

ВИЗНАЧЕННЯ ГОСТРОЇ ТОКСИЧНОСТІ БАКТЕРІЙНИХ ЕНДОТОКСИНІВ

I. М. Кушнір

Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів
та кормових добавок
вул. Донецька 11, м. Львів, 70019, Україна

У статті наведено дані щодо визначення гострої токсичності бактерійних ендотоксинів грамнегативних мікроорганізмів: *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica* та *Klebsiella oxytoca*. Бактерійні ендотоксини здатні у невеликих концентраціях активувати синтез інтерлейкінів та інтерферонів, що забезпечує неспецифічну резистентність організму. При надходженні у кров бактерійних ендотоксинів у великих концентраціях виникає інтоксикація організму. У результаті проведених досліджень встановлено, що, залежно від виду мікроорганізмів, їх токсичність є різною. Зокрема, середньосмертельна концентрація ендотоксину *E. coli* для білих мишей становить 4, *Y. enterocolitica* — 3,3 та *K. oxytoca* — 6,5 мг/кг маси тіла. Досліджувані бактерійні ендотоксини відносяться до першого класу токсичності, що класифікується як високотоксичні речовини.

Ключові слова: БАКТЕРІЙНІ ЕНДОТОКСИНИ, ГОСТРА ТОКСИЧНІСТЬ, БІЛІ МИШІ, МІКРООРГАНІЗМИ, КОНЦЕНТРАЦІЯ.

Джерелом бактерійних ендотоксинів (БЕ) у макроорганізмі можуть бути як сапрофітні, так і патогенні аеробні й анаеробні грамнегативні мікроорганізми травного тракту та вогнищ запалення [1]. При проникненні БЕ у невеликих концентраціях у кров, їх виявляють у плазмі периферійної крові у кожному третьому випадку, а при постійному надходженні його більша частина елімінується системою макрофагів печінки, внаслідок чого активується синтез інтерлейкінів та інтерферонів, що забезпечує неспецифічну резистентність організму [2]. Встановлено, що у здорових новонароджених дітей у плазмі крові знаходиться $1,36 \pm 0,1$ пкг/см³ БЕ, а у дорослих — $1,9 \pm 0,25$ пкг/см³ [3].

У нормі в систему кровообігу проникає невелика кількість БЕ, які у воротній вені зв'язуються з клітинами Купфера, макрофагами, еритроцитами, ліпопротеїнами та іншими білками плазми крові й детоксикуються в гепатоцитах [4–6].

При надходженні у систему кровообігу значної концентрації БЕ виникає явище, яке отримало назву "ендотоксинова агресія". Це — патологічний процес, зумовлений надлишком БЕ у системі кровообігу, який трансформується в те чи інше захворювання, залежно від генетичної чи набутої схильності [7–9].

Бактерійні ендотоксини беруть участь у патогенезі атеросклерозу (спричиняючи дисфункцію ендотелію), алергічних та аутоімунних захворювань, хронічних бактерійних та вірусних захворювань, хвороб серцево-судинної та ендокринної систем тощо [10–12].

З огляду на це, надзвичайно важливим є вивчення токсикологічної характеристики БЕ. Тому метою роботи було встановити параметри гострої токсичності бактерійних ендотоксинів грамнегативних мікроорганізмів, зокрема *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica* та *Klebsiella oxytoca*.

Матеріали і методи. Для визначення DL₅₀ ендотоксинів *E. coli*, *Y. enterocolitica* та *K. oxytoca* використовували БЕ польових штамів. Вивчення токсичної дії проводили у відповідності до методичних рекомендацій "Токсикологічний контроль нових засобів захисту тварин" [13] та посібником "Доклінічні дослідження ветеринарних лікарських засобів" [14].

Для визначення DL₅₀ ендотоксинів *E. coli*, *Y. enterocolitica* та *K. oxytoca* було сформовано по п'ять дослідних і одній контрольній групі мишей, по шість тварин у кожній. Для визначення DL₅₀ ендотоксину *E. coli*, тваринам I групи вводили ендотоксин у дозі 2,0, II групи — 3,0, III групи — 4,0, IV групи — 4,5 та V групи — 5,0 мг/кг. Для визначення DL₅₀ ендотоксину *Y. enterocolitica* тваринам I групи ендотоксин вводили у дозі 2,0, II групи — 2,5, III групи — 3,0, IV групи — 3,5 та V групи — 4,0 мг/кг. Для визначення DL₅₀ ендотоксин *K. oxytoca* тваринам I групи ендотоксин вводили у дозі 4,0, II групи — 5,0, III групи — 6,0, IV групи — 7,0 та V групи — 8,0 мг/кг. Різні концентрації ендотоксину вводили мишам одноразово підшкірно. Тваринам усіх контрольних груп підшкірно вводили ізотонічний розчин натрію хлориду. Спостереження за тваринами проводили упродовж 14 діб.

