

УДК 577.1:615.91

ОЦЕНКА ДИНАМИКИ ТОКСЕМИИ КРОВИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КРАТКОВРЕМЕННОЙ СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ГРИБНЫХ ИНТОКСИКАЦИЙ НА КРЫСАХ

© 2003 г. Р.Ю. Храпов, Т.Н. Попова, Л.В. Матасова

Воронежский государственный университет

Исследована токсемия крыс с использованием кратковременной суспензионной культуры подвижных клеток при моделировании грибного отравления. Результаты проведенных исследований показали, что на разных стадиях интоксикации индекс токсичности исследуемых сывороток специфичен. Выявлена и обоснована взаимосвязь между индексами токсичности сывороток контрольных и экспериментальных животных в динамике развития отравления.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время актуальной проблемой остаются острые отравления, частота которых составляет 3 - 5 % всех заболеваний. Поступление токсичных веществ извне приводит к экзотоксикозам, нарушение жизненных функций в организме человека вызывает эндогенную интоксикацию - отравление организма образующимися в нем ядовитыми веществами. Одним из частных случаев интоксикации являются отравления грибами (ОГ), с которыми приходится сталкиваться врачам почти всех регионов. Особенно остра эта проблема для Центрального Черноземья. Выбор лечебной тактики во многом зависит от степени токсичности крови и лимфы. Известно, что при большинстве токсических состояний биохимические сдвиги, обнаруживаемые в крови и лимфе, не коррелируют со степенью биологической токсичности. Поэтому показания степени детоксикации, оценка ее эффективности не всегда могут основываться на определении биохимических показателей. Достоверный тест оценки токсичности крови и лимфы на мышах с заблокированной ретикулоэндотелиальной системой (РЭС) дает ответ лишь через 2-3 дня. Все это весьма затрудняет использование таких методов в условиях критической ситуации для больного, когда необходимо экстренное определение степени токсемии для выбора или оценки эффективности дезинтоксикационной терапии /1/. Токсемия - наличие в крови токсинов - наблюдается при интоксикациях, многих инфекционных болезнях и т.д. Наиболее распространенным в последнее время показателем интегральной оценки токсичности биологических сред является определение продолжительности жизни простейших *Paramecium caudatum* (парамецийный тест) и *Tetrahymena pyriformis* (тет-

рахименный тест). Группой авторов Военно - медицинской академии имени С.М. Кирова были проведены подробные испытания возможностей применения этих тестов в медицине /2, 3/. Показано, что парамецийный и тетрахименный тесты не применимы для решения поставленных задач. Эти тесты не имеют корреляции ни с одним из традиционно применяемых методов диагностики интоксикации.

Таким образом, поиск удобной и эффективной методики для оценки степени интоксикации биологических жидкостей при ОГ является крайне актуальной задачей.

В настоящей работе была предпринята попытка применить в качестве тест-объекта для оценки токсичности крови при ОГ сперму быка. Оценка токсичности крови на основе данного подхода позволила получить обнадеживающие результаты и показала, что имеется убедительная разница по этому показателю для контрольных и экспериментальных животных с экзо- и эндотоксикозом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве модельной системы была выбрана замороженная сперма крупного рогатого скота. Использование бычьей спермы в токсикологических экспериментах обусловлено тем что, его сперматозоиды теряют двигательную функцию раньше, чем произойдут повреждения акросом /4/. Тест - функцией клеточного тест - объекта может быть выбрана подвижность половых клеток. Сперматозоиды - единственные клетки млекопитающих, эволюционно приспособленные к временному существованию вне организма. Именно подвижность является интегральным показателем их физиологического, биохимического и морфологического статуса поскольку для сперматозоидов понятия «подвижность» и «жизнь» являются синонимами

/5/. Энергозависимость всех протекающих процессов в сперматозоиде дает основание предположить, что действие чужеродных агентов на половые клетки вызовет изменения энергетического метаболизма, что, в свою очередь, приведет к изменению двигательной активности сперматозоидов.

