

ИЗУЧЕНИЕ ПУТЕЙ ВЫВЕДЕНИЯ И НАКОПЛЕНИЯ СТАФИЛОКОККОВОГО АЛЬФА-ТОКСИНА НА МОДЕЛИ АБСЦЕССА ЛЕГКОГО, СОЧЕТАЮЩЕГОСЯ С ГНОЙНЫМ БРОНХИТОМ, В ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА ЖИВОТНЫХ

В.П.Самсонов¹, Г.И.Чубенко², Н.В.Юсан², А.К.Самсонов²

¹Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания Сибирского отделения РАН, 675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22

²Амурская государственная медицинская академия Минздрава России, 675000, г. Благовещенск, ул. Горького, 95

РЕЗЮМЕ

Цель исследования – изучение путей выведения и накопления стафилококкового α -токсина из абсцесса легкого, сочетающегося с гнойным бронхитом. В эксперименте на 29 кроликах были разработаны методы воспроизведения этих воспалений. В качестве источника гнойно-некротического процесса в легких и бронхах у животных была применена смесь из взвеси *Staphylococcus aureus* (штамм Wood-46) в сочетании со стабилизатором (Freund's adjuvant complete, США), которую вводили в ткань легкого через грудную стенку. Для изучения путей распространения бактериального токсина из гнойно-некротических очагов легких и бронхов по этой же методике животным вводили очищенный стафилококковый α -токсин, меченый I^{125} . Установлено, что стафилококковый α -токсин, меченый I^{125} , имеет основные пути элиминации в лимфу и кровь. Максимальное его накопление происходило в лимфе правого лимфатического протока ($23,9 \pm 1,5$ ед. относительной удельной активности) и было в два раза больше, чем в лимфе грудного лимфатического протока. Концентрация стафилококкового α -токсина в крови была в 10 раз меньше, в лимфе. В значительных количествах стафилококковый α -токсин накапливался в жизненно важных органах – почках, легких, печени, сердце.

Ключевые слова: абсцесс легкого, гнойный бронхит, стафилококковый альфа-токсин.

SUMMARY

THE STUDY OF THE WAYS OF EXCRETION AND ACCUMULATION OF STAPHYLOCOCCAL ALPHA-TOXIN AT THE MODEL OF LUNG ABSCESS COMBINED WITH PURULENT BRONCHITIS IN THE EXPERIMENT WITH ANIMALS

V.P.Samsonov¹, G.I.Chubenko², N.V.Yusan², A.K.Samsonov²

¹Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration of Siberian Branch RAMS, 22 Kalinina Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation

²Amur State Medical Academy, 95 Gor'kogo Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation

The aim of the research is the study of the ways of excretion and accumulation of staphylococcal alpha

toxin from the lung abscess combined with purulent bronchitis. The methods of reproduction of these inflammations were developed during the experiment over 29 rabbits. As the source of purulent-necrotic process in lungs and bronchi in animals the mixture of *Staphylococcus aureus* meal (Wood-46 strain) was used in the combination with the stabilizer (Freund's adjuvant complete, USA), which was introduced into the lung tissue through the chest. To study the ways of the spread of bacterial toxin from purulent-necrotic foci of lungs and bronchi, purified staphylococcal α -toxin tagged with I^{125} was introduced into the animals by the same method. It was found out that staphylococcal α -toxin tagged with I^{125} has the main ways of elimination into lymph and blood. Its maximal accumulation occurred in the lymph of the right lymphatic duct (23.9 ± 1.5 units of relative specific activity) and it was twice as much as in the lymph of the chest lymphatic duct. The concentration of staphylococcal α -toxin in the blood was 10 times less than in the lymph. Staphylococcal α -toxin accumulates in big quantities in some vital organs: kidneys, lungs, liver, heart.

Key words: lung abscess, purulent bronchitis, staphylococcal α -toxin.

В патогенезе абсцессов легких ведущую роль играет интоксикация организма микробными токсинами и другими продуктами жизнедеятельности микроорганизмов [4]. Однако изучение путей воздействия бактериальных токсинов на органы и ткани организма больного абсцессом легкого, сочетающегося с гнойным бронхитом, не проводилось, что и стало целью этой экспериментальной работы.

Материалы и методы исследования

Экспериментальные исследования осуществлялись на 29 взрослых кроликах породы шиншилла, обоего пола, весом от 1,7 до 2,3 кг. В контрольную группу вошли 14 здоровых кроликов. Основную группу составили 15 кроликов, которым была воспроизведена модель гнойно-некротического воспаления (абсцесса) легкого в сочетании с ограниченным гнойным бронхитом – дренажный гнойный бронхит.