Обчислення DL₅₀ для токсинів проводили за Г. Кербером, використовуючи безпосередні результати дослідів [196]. Розрахунок DL₅₀ проводили за формулою:

$$DL_{50} = DL_{100} - \frac{Y \cdot (z \cdot d)}{m}$$

де: DL₁₀₀ — доза токсину, яка викликала загибель усіх тварин групи;

d — інтервал між кожними суміжними дозами;

z — середньоарифметичне значення з числа тварин, які загинули під впливом двох суміжних доз;

m — число тварин у кожній групі.

Результати й обговорення. Перші клінічні ознаки ендотоксикозу у білих мишей проявлялися через 6-8 год після введення ендотоксинів *E. coli*, *Y. enterocolitica* та *K. oxytoca*. До того ж ступінь їх виявлення залежав від дії ендотоксинів у певних дозах і від виду мікроорганізмів. Результати визначення DL₅₀ ендотоксину *E. coli* наведено у таблиці 1.

Таблиця 1

Динаміка загибелі тварин за введення різних концентрацій ендотоксину *E. coli*, n=6

Групи	Концентрація, мг/кг	Кількість тварин, що загинули, доби						
		1	2	3	4	5	14	Всього
Контрольна	Ізотонічний розчин натрію хлориду	-	-	-	-	-	-	-
I	2,0	-	-	-	-	-	-	-
II	3,0	-	1	-	-	-	-	1
III	4,0	1	1	-	-	-	-	2
IV	4,5	3	1	-	-	-	-	4
V	5,0	6	-	-	-	-	-	6

Як видно з даних, наведених у таблиці 1, загибель усіх тварин відмічали у V групі на першу добу після введення ендотоксину у концентрації 5,0 мг/кг маси тіла, у IV дослідній групі на першу добу загинуло три тварин, а на другу — одна. У III групі в перші дві доби загинуло по одній тварині, в II дослідній групі на другу добу загинула лише одна тварина, в подальшому загибелі тварин не спостерігали. Після введення ендотоксину у концентрації 2,0 мг/кг маси тіла упродовж 14-добового спостереження усі тварини залишилися живі. Розрахунок DL₅₀ ендотоксину *E. coli* наведено у таблиці 2.

Розрахунок DL₅₀ ендотоксину *E. coli*:

$$\Sigma(z \cdot d) = 0,5 + 1,5 + 1,5 + 2,5 = 6 \text{ мг/кг}$$

$$DL_{100} = 5 \text{ мг/кг}$$

$$DL_{50} = DL_{100} - (\Sigma \cdot (z \cdot d)) : m$$

$$DL_{50} = 5 - 6 : 6 = 4,0 \text{ мг/кг.}$$

Отже, при введенні білим мишам ендотоксину *E. coli* середньосмертельною була встановлена концентрація 4,0 мг/кг.

Розрахунок LD₅₀ ендотоксину *E. coli* у для білих мишей

Показники	Концентрація, мг/кг				
	2,0	3,0	4,0	4,5	5,0
Вижило тварин	6	5	4	2	0
Загинуло тварин	0	1	2	4	6
z	0,5	1,5	3,0	5,0	
d	1,0	1,0	0,5	0,5	
z · d	0,5	1,5	1,5	2,5	

Результати визначення DL₅₀ ендотоксину *Y. enterocolitica* наведено у таблиці 3.

Таблиця 3

Динаміка загибелі тварин за введення різних концентрацій ендотоксину *Y. enterocolitica*, n=6

Групи	Концентрація, мг/кг	Кількість тварин, що загинули, доби						
		1	2	3	4	5	14	Всього
Контрольна	Ізотонічний розчин натрію хлориду	-	-	-	-	-	-	-
I	2,0	-	-	-	-	-	-	-
II	2,5	-	1	-	-	-	-	1
III	3,0	2	-	-	-	-	-	2
IV	3,5	4	-	-	-	-	-	4
V	4,0	6	-	-	-	-	-	6

Як видно з даних, наведених у таблиці 3, загибель усіх тварин відзначали у V групі на першу добу після введення ендотоксину у концентрації 4,0 мг/кг маси тіла. У III та IV дослідних групах, яким вводили ендотоксин у концентраціях 3,0 та 3,5 мг/кг, на першу добу загинуло, відповідно, дві та чотири тварини, у II групі на другу добу загинула лише одна тварина, в подальшому загибелі тварин не спостерігали. Після введення ендотоксину у концентрації 2,0 мг/кг маси тіла упродовж 14 добового спостереження усі тварини залишилися живі. Розрахунок DL₅₀ ендотоксину *Y. enterocolitica* наведено у таблиці 4.