Оценку подвижности сперматозоидов проводили с помощью анализатора токсичности типа АТ-04 разработанном в Московском ВНИИ медицинской техники. Оценка показателя подвижности осуществлялась путем подсчета изменений интенсивности светового потока при движении сперматозоидов в исследуемой среде через оптический зонд.

Оценка результатов испытаний осуществлялась путем сравнения полученных значений индексов токсичности для исследованных образцов сыворотки и допустимого (нормативного) интервала индекса токсичности. Согласно существующим нормам испытуемый образец считается нетоксичным для целостного организма млекопитающих (т.е. не оказывающим общетоксического действия), если индекс токсичности располагается в интервале 70% - 120%. В случае получения значений индекса токсичности меньше 70% и больше 120% образец признается токсичным.

Токсично 0 – 69%	Нетоксично 70 – 120%	Токсично 121% и более
----------------------------	--------------------------------	---------------------------------

Чем дальше отстоит значение индекса токсичности испытуемого образца от нормативного интервала, тем сильнее оказывает исследуемая проба свое действие на жизнедеятельность сперматозоидов. В данном случае отклонение от «нормы» и в меньшую и в большую сторону считается одинаково неблагоприятным.

В качестве экспериментальных животных использовались крысы капюшонной породы, из которых были сформированы 2 опытных и 1 контрольная группа. В каждую группу входило по 6 молодых особей весом 100 ± 10 грамм. Животным входящим в состав экспериментальной группы № 1, вводилось перорально, внутривентрикулярно с помощью зонда суммарное количество токсинов (α -, β - аманитинов и фаллоидина), разведенных в 40% этиловом спирте, эквивалентное дозе 0,05 мг/кг; для животных группы № 2 это количество составляло 0,1 мг/кг. Контрольным животным вводился чистый 40% этиловый спирт. Разведение и введение токсинов в этиловом спирте обусловлено тем, что грибные токсины растворяются только в органических растворителях. Животные, входящие в состав контрольной группы, находились в тех же условиях, и на том же рационе, что и животные экспериментальных групп.

Заборы крови у животных проводились: через 8, 26 и 100 часов после момента затравки. Кровь

бралась методом иссечения хвоста с последующим сбором в сухие пробирки. Термостатирование проводилось при температуре 37°C в течении 30 минут, затем кровь помещалась в морозильную камеру при температуре -8°C на 10 минут. Перед центрифугированием образовавшийся сгусток обводился сухой стерильной инъекционной иглой. Центрифугирование проводилось в течении 15 минут при 1500 об/мин. Отбирался супернатант, который разводился глюкозо-цитратной средой в соотношении 1:5.

Для определения степени токсичности сыворотки опытных животных сравнивали с сывороткой контрольных крыс. Для разбавления сыворотки использовали глюкозо-цитратный буфер (глюкоза - 4г; цитрат натрия трехзамещенный -1г; вода дистиллированная 100 мл). В среде разбавления осуществлялось так же оттаивание замороженной спермы. Контрольную и опытную сыворотки по 0,4 мл помещали в пробирки с притертыми пробками и ставили в сухой термостат блока пробоподготовки при температуре $(40 \pm 1,5)^\circ\text{C}$. Растворы приготавливались за 1 час до начала эксперимента.

Помимо индекса токсичности по программе, заложенной в память анализатора, для контрольной и опытной выборок также вычислялся коэффициент вариации. По значению коэффициента вариации для каждой выборки судили о корректности постановки эксперимента. При этом учитывали, что в однородном биологическом материале коэффициент вариации не превышает 15% /6/. Таким образом, если значения коэффициента вариации для каждой из выборок были $\leq 15\%$, то результаты эксперимента считали статистически значимыми.

При проведении исследований использовались следующие реагенты: α – аманитин, β – аманитин, фаллоидин (SIGMA CHEMICAL CO, США), остальные реагенты отечественного производства марки “ХЧ”.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Зависимость, показанная на рис.1, отражает снижение двигательной активности сперматозоидов в сыворотке, полученной от животных спустя восемь часов после затравки смесью токсинов в растворе 40% этилового спирта, с течением времени.

Рис. 1. Полученные данные демонстрируют значительное снижение активности сперматозоидов в глюкозо-цитратной среде с добавлением сыворотки опытных животных по сравнению с сывороткой контрольных. (Табл. 1) Сыворотка животных экспериментальных групп была токсична (индекс токсичности сыворотки животных первой группы 69,5%, второй группы 56,6%) в отличие от сыворотки животных контрольной группы (97,0%). Таким образом,

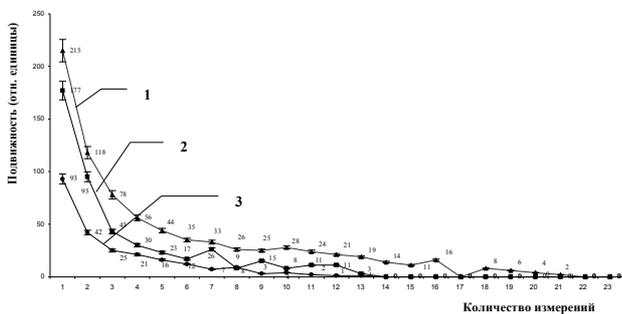


Рис. 1. Изменение подвижности сперматозоидов в сыворотках животных контрольной и экспериментальной групп через 8 часов с момента введения токсинов:

1. Сыворотка контрольных животных (8 часов после введения 40% раствора этилового спирта)/ Индекс токсичности (It) - 97,0%
2. Сыворотка экспериментальных животных, группа 1 (8 часов после введения токсинов в 40% растворе этилового спирта). Индекс токсичности (It) -69,5%
3. Сыворотка экспериментальных животных, группа 2 (8 часов после введения токсинов в 40% растворе этилового спирта). Индекс токсичности (It) - 56,6%

по результату забора крови и исследованию сыворотки экспериментальных животных через 8 часов можно предположить, что в данном случае сперматозоиды подвергались двойному воздействию как со стороны токсинов, находящихся в латентной стадии отравления в кровяном русле, так и со стороны комплимента, тогда как в сыворотке контрольных животных, очевидно, сперматозоиды взаимодействовали только с комплиментом.

На этой стадии отравления экспериментальные и контрольные животные ведут себя заторможено, вяло реагируют на раздражители, много пьют.

Рис. 2. При исследовании сыворотки животных опытных групп через 26 часов результаты существенно отличались (рис.2). Сыворотка животных первой группы была нетоксична, сыворотка животных второй группы токсична, контрольная сыворотка не токсич-

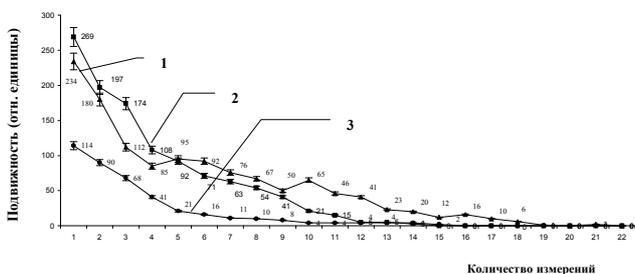


Рис. 2. изменение подвижности сперматозоидов в сыворотках животных контрольной и экспериментальной групп через 26 часов с момента введения токсинов:

1. Сыворотка контрольных животных (26 часов после введения 40% раствора этилового спирта). Индекс токсичности (It) - 104,2%.
2. Сыворотка экспериментальных животных, группа 1 (26 часов после введения токсинов в 40% растворе этилового спирта). Индекс токсичности (It) -81,1%.
3. Сыворотка экспериментальных животных, группа 2 (26 часов после введения токсинов в 40% растворе этилового спирта). Индекс токсичности (It) - 66,6%