В настоящее время существуют различные методы воспроизведения гнойно-некротического воспаления, однако они не отражают отдельные формы такой патологии [5].

Воспроизведение модели дренируемых через бронхи абсцессов легких производилось следующим образом. Кролику, в положении на боку, по заднее-под-

мышечной линии грудной клетки в 5 межреберье выстригалась и сбривалась шерсть, кожа обрабатывалась 3% спиртовой настойкой йода. В этом месте на коже стерильными ножницами делали метку – надсечку размером 2×2 мм. В центре надсечки иглой диаметром 0,6 мм перпендикулярно плоскости стола, на котором лежало животное, делали прокол всех тканей грудной стенки и легкого на глубину 1,5 см. Через иглу шприцем вводили смесь из 1 млрд взвеси золотистого стафилококка (штамм Wood-46) в 1 мл 0,85% раствора хлористого натрия, соединенного с 0,5 мл стабилизатора Freund's adjuvant complete (США). Стабилизатор применялся для отграничения инфекционного процесса и усиления местного воспалительного ответа в очаге инфекции [2].

С целью ускорения развития гиперэргического воспаления в созданном инфекционном очаге через сутки кролику в вену вводили ещё 1 млрд взвеси того же штамма золотистого стафилококка, разведенного в 1 мл стерильного 0,85% раствора хлористого натрия.

Золотистый стафилококк был применен в качестве источника гнойно-некротического процесса в легких и бронхах у животных в связи с тем, что он входит в число основных возбудителей этой патологии легких [1, 3, 6].

Для изучения путей распространения бактериального токсина из гнойно-некротических очагов легких и бронхов нами была применена следующая методика. По методике, описанной выше, животным вводили очищенный стафилококковый α -токсин, меченый I^{125} , в разведении 1:2000, в объеме 2 мл в дозе 3,5 мКи на 1 кг веса животного. Стафилококковый α -токсин, меченый I^{125} , был получен из лаборатории стафилококковых инфекций и ботулизма НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи и имел следующие характеристики: белок (по Лоури) – 0,06 мг/мл, гемолизирующая активность – 0,5, радиоактивность (без учета эффективности счета) – $1,7 \times 10^8$ имп/мин/мл или 0,7 мКи/мл, молекулярный вес – 36000.

Стафилококковый α -токсин, меченый I^{125} , вводился в очаги гнойно-некротических воспалений легких и бронхов 11 животным в основной группе. Для сравнения распространения радиоактивных препаратов на модели гнойно-некротического воспаления легких, 4 кроликам из основной группы внутрилегочно вводился NaI^{125} в той же дозе; что и стафилококковый α -токсин.

Для изучения путей распространения бактериального токсина из гнойных очагов легких и бронхов животным дренировали правый и грудной (левый) лимфатические протоки. Проводилась катетеризация нижней полой вены. Для взятия проб мочи в мочевого пузырь через уретру вводился катетер.

Лимфа собиралась в специальные резервуары через 1-2-3-4 и 5 часов после введения, кровь из нижней полой вены бралась периодически.

По истечении времени опытов кроликов забивали с соблюдением требований гуманности согласно приложению №4 к Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных (приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 «О порядке

проведения эвтаназии (умерщвления животного)»).

Навески биологических жидкостей (лимфа, кровь, моча), а также навески из легкого, сердца, печени, почки исследовали методом радиоактивной индикации. Результаты измерения уровня накопления радиоактивности в органах и биологических жидкостях во всех группах опытов выражали относительной удельной активностью (OVA) – отношение средней активности (u) в 1 г исследуемой сырой биологической жидкости (имп/60 с) или ткани органа к стандартной активности (Ac) 1 г сырой ткани: $OVA = u / Ac$.

Протокол экспериментальной части исследования на этапах содержания животных, моделирования патологических процессов и выведения их из опыта соответствовал принципам биологической этики, изложенным в Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985), Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986), Приказе МЗ СССР №755 от 12.08.1977 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных», Приказе МЗ РФ №267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики». Исследование одобрено комитетом по биомедицинской этике ДНЦ ФПД СО РАНН.

Результаты исследования и их обсуждение

Первой группе здоровых животных контрольной группы (8 кроликов) внутрилегочно вводился стафилококковый α -токсин, меченый I^{125} . В пробах лимфы из правого и грудного лимфатических протоков максимум радиоактивности отмечался через 1,5 часа после внутрилегочного введения α -токсина I^{125} , в течение последующих трех часов радиоактивность снижалась до $8,1 \pm 0,4$ ед. ОУА.

Для сравнения второй группе здоровых животных (6 кроликов) внутрилегочно вводился кристаллоид – Na, меченый I^{125} . В этой группе отмечалось наибольшее повышение радиоактивности в лимфе через 1,5 часа после внутрилегочного введения NaI^{125} , но оно было в 10 раз меньше, чем элиминация лимфой α -токсина I^{125} .

Резорбция NaI^{125} в кровь после внутрилегочного введения происходила очень быстро и в течение 30 минут достигала своей наивысшей концентрации (в норме – $1,95 \pm 0,19$ ед. ОУА). Затем происходило быстрое снижение концентрации изотопа в крови за счет быстрого выведения кристаллоида с мочой.

В пробах крови у здоровых кроликов после внутрилегочного введения очищенного стафилококкового α -токсина, меченого I^{125} , радиоактивность возрастала в течение первого часа до $3,05 \pm 0,4$ ед. ОУА, затем она медленно увеличивалась, достигая к 5 часу опыта $4,15 \pm 0,3$ ед. ОУА.

Резорбция микробного токсина в кровь животных контрольной группы происходила в 11 раз медленнее, чем в лимфу.

Стафилококковый α -токсин медленно выводился с

мочой, концентрация его там через 1 час после внутрилегочного введения составляла в группе здоровых животных $3,8 \pm 0,32$ ед. ОУА и на этих цифрах держалась в течение суток, а затем начинала снижаться.

Изучение распространения очищенного стафилококкового α -токсина, меченого I^{125} , введенного в

гнойно-некротическую полость легкого, дренируемую через бронх и сочетающуюся с гнойным бронхитом, проведено на 11 кроликах. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1

Накопление радиоактивности в биологических жидкостях после внутрилегочного введения очищенного стафилококкового α -токсина, меченого I^{125} , при сочетании гнойно-некротического воспаления лёгких с гнойным бронхитом

Вид биологической жидкости	Уровень радиоактивности (ед. ОУА)					P _{1,2,3,4,5}
	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	5 ч	
Лимфа из правого лимф. протока	$6,35 \pm 1,1$	$18,4 \pm 1,8$	$23,9 \pm 1,5$	$15,1 \pm 1,3$	$10,2 \pm 0,9$	$<0,05$
Лимфа из левого грудного лимф. протока	$2,9 \pm 0,3$	$6,5 \pm 0,7$	$11,2 \pm 0,9$	$9,0 \pm 0,7$	$6,4 \pm 1,2$	$<0,05$
Кровь из нижней полой вены	$1,88 \pm 0,3$	$3,8 \pm 0,4$	$3,75 \pm 0,3$	$3,7 \pm 0,3$	$3,6 \pm 0,2$	$>0,05$
Моча	$5,6 \pm 1,1$	$4,95 \pm 0,9$	$4,6 \pm 1,0$	$4,2 \pm 0,5$	$3,8 \pm 0,6$	$>0,05$

Максимальное накопление токсина в лимфе правого лимфатического протока (5 кроликов) происходило через 3 часа после его введения и в больших количествах ($23,9 \pm 1,5$ ед. ОУА), чем в лимфе левого грудного лимфатического протока ($11,2 \pm 0,9$ ед. ОУА). Так как меченый I^{125} дополнительно распространялся в бронхиальном дереве через дренирующую полость абсцесса бронх, происходило ускорение его резорбции в организме животного.

Уровень радиоактивности крови быстро увеличился в течение первого часа до $1,88 \pm 0,31$ ед. ОУА, достигая ко 2 часу исследований $3,8 \pm 0,4$ ед. ОУА. Затем радиоактивность крови медленно уменьшалась, через сутки концентрация токсина достигла $3,0 \pm 0,3$ ед. ОУА.

Концентрация токсина в моче через час после его внутрилегочного введения, возрастала до $5,6 \pm 1,1$ ед. ОУА и затем постепенно уменьшалась.

Навески таких жизненно важных органов, как лёгкие, сердце, печень и почки брали в конце вышеприведенных экспериментов для определения их радиоактивности.

Распределение радиоактивности в лёгких, сердце, печени, почках экспериментальных животных через 5 часов после внутрилегочного введения очищенного стафилококкового α -токсина и кристаллоида Na, меченых I^{125} , в норме и при гнойно-некротическом воспалении лёгких и бронхов представлено в таблице 2.

Таблица 2

Накопление очищенного стафилококкового альфа-токсина, меченого I^{125} , и NaI^{125} в контрольной группе животных и при гнойно-некротических воспалениях лёгких и бронхов (ед. ОУА)

Серия опытов	Органы	Стафилококковый α -токсин, меченый I^{125}	NaI^{125}	p
Контрольная группа	Лёгкое, в которое радиоактивный препарат не вводился	$1,82 \pm 0,12$	$0,77 \pm 0,05$	$<0,001$
	Сердце	$1,40 \pm 0,02$	$0,42 \pm 0,05$	$<0,001$
	Печень	$1,48 \pm 0,04$	$0,43 \pm 0,016$	$<0,001$
	Почки	$2,34 \pm 0,20$	$4,70 \pm 1,5$	$>0,05$
Основная группа	Лёгкое, в которое радиоактивный препарат не вводился	$1,58 \pm 0,16$	$1,14 \pm 0,05$	$<0,05$
	Сердце	$1,38 \pm 0,14$	$0,47 \pm 0,007$	$<0,001$
	Печень	$1,39 \pm 0,11$	$0,56 \pm 0,015$	$<0,001$
	Почки	$4,05 \pm 0,56$	$4,62 \pm 0,86$	$>0,05$

Из таблицы 2 видно, что наибольшая радиоактивность микробного токсина у здоровых животных и при гнойно-некротическом воспалении лёгких и бронхов была в почках, при этом прослеживалась тенденция к большему накоплению кристаллоида NaI^{125} в почках.

Значительно более высокое (почти в два раза) содержание микробного токсина в почках после его внутрилегочного введения при гнойно-некротическом воспалении легких и бронхов, по сравнению с контролем, можно объяснить развивающейся функциональной недостаточностью почек в связи с повреждающим действием эндотоксикоза, обусловленного гнойно-некротическим воспалением.

Меньшее содержание радиоактивного микробного токсина в лёгком, в которое не вводился радиоактивный препарат, по сравнению с почками и кровью, можно объяснить детоксикационной функцией лёгких.

Значительному токсическому поражению подвергались и другие жизненно важные органы – печень и сердце.

Таким образом, микробные токсины из лёгких у здоровых животных и при гнойно-некротических воспалениях лёгких и бронхов элиминируются преимущественно по лимфатическому пути, накапливаясь в высоких концентрациях в жизненно важных органах – почках, легких, печени, сердце.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дворецкий Л.И., Яковлев С.В., Каминский В.В. Внебольничные стафилококковые пневмонии // Инфекции и антимикробная терапия. 2001. Т.3, №2. С.44–46.
2. Джавец Э., Мельник Д.Л., Эйдельберг Э.А. Руководство по медицинской микробиологии (в 3-х т.): пер. с англ. / под. ред. Т.В.Перадзе. М.: Медицина, 1982. Т.1. 350 с.
3. Катрецакая Г.Г. Факторы вирулентности условно патогенной микрофлоры нижних дыхательных путей при пневмониях // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2012. Вып.43. С.61–65.
4. Особенности гнойно-деструктивных заболеваний легких в Дальневосточном регионе. Новые технологии в их лечении / В.П.Самсонов [и др.] // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2001. Вып.8. С.12–20.
5. Саркисов Д.С., Ремезов П.И. Воспроизведение болезней человека в эксперименте. М.: Медицина, 1960. 780 с.
6. Al Ujayli B., Nafziger D.A., Saravolatz L. Pneumonia due to *Staphylococcus aureus* infection // Clin. Chest. Med. 1995. Vol.16, №1. P.111–120.

REFERENCES

1. Dvoretzkiy L.I., Yakovlev S.V., Kaminskiy V.V. *In-fektsii i antimikrobnaya terapiya* 2001; 3(2):44–46.
2. Джавец Э., Мельник Д.Л., Эйдельберг Э.А. *Rukovodstvo po meditsinskoy mikrobiologii* [The manual about medical microbiology]. Moscow; 1982.
3. Katretskaya G.G. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniya* 2012; 43:61–65.
4. Samsonov V.P., Lutsenko M.T., Samsonov K.V., Tyurikov P.P., Nakhamchen L.G. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniya* 2001; 8:12–20.
5. Sarkisov D.S., Remezov P.I. *Vosproizvedenie bolezney cheloveka v eksperimente* [The reproduction of people's diseases in the experiment]. Moscow; 1960.
6. Al Ujayli B., Nafziger D.A., Saravolatz L. Pneumonia due to *Staphylococcus aureus* infection. *Clin. Chest. Med.* 1995; 16(1):111–120.

Поступила 22.10.2012

Контактная информация

Владимир Петрович Самсонов,

доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по научной и лечебной работе,
Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания Сибирского отделения РАМН,
675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22.

E-mail: dncfpd@ramn.ru

Correspondence should be addressed to

Vladimir P. Samsonov,

MD, PhD, Professor, Deputy Director on Scientific and Clinical Work,
Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration SB RAMS,
22 Kalinina Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation.

E-mail: dncfpd@ramn.ru