Таблиця 4

Розрахунок DL₅₀ ендотоксину *Y. enterocolitica* для білих мишей

Показники	Концентрація, мг/кг				
	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0
Вижило тварин	6	5	4	3	0
Загинуло тварин	0	1	2	3	6
z	0,5	1,5	2,5	4,5	
d	0,5	0,5	0,5	0,5	
z · d	0,25	0,75	1,75	2,25	

Розрахунок DL₅₀ ендотоксину *Y. enterocolitica*:

$$\Sigma(z \cdot d) = 0,25 + 0,75 + 1,75 + 2,25 = 4,25 \text{ мг/кг}$$

$$DL_{100} = 4 \text{ мг/кг}$$

$$DL_{50} = LD_{100} - (\Sigma \cdot (z \cdot d)) : m, DL_{50} = 4 - 4,25 : 6 = 3,3 \text{ мг/кг.}$$

Отже, при введенні білим мишам ендотоксину *Y. enterocolitica* середньосмертельною була встановлена концентрація 3,3 мг/кг.

Результати визначення DL₅₀ ендотоксину *K. oxytoca* наведено у таблиці 5.

Динаміка загибелі тварин за введення різних концентрацій ендотоксину *K. oxytoca*, n=6

Групи	Концентрація, мг/кг	Кількість тварин, що загинули, доби						
		1	2	3	4	5	14	Всього
Контрольна	Ізотонічний розчин натрію хлориду	-	-	-	-	-	-	-
I	4,0	-	-	-	-	-	-	-
II	5,0	-	1	-	-	-	-	1
III	6,0	1	1	-	-	-	-	2
IV	7,0	2	2	-	-	-	-	4
V	8,0	6	-	-	-	-	-	6

Як видно з даних, наведених у таблиці 5, у V групі на першу добу після введення ендотоксину у концентрації 8,0 мг/кг маси тіла, відзначали загибель усіх тварин, у IV дослідній групі в перші дві доби загинуло по дві тварини, у III групі — по одній тварині. У II дослідній групі на другу добу загинула лише одна тварина, у подальшому загибелі тварин не виявляли. Після введення ендотоксину у концентрації 4,0 мг/кг маси тіла упродовж 14 добового спостереження усі тварини залишилися живі. Розрахунок DL_{50} ендотоксину *K. oxytoca* наведено у таблиці 6.

Таблиця 6

Розрахунок LD_{50} ендотоксину *K. oxytoca* для білих мишей

Показники	Концентрація, мг/кг				
	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0
Вижило тварин	6	5	5	2	0
Загинуло тварин	0	1	1	4	6
z	0,5	1,0	2,5	5,0	
d	1,0	1,0	1,0	1,0	
z · d	0,5	1,0	2,5	5,0	

Розрахунок DL_{50} ендотоксину *K. oxytoca*:

$$\Sigma(z \cdot d) = 0,5 + 1,0 + 2,5 + 5,0 = 9 \text{ мг/кг}$$

$$DL_{100} = 8 \text{ мг/кг}$$

$$DL_{50} = LD_{100} - (\Sigma \cdot (z \cdot d)) : m$$

$$DL_{50} = 8 - 9 : 6 = 6,5 \text{ мг/кг.}$$

При введенні білим мишам ендотоксину *K. oxytoca* середньосмертельною була встановлена концентрація 6,5 мг/кг.

ВИСНОВКИ

Бактерійні ендотоксини, залежно від виду мікроорганізмів, проявляють свою токсину дію у різних концентраціях. Згідно з вимогами ГОСТ 12.1.007-76 [15], досліджувані БЕ *E. coli*, *Y. enterocolitica* та *K. oxytoca* відносяться до першого класу токсичності, що класифікується як високотоксичні.

Перспективи подальших досліджень. Вивчити терміни виведення бактерійних ендотоксинів з організму тварин.

THE DETERMINATION OF ACUTE TOXICITY OF BACTERIAL ENDOTOXINS

I. M. Kushnir

State Scientific-Research Control Institute of Veterenary Preparations and Feed Additives,
11, Donetska str., Lviv, 79019, Ukraine

S U M M A R Y

The article presents the results of the determination of acute toxicity of bacterial endotoxins of gram-negative microorganisms: *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica* and *Klebsiella oxytoca*. Bacterial endotoxins in a small concentrations are able to activate the synthesis of interleukins and interferons, which provides non-specific resistance. When receipts of bacterial endotoxins in blood in high concentrations it arises intoxication of organisms. As a result of studies we found that, depending on the type of microorganisms their toxicity is different. In particular, DL₅₀ concentration of endotoxin *E. coli* for white mice is 4,0 *Y. enterocolitica* - 3,3 and *K. oxytoca* — 6,5 mg/kg body weight. The investigated bacterial endotoxins belongs to the 1th class of toxicity that classified like a highly toxic substances.

Keywords: BACTERIAL ENDOTOXIN, ACUTE TOXICITY, WHITE MOUSE, MICROORGANISMS, CONCENTRATION.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ

И. М. Кушнир

Государственный научно-исследовательский контрольный институт ветеринарных
препаратов и кормовых добавок
ул. Донецкая 11, г. Львов, 70019, Украина

А Н Н О Т А Ц И Я

В статье приведены данные определения токсичности бактериальных эндотоксинов грамотрицательных микроорганизмов: *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica* и *Klebsiella oxytoca*. Бактериальные эндотоксины способны в небольших концентрациях активировать синтез интерлейкинов и интерферонов, что обеспечивает неспецифическую резистентность организма. При поступлении в кровь бактериальных эндотоксинов в больших концентрациях возникает интоксикация организма. В результате проведенных исследований установлено, что в зависимости от вида микроорганизмов их токсичность различна. В частности, среднесмертельная концентрация эндотоксина *E. coli* для белых мышей составляет 4,0 *Y. enterocolitica* — 3,3 и *K. oxytoca* — 6,5 мг/кг массы тела. Исследуемые бактериальные эндотоксины относятся к первому классу токсичности, что классифицируется как высокотоксичные вещества.

Ключевые слова: БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЭНДОТОКСИНЫ, ОСТРАЯ ТОКСИЧНОСТЬ, БЕЛЫЕ МЫШИ, МИКРООРГАНИЗМЫ, КОНЦЕНТРАЦИЯ.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. *Салахов И. М.* Современные аспекты патогенеза эндотоксинового шока / И. М. Салахов, А. И. Ипатов, Ю. В. Конев [и др.] // Успехи современной биологии. — 1998.

— № 1. — С. 33–49.

2. Шано В. П. Эндогенная интоксикация и синдром системного воспалительного ответа при критических состояниях / В. П. Шано, А. Н. Несторенко, Т. В. Джоджуа // Боль, обезболивание и интенсивная терапия. — 2000. — № 1 (Д). — С. 75–77.

3. Антифосфолипидный синдром у новорожденных детей от женщин с пороками сердца / В. А. Таболин, А. Д. Макацария, А. Я. Ильина [и др.] // Международный журнал иммунологии. — 1999. — № 12. — С. 160–161.

4. Яковлев М. Ю. Роль системной эндотоксинемии в физиологии и патологии человека / М. Ю. Яковлев // Сборник трудов первой сессии РМАПО: М., 1995. — С. 10–11.

5. Liu A. H. Endotoxin: friend or foe? / A. H. Liu, A. H. Redmon // Allergy and Astma Proc. — 2001. — Vol. 22 (6). — P. 337–340.

6. Бондаренко В. М. Определение эндотоксина грамотрицательных бактерий в крови человека / В. М. Бондаренко, В. Г. Лиходед, М. Ю. Яковлев // Журн. микробиол. — 2002. — № 2 — С. 83–89.

7. Кондратенко Ю. Н. Опыт комплексного хирургического лечения больных с послеоперационными острым эндофтальмитом и рецидивирующим увеитом при катарактальной хирургии / Ю. Н. Кондратенко, Н. В. Чумак // Современные технологии хирургии катаракты: Сб. науч. ст. — М., 2004. — С. 156–164.

8. Мамбеткулова Г. К. Иммунологические и иммуногенетические особенности увеитов при синдроме Фогта-Коянаги / Г. К. Мамбеткулова, Л. Ш. Ишбердина, В. Б. Мальханов // Клиническая офтальмология. — 2003. — Т. 4. — № 4. — С. 157–160.

9. Семесько С. Г. Роль свободнорадикального окисления в патогенезе увеитов / С. Г. Семесько, Н. А. Беляков // Мед. академ. журн. — 2005. — Т. 5, № 1. — С. 33–44.

10. Современные подходы к лечению токсико-септических состояний у новорожденных детей / В. А. Таболин, Ю. Ф. Бельчик, С. И. Лазарева [и др.] // Педиатрия. — 2002. — № 1. — С. 31–35.

11. Эндотоксиновая агрессия в патогенезе бесплодия или антиэндотоксиновая составляющая ее лечения / Г. Г. Энукидзе, И. А. Аниховская, А. А. Марачев [и др.] // Бюлл. ВНИЦ РАМН. — 2005. — № 1. — С. 29–30.

12. Эндотоксