. Скулачев В.П. Явления запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: роль активных форм кислорода. Соровский Образовательный Журнал. 2001; 7(6):4–10.
11. Чеснокова Н.П., Ледванов М.Ю. Активация свободнорадикального окисления – эфферентное звено типовых патологических процессов. Саратов; 2006. 177 с.
12. Fried R. Enzymatic and non-enzymatic assay of superoxide dismutase. Biochimie. 1975; 57:657–60.
13. Luderitz O., Freudenberg M.A., Galanos C. et al. Lipopolysaccharide of gram-negative bacteria. Curr. Top. Membr. Transport. 1982; 17:79–134.
14. Naskalski J.W., Marcinkiewicz J., Drozd R. Myeloperoxidase – mediated protein oxidation: its possible biological functions. Clin. Chem. Lab. Med. 2002; 40(5):463–8.
15. Tapper H., Herwald H. Modulation of hemostasis mechanisms in bacterial infections diseases. Blood. 2000; 96(7):2329–37.

### Об авторах:

Афанасьева Г.А., Чеснокова Н.П., Саратовский государственный медицинский университет. 410012, Саратов, ул. Б. Казачья, 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, 46. Тел.: (845-2) 26-21-31. E-mail: microbe@san.ru

G.A.Afanaseva, N.P.Chesnokova, V.V.Kutyrev

### Pathogenesis Interrelation of Insufficiency of Erythrocytes Antiradical Protection and Disturbance of Blood Rheological Properties in Bacterial Endotoxemia

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

Among the leading pathogenesis factors of disorders of regional blood flow and microcirculation in plague intoxication induced by *Y. pestis* lipopolysaccharide (LPS) are decreases of blood viscosity at various shift rates, indices of erythrocyte deformation and aggregation that correlate with severity of clinical manifestation. Efferent part of LPS cytopathogenic effects of plague microbe is enhancement of free-radical oxidation and formation of anti-oxidative system deficiency.

Key words: plague, pathogenesis, LPS, anti-oxidative system.

### Authors:

Afanaseva G.A., Chesnokova N.P. 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 23.12.08.