

УРОВНИ ФЕРРИТИНА В СЫВОРОТКАХ КРОВИ И ПЕРИТОНЕАЛЬНОМ ЭКССУДАТЕ КРЫС ПРИ ВНУТРИБРЮШИННОМ ИНФИЦИРОВАНИИ МОНОКУЛЬТУРОЙ БАКТЕРИЙ

Мусагалиев А.А., Коханов А.В., Воронкова М.Ю., Серебряков А.А.,
Муртузалиев И.М.

ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет Минздрава России», Астрахань, e-mail: agma@astranet.ru

Исследована взаимосвязь концентрации ферритина в сыворотке крови и перитонеальном экссудате крыс с характером бактериальной контаминации после инфицирования брюшной полости различными штаммами условно-патогенных бактерий. Установлено достоверное повышение уровня ферритина в крови и в экссудате по сравнению с контролем после внутрибрюшинного введения стрептококка на 2-е сутки, после стафилококка – на 2-е и 3-и сутки. Синегнойная палочка дает две волны достоверного повышения ферритина в перитонеальном экссудате на 1-е и 3-и сутки после заражения. Внутрибрюшинное заражение клебсиеллой приводит к быстрому и достоверному повышению концентрации ферритина, уже начиная с 1-х суток, и к последующему плавному снижению ферритина в крови и перитонеальной жидкости инфицированных крыс. Сходная с клебсиеллой динамика изменения концентрации ферритина по сравнению с контролем наблюдается в группе животных, у которых моделировался каррагинановый асептический перитонит. Обнаружено, что концентрация ферритина в перитонеальной жидкости после инфицирования крыс любой из 5 монокультур грамположительных и грамотрицательных бактерий во всех случаях выше, чем в крови экспериментальных животных. Сделано предположение, что в перспективе, используя коэффициенты отношений концентрации ферритина в крови и перитонеальной жидкости с помощью экспресс-тестов для определения ферритина, можно будет с определенной степенью вероятности с первых дней прогнозировать характер бактериальной обсемененности брюшной полости.

Ключевые слова: лабораторные крысы, штаммы условно-патогенных бактерий, внутрибрюшинное инфицирование, моделирование перитонита, уровни ферритина.

LEVELS OF FERRITIN IN SERUM AND PERITONEAL EXUDATE OF RATS IN THE INTRAPERITONEAL INFECTION OF THE MONOCULTURE OF BACTERIA

Musagaliev A.A., Kokhanov A.V., Voronkova M.Yu., Serebryakov A.A.,
Murtuzaliev I.V.

Astrakhan State Medical University, Astrakhan, e-mail: agma@astranet.ru

The relationship of the concentration of ferritin in blood serum and peritoneal exudate of rats with the character of bacterial contamination after infection of the abdominal cavity with various strains of conditionally pathogenic bacteria was studied. A significant increase in the level of ferritin was found in comparison with the control in the blood and in the exudate after intraperitoneal injection of streptococcus on the 2nd day, after staphylococcus on the 2nd and 3rd days. *Pseudomonas aeruginosa* gives two waves of significant increase in ferritin in peritoneal exudate on the 1st and 3rd days after infection. Intraperitoneal infection with *Klebsiella* leads to a rapid and significant increase of ferritin concentration already from 1 day and to a subsequent gradual decrease of ferritin in the blood and peritoneal fluid of infected rats. A similar dynamics of changes in ferritin concentration in comparison with control was observed in the group of animals that modeled carrageenan aseptic peritonitis. It was found that the concentration of ferritin in the peritoneal fluid after infection of rats with any of the 5 monocultures of Gram-positive and Gram-negative bacteria in all cases is higher than in the blood of experimental animals. The assumption is made that in the long term, using coefficients of relationship of the concentration of ferritin in the blood and peritoneal fluid with the help of rapid tests for determination of ferritin, can be a certain degree of probability from the early days to predict the nature of bacterial contamination of the abdominal cavity.

Keywords: laboratory rats, strains of conditionally pathogenic bacteria, intraperitoneal infection, modeling of peritonitis, levels of ferritin.

Причиной инфекции при перитоните могут быть самые различные бактерии [1, 2].

При этом особенности бактериальной обсемененности брюшины отражаются на течении

патологического процесса в брюшной полости, влияют на симптоматику перитонита, характер течения инфекционного процесса. В процессе антибактериальной терапии состав микрофлоры изменяется в сторону преобладания устойчивых бактерий. Соответственно изменяется и этиологическая структура интраабдоминальных инфекций, развивающихся в послеоперационном периоде [1-3].

Бактериологический посев и многодневное культивирование образцов крови, перитонеальной жидкости на дифференциально-диагностических средах несвоевременно информирует о характере течения инфекционного процесса в брюшной полости и ведет к запоздалой хирургической коррекции возникающих осложнений. Следовательно, разработка простого и доступного способа быстрой диагностики спектра бактериальной контаминации брюшины остается актуальной проблемой абдоминальной хирургии.

Кроме посева, возможным вариантом определения характера бактериальной контаминации является серологическое исследование перитонеального экссудата на антигенный состав микрофлоры с помощью специфических антител или ПЦР-диагностики, однако такой тип исследований – прерогатива крупных клиник и научно-исследовательских учреждений и не подходит для массового обследования в хирургических отделениях.

Одним из путей решения данной проблемы в абдоминальной хирургии может стать разработка эквивалентов характера микрофлоры среди сывороточных белков острой фазы (БОФ) [2, 4, 5]. Зная взаимосвязь БОФ с составом микрофлоры, хирург может с определенной достоверностью (до результатов бактериологического исследования) предположить характер бактериального обсеменения брюшной полости, его количественные и качественные характеристики и, следовательно, определить оптимальный способ оперативного вмешательства с назначением адекватной антибактериальной терапии.

Предполагается взаимосвязь уровня С-реактивного белка (СРБ) со степенью инфицированности кокковой микрофлорой, прежде всего, с пневмококками [6, 7]. Имеются косвенные указания на взаимосвязь с определенными штаммами патогенных бактерий железосодержащих БОФ – ферритина и лактоферрина [8, 9]. Механизм бактериостатической активности этих белков состоит в том, что их апоформы активно аккумулируют железо, которое необходимо для развития патогенной микрофлоры [10, 11].

Ферритин (Фр) – растворимый в воде комплекс гидрофосфата железа с белком апоферритином, широко используемым в клинической практике для диагностики нарушений метаболизма железа [8, 10]. Установлена связь Фр с процессом тканевой деструкции, обязательно сопутствующим распространенным формам перитонита [8, 9, 11, 12].

Цель исследования: определить взаимосвязь между уровнем острофазового белка ферритина в сыворотке крови и перитонеальном экссудате крыс с характером бактериальной

контаминации после инфицирования брюшной полости различными штаммами условно-патогенных бактерий.

Материалы и методы исследования. Работа выполнена на 90 белых крысах-самцах линии Wistar массой 180–240 г из питомника лабораторных животных ФГБУ «НИИ по изучению лепры» МЗ РФ (г. Астрахань), согласно принципам Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986).

В соответствии с задачами, животные были распределены на 6 групп, в том числе на 5 основных групп по 12 крыс в каждой и 6-ю – группу сравнения, состоящую из 30 особей. Животным основных групп однократно внутрибрюшинно были введены пять различных культур условно патогенных бактерий, а крысам 6-й группы сравнения воспроизводили асептический перитонит однократным внутрибрюшинным введением 1 мл раствора каррагинана (ООО Тинокс-Хим, Москва), который готовили, растворяя 50 мг сухого порошка препарата в 10 мл стерильного изотонического раствора хлорида натрия

Для заражения животных использовали суточные агаровые культуры аэробных грамположительных бактерий – *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* (серовар А) и аэробных грамотрицательных бактерий – *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*, приготовленные на 0,9%-ном растворе хлорида натрия. Выбор этих 5 штаммов бактерий объясняется наиболее частым именно их обнаружением в перитонеальном экссудате при разлитом гнойном перитоните. Внутрибрюшинное заражение животное проводили инъекцией предварительно оттитрованных доз микроорганизмов, содержащих в объеме 0,5 мл 1×10^8 микробных тел стафилококка и стрептококка и 1×10^7 микробных тел протей, клебсиеллы и синегнойной палочки. Выбор дозы каждой бактериальной культуры был определен по 0,5 LD₅₀, что обеспечивало выживание всех лабораторных животных более 3-х суток. Одновременно с заражением крыс основных групп для замедления резорбции бактерий в кровь и профилактики летального сепсиса всем им внутрибрюшинно вводили раствор каррагинана по схеме и в дозе, аналогичным тем, что и при моделировании асептического перитонита у крыс 6-й группы сравнения. Через 24, 48 и 72 часа после внутрибрюшинных инъекций под эфирным наркозом путем декапитации осуществляли эвтаназию 4 животных каждой основной группы и 10 животных группы сравнения с последующим забором биоматериала.

Материалом для исследования служили сыворотка крови, полученной из яремной вены лабораторных животных, и перитонеальный экссудат, аспирированный из брюшной полости с помощью пастеровской пипетки. В качестве контроля использовали 10 образцов

сывороток крови крыс различных групп, при этом кровь получали из хвостовой вены за неделю до начала эксперимента.

Уровень ферритина определяли в сыворотке крови и перитонеальной жидкости методом иммуноферментного анализа с помощью набора для определения данного железосодержащего БОФ у крыс (фирма «Cloud-Clone Corp.», США). Чувствительность теста составляет 1,7 нг/мл.

Результаты обработаны методами вариационной статистики и корреляционного анализа с применением лицензионного пакета программ MS Office Excel 2003. Статистическая значимость различий сравниваемых величин (p) между выборками оценивалась с помощью непараметрического критерия U (Вилкоксона – Манна-Уитни) для независимых выборок. Различия между выборками считались статистически достоверными при значении $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Использованные дозы бактерий для внутрибрюшинного инфицирования не вызывали гибели животных в течение последующих трех суток, однако при вскрытии четко присутствовали признаки перитонита различной степени тяжести.

Наблюдение за поведением животных показало, что крысы через сутки после воспроизведения перитонита отличались адинамичностью; шерсть у них была взъерошена, глаза мутные; животные отказывались от воды и пищи, живот у них был поддут, стула отсутствовал. На вскрытии у животных диагностировали разлитой перитонит: в брюшной полости жидкость в различном количестве и пласты фибрина, брюшина тусклая.

О наличии у них системной воспалительной реакции и перитонита уже через сутки после внутрибрюшинного инфицирования различными штаммами бактерий также свидетельствовало значительное ($p < 0,05$) повышение уровня СРБ сыворотки крови во всех основных группах по сравнению с контрольными цифрами этих же животных до эксперимента.

Средний уровень Фр у интактных крыс (пробы крови получены за 9 дней до начала эксперимента) составил $29,1 \pm 2,56$ нг/мл (контрольная группа) (табл. 1), что в несколько раз ниже нормальных средних уровней сывороточного Фр в крови человека.

Установлено, что в крови у крыс с асептическим перитонитом, вызванным каррагинаном, на протяжении всех трех суток наблюдения отмечалось недостоверное повышение уровня Фр (на 20–25 % выше контрольных цифр) (табл. 1). Уровень Фр в сыворотке крови крыс при асептическом перитоните стабилен на всем протяжении наблюдения (рис. А).

В первые 24 часа у крыс, зараженных бактериальными культурами одновременно с моделированием перитонита каррагинаном, в крови также не наблюдалось статистически значимого повышения уровня ферритина относительно контрольных значений, однако среди грамотрицательных бактерий только внутрибрюшинное инфицирование бактериями *Proteus vulgaris* никак не отразилось на концентрации ферритина в крови (табл. 1, рис. А). Другие культуры грамотрицательных бактерий (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*) давали в первые сутки заражения крыс уровни Фр, превышающие контрольные в 1,4–1,5 раза.

Таблица 1

Содержание ферритина в крови и перитонеальном экссудате крыс в различные сроки после внутрибрюшинной инъекции каррагинана и бактерий

	Фр (нг/мл)					
	кровь			экссудат		
	1-е сутки	2-е сутки	3-е сутки	1-е сутки	2-е сутки	3-е сутки
Стрептококк (n = 4×3)	32,0±7,37	55,5±7,79 P(U)<0,05	48,8±9,72	36,3±7,31	69,5±9,85 P(U)<0,05	60,2±9,81
Стафилококк (n = 4×3)	25,6±5,86	79,8±15,29 P(U)<0,05	73,4±14,95	35,5±7,14	116,8±13,05 P(U)<0,01	104,2±18,69 P(U)<0,05
Протей (n = 4×3)	24,7±5,65	25,9±2,31	29,5±3,60	32,9±6,64	36,8±4,22	50,6±9,14
Псевдомонас (n = 4×3)	44,9±10,28	41,0±5,70	44,9±9,17	53,7±5,57 P(U)<0,01	49,8±7,06	61,9±9,79 P(U)<0,05
Клебсиелла (n = 4×3)	42,0±9,63	31,3±4,34	27,3±5,58	52,3±8,74 P(U)<0,05	39,6±4,12	30,3±5,44
Каррагинан (n = 7×3)	36,1±5,18	33,1±4,66	33,2±6,22	56,7±6,91 P(U)<0,01	40,0±5,61	38,1±5,68
Контроль (n = 10)	29,1±2,56			–		

Примечание: P(U) – статистически значимые различия с контролем (по непараметрическому U-критерию Вилкоксона – Манна-Уитни).

Через 48 часов после инфицирования грамположительными бактериями в крови крыс статистически значимо более чем в два раза повышается концентрация Фр (табл. 1), которая при стрептококковой инфекции имеет к 3-м суткам тенденцию к снижению, а при стафилококковой – к 3-м суткам остается на высоких цифрах, в 2,5 раза превышающих контрольные уровни Фр (рис. А). В крови животных, зараженных грамотрицательными бактериями, на 2-е и 3-и сутки исследования сывороточные концентрации Фр или сохраняются на одном и том же низком уровне (*Proteus*, *Pseudomonas*), или плавно снижаются (*Klebsiella*).

В отличие от сывороточных уровней Фр, начиная с 1-х суток и во все последующие дни, нами обнаружены более высокие концентрации Фр в перитонеальной жидкости крыс во всех шести основных группах (табл. 1), что позволило ввести новый коэффициент (Фр_{экс} /

$\Phi_{рсыв}$) – отношение концентрации $\Phi_{р}$ в перитонеальном экссудате к концентрации сывороточного $\Phi_{р}$ крыс (табл. 2).

Обнаружено, что средние концентрации $\Phi_{р}$ в перитонеальной жидкости были всегда выше, чем средние концентрации этого белка в сыворотке крови этой же группы крыс. Методами корреляционного анализа между уровнями $\Phi_{р}$ в крови и перитонеальной жидкости крыс подтверждена тесная прямая связь ($r = +0,99$). Вычислены коэффициенты корреляции в зависимости от характера микробного заражения (табл. 2).

Таблица 2

Отношения $\Phi_{рэкс} / \Phi_{рсыв}$ и коэффициенты корреляции r между содержанием ферритина в крови и перитонеальном экссудате крыс в различные сроки после внутрибрюшинной инъекции каррагинана и бактерий

	$\Phi_{рэкс} / \Phi_{рсыв}$ и степень корреляции, r		
	1-е сутки	2-е сутки	3-е сутки
Стрептококк (n = 4×3)	1,13 0,99	1,25 0,95	1,23 0,97
Стафилококк (n = 4×3)	1,39 0,99	1,46 0,95	1,42 0,95
Протей (n = 4×3)	1,33 0,99	1,42 0,98	1,72 0,96
Псевдомонас (n = 4×3)	1,20 0,99	1,21 0,95	1,38 0,88
Клебсиелла (n = 4×3)	1,25 0,99	1,27 0,95	1,11 0,91
Каррагинан (n = 7×3)	1,57 0,99	1,21 0,99	1,15 0,98

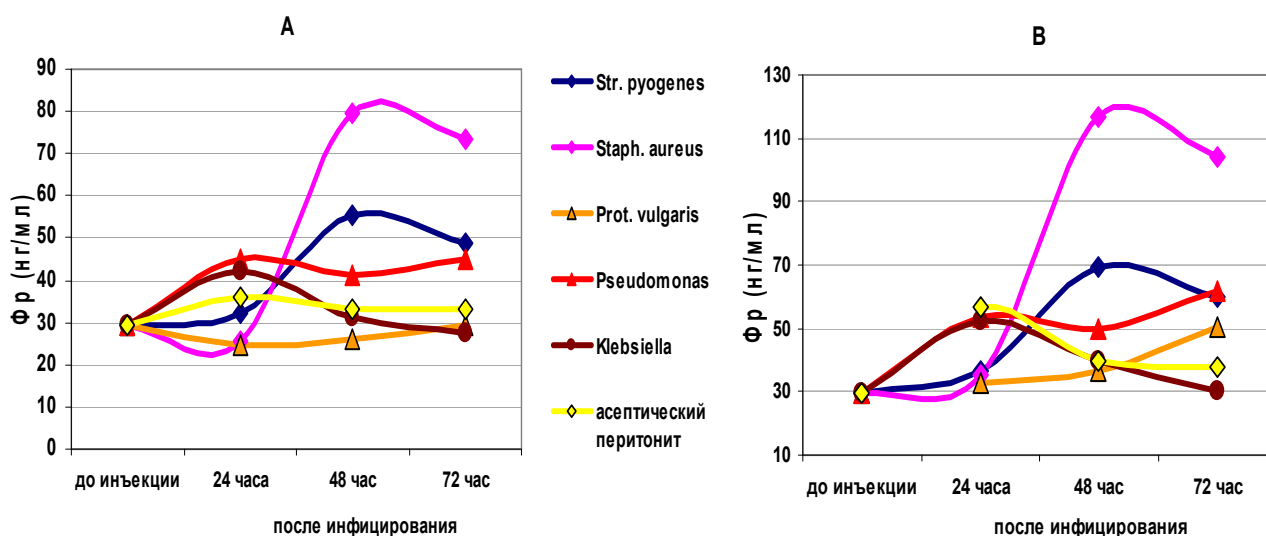
Обнаружено, что в перитонеальной жидкости крыс с асептическим перитонитом, вызванным каррагинаном, через 24 часа после внутрибрюшинной инъекции концентрация $\Phi_{р}$ почти в 2 раза превышает контрольные цифры $\Phi_{р}$ в крови крыс ($P(U) < 0,01$). Кроме того, в этот срок уровень $\Phi_{р}$ в экссудате при асептическом перитоните даже выше, чем при инфекционных перитонитах у крыс остальных 5 основных групп (табл. 1). В последующие дни при асептическом перитоните наблюдается падение уровня $\Phi_{р}$ в экссудате (рис. Б) до уровня, статистически незначимого – всего на четверть превышающего контрольные цифры (табл. 1).

В первые 24 часа у крыс, зараженных бактериальными культурами грамположительных бактерий, концентрация $\Phi_{р}$ в перитонеальной жидкости практически не отличается от контроля, через 48 часов статистически значимо возрастает в 4 раза для стафилококка ($P < 0,01$) и в 2,4 раза для стрептококка ($P < 0,05$), сохраняясь на высоких цифрах

и через 72 часа (табл. 1, рис. Б). При этом уровень Фр при стафилококковом инфицировании на 3-е сутки статистически значимо ($P < 0,05$) повышен в 3,5 раза.

При инфицировании бактериями *Proteus* наблюдается постепенное нарастание уровня ферритина в перитонеальном экссудате, однако статистически значимых величин от контрольных концентраций Фр не достигает (табл. 1, рис. Б).

Наоборот, культуры грамотрицательных бактерий *Pseudomonas* и *Klebsiella* давали в первые сутки заражения крыс концентрации Фр, статистически значимо превышающие контрольные в 1,4–1,5 раза (табл. 1). Этот высокий уровень Фр после первых суток не сохранялся и резко снижался на 2-е – 3-и сутки в обеих группах (табл. 1, рис. Б).



Динамика изменения уровня Фр в сыворотке крови (А) и перитонеальном экссудате (В) крыс после внутрибрюшинного заражения различными штаммами бактерий

Заклучение

Установлено, что при одновременном внутрибрюшинном введении каррагинана и заражении крыс культурой грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* в дозах 1×10^8 микробных тел или грамотрицательных бактерий *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca* в дозах 1×10^7 микробных тел развивается гнойный перитонит различной степени тяжести, а в крови и перитонеальном экссудате животных после инфицирования крыс любой из 5 монокультур условно-патогенных бактерий повышается концентрация Фр, причем его уровень в перитонеальной жидкости в среднем всегда был выше, чем в крови экспериментальных животных.

После введения стрептококка уровень Фр достоверно повышен в крови и в экссудате на 2-е сутки, после стафилококка – на 2-е и 3-и сутки. Синегнойная палочка дает две волны достоверного повышения Фр в перитонеальном экссудате на 1-е и 3-и сутки после внутрибрюшинного инфицирования. При этом в крови экспериментальных животных

прослеживается аналогичная динамика. Внутробрюшинное заражение клебсиеллой приводит к быстрому и значимому повышению концентрации ферритина, уже начиная с 1-х суток, и к последующему плавному снижению Фр в крови и перитонеальной жидкости зараженных крыс. Сходная с клебсиеллой динамика изменения концентрации Фр по сравнению с контролем наблюдалась также в группе сравнения у животных, которым моделировался каррагинановый асептический перитонит.

Полученные результаты могут быть использованы в дальнейшем для разработки метода, позволяющего с определенной степенью вероятности до получения результатов микробиологических исследований перитонеального экссудата предположить характер бактериальной обсемененности брюшной полости путем определения содержания Фр в двух биологических жидкостях с расчетом коэффициента отношений концентрации Фр в сыворотке крови и перитонеальной жидкости.

Список литературы

1. Гостищев В.К. Перитонит/ В.К. Гостищев, В.П. Сажин, А.Л. Авдоненко. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2002. – 237 с.
2. Абдоминальная хирургическая инфекция: клиника, диагностика, антимикробная терапия: Практическое руководство / Под редакцией В.С. Савельева, В.Р. Гельфанда. – М.; Литтерра, 2006. – 168 с.
3. Суковатых Б.С. Механизмы развития распространенного перитонита / Б.С. Суковатых, Ю.Ю. Блинков, О.Г. Фролова // Вестн. эксперим. и клинич. хирургии. – 2012. – Т. 5, № 2. – С. 470-478.
4. Володин В.В. Белки «острой фазы» воспаления при бактериальных инфекциях у новорожденных / Н.Н.Володин, В.В.Долгов, Д.Н.Дегтярев [и др.] // Рос. вестн. перинатол. и педиатрии. – 2000. – № 6. – С. 33-35.
5. Зурнаджьянц В.А. К вопросу о значении теста на α 2-макроглобулин для своевременной диагностики тяжести воспалительного процесса в поджелудочной железе / В.А. Зурнаджьянц, Э.А. Кчебеков, А.В. Коханов [и др.] // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2016. – Т.11, № 3. – С. 405-408.
6. Чурляев Ю.А. Значение белков острой фазы воспаления в диагностике тяжести состояния при септических и гнойных процессах / Ю.А. Чурляев, Ю.Д. Прокопенко, Л.С. Карташян // Детская хирургия. – 2012. – Т. 15, № 5. – С. 80-82.

7. Sormunen P. C-reactive protein is useful in distinguishing Gram strain-negative bacterial meningitis in children / P. Sormunen, M.J.T. Kallio, T. Kilpi, H. Peltola // *J. Pediatrics*. – 1999. – Vol. 134. – P. 725-729.
8. Зурнаджянц В.А. Ферритин и лактоферрин в оценке степени тяжести состояния больных с перитонитом / В.А. Зурнаджянц, Э.А. Кчибеков, М.А. Сердюков, В.А. Бондарев // *Инфекции в хирургии*. – 2014. – Т. 12, № 2. – С. 26-28.
9. Сушков С.В. Ферропротеины как биомаркеры при распространенном перитоните / С.В. Сушков, М.Я. Насиров, Н.Д. Гаджиев // *Новости хирургии*. – 2012. – Т. 20, № 1. – С. 67-70.
10. Петрова О.В. Взаимосвязь уровней тканевого и сывороточного ферритина и СРБ при остром холецистите / О.В. Петрова, А.В. Коханов, М.С. Савенков, А.А. Савенкова // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. – 2010. – Т. 8, № 7. – С. 59-62.
11. Коханов А.В. Уровни сывороточного ферритина и термостабильной фракции альбумина в крови у больных аппендикулярным перитонитом / А.В. Коханов, Э.А. Кчибеков, О.А. Луцева, А.А. Мусагалиев // *Современные проблемы науки и образования*. – 2016. – № 6; URL: <http://www.science-education.ru/article/view?id=25588> (дата обращения: 21.11.2016).
12. Коханов А.В. Взаимосвязь уровней сывороточных острофазовых белков и онкомаркеров с количественной оценкой тяжести травмы и общего состояния пострадавших / А.В. Коханов, В.В. Белопасов, Е.В. Метелкина [и др.] // *Клиническая лабораторная диагностика*. – 2008. – № 9. – С. 40а-40.