на. Полученные результаты, очевидно, могут объясняться “уходом” и “осаждением” токсинов в паренхиматозных органах – печени, почках и их дальнейшим выведением из организма. Исходя из полученных результатов можно сделать вывод что, на данном этапе, который в клинике человека носит название гастро-энтерального, количество токсинов в крови экспериментальных животных сокращается и сперматозоиды подвергаются воздействию меньших количеств токсинов и комплимента, чем на начальной стадии отравления т.е. через 8 часов. Однако животные беспокойны, много пьют, не едят, отмечена диарея.

Рис. 3. Как следует из рис.3 сыворотки экспериментальных и контрольных животных через 100 часов после затравки не токсичны. Однако значения двигательной активности сперматозоидов в сыворотках экспериментальных животных значительно превышали значения двигательной активности в контрольной сыворотке. Таким образом, сыворотка экспериментальных животных была более благоприятной средой для сперматозоидов, чем сыворотка контрольных животных. Следует отметить, что на этой стадии в клинике людей отмечается холероподобный синдром, следует быстрая смерть в случае большого количества токсинов, либо разворачивается клиническая картина цитотоксического гепатита с дальнейшим выздоровлением или же гепатаргией, которая ведет к летальному исходу. Что касается опытных животных, то они были малоподвижны, сбивались в кучки, на внешние раздражители реагировали вяло, дыхание было учащено. Животные не пили, не ели, принимали боковое положение. Во второй группе спустя еще 40 часов погибло две особи. На этой стадии отравления как в организме че-

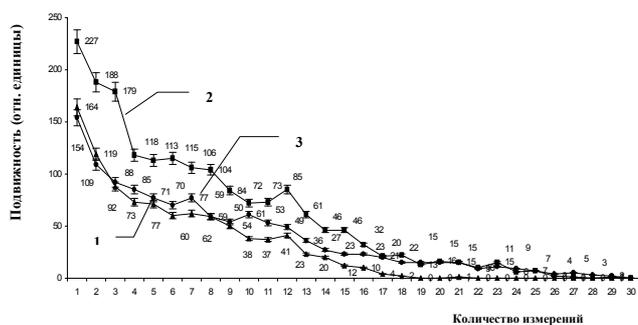


Рис. 3. Изменение подвижности сперматозоидов в сыворотках животных контрольной и экспериментальной групп через 100 часов с момента введения токсинов:

1. Сыворотка контрольных животных (100 часов после введения 40% раствора этилового спирта). Индекс токсичности (It) - 77,9%.
2. Сыворотка экспериментальных животных, группа 1 (100 часов после введения токсинов в 40% растворе этилового спирта). Индекс токсичности (It) -104,8%.
3. Сыворотка экспериментальных животных, группа 2 (100 часов после введения токсинов в 40% растворе этилового спирта). Индекс токсичности (It) - 110,8%

ловека, так и в организме экспериментальных животных, по-видимому, развиваются явления эндотоксикоза, нарастающие постадийно.

Можно предположить следующий механизм взаимодействия клеточного тест-объекта и сыворотки крови. Как известно, в сыворотке крови содержится комплемент, который способен взаимодействовать со сперматозоидами и лизировать их. В крови экспериментальных животных, взятой через 8 часов после затравки, помимо комплемента находилось определенное количество токсина. Исходя из того, что ни один фермент организма млекопитающих не обеспечивает детоксикации ядов бледной поганки /7/, можно предположить, что токсичность сыворотки экспериментальных групп была связана с двойным воздействием на сперматозоиды со стороны комплемента и токсинов грибов. В крови контрольных животных находилось лишь определенное количество комплемента, поэтому наблюдалось увеличение токсичности крови экспериментальных животных по сравнению с контрольной группой. При рассмотрении результатов, полученных через 26 часов после затравки, когда вероятно, количество экзотоксина в крови минимально и явления эндотоксикоза также минимальны, можно предположить, что сперматозоиды в контрольной и экспериментальных сыворотках находились в примерно одинаковых условиях. Через 100 часов явления эндотоксикоза в крови экспериментальных животных нарастают, это объясняется, очевидно, снижением у них содержания и активности комплемента в сравнении с контрольными животными. Это происходило, видимо, в связи с тем, что попадающие в кровь антигены взаимодействовали с комплементом и часть его оказывалась связанной. У контрольной группы, по-видимому, оказалось больше свободного комплемента, а у экспериментальных животных – меньше. Индексы токсичности сывороток контрольной и экспериментальных групп через 100 часов находились в пределах 70% – 120%, однако из полученных данных отчетливо видно, что более благоприятной средой, сохраняющей подвижность сперматозоидов, были сыворотки животных экспериментальных групп. В этой связи следует отметить, что существует точка зрения, согласно которой в качестве причины токсикоза рассматривается антиген липид-А, компонент молекул липополисахарида (ЛПС), являющийся эндотоксином грамотрицательной микрофлоры. Увеличение концентрации ЛПС в крови, например, при прорыве механического барьера, защищающего организм человека от микроорганизмов и их фрагментов, приводит к интенсивному расходованию комплемента и вызывает снижение его концентрации и активности /8, 9/.

Таким образом, показано, что у экспериментальных животных имеет место увеличение токсичности сыворотки крови по сравнению с контрольными

в латентном периоде грибной интоксикации (Таб. 1). При этом величина индекса токсичности сыворотки крови позволяет оценить состояние экспериментальных животных при токсикозе и может быть использована в медицинской практике. Однако на стадии цитотоксического гепатита сыворотки животных экспериментальных групп были более благоприятной средой для сперматозоидов, о чем свидетельствовали показатели их подвижности.

Таблица 1

Значения индексов токсичности сывороток крови крыс в течении эксперимента

Время от начала эксперимента	Значение индекса токсичности <i>It</i> (%)		
	Контрольная группа	Опытная группа №1	Опытная группа №2
8 часов	97.0	69.5	56.6
26 часов	104.2	81.1	66.6
100 часов	77.9	104.8	110.8

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Буянов В.М., Алексеев А.А. Лимфология эндотоксикоза. - М.: Медицина 1990. - 272с.
2. О несостоятельности применения некоторых из ранее рекомендованных инфузорий в качестве тест-объектов в медицинской практике / Шапков Б.В., Белоцерковская Э.А., Скобло И.И. и др. // Экология морских и пресноводных простейших: Тез. докл. II Всесоюз. симп. протозоологов. - Ярославль, 1989. - С. 76.
3. О невозможности применения парамеций в качестве тест – объекта при определении токсичности биологических сред в хирургической практике / Белоцерковская Э.А., Скобло И.И., Шапков Б.В. и др. // Экология морских и пресноводных простейших: Тез. докл. I-ого симп. протозоологов. - Саласпилс, 1984. - С. 14-16.
4. Соколовская И.И., Ойвадис Р., Абилов А.В., Усман Белко Туре О значении акросомы в оценке семени самцов // Животноводство. - 1981. - №9. - С. 46-47.
5. Милованов В.К. Биология воспроизведения и искусственное осеменение животных. - М., 1969. - 696с.
6. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. - Минск: Высшая школа, 1967. - 328 с.
7. Лужников Е.А. Острые грибные отравления в Российской Федерации в 1990 – 1992 гг. – мифы и реальность // Токсикол. вестн. - №2, - 1993. – С. 13-14
8. Ерюхин И.А., Шапков Б.В. Эндотоксикоз в хирургической практике. СПб. - 1995. - 304 с.
9. Габриэлян Н.И., Дмитриев А.А., Кулаков Г.П. Диагностическая ценность определения средних молекул в плазме крови при нефрологических заболеваниях. // Клиническая медицина. - 1981 №4. - С. 18-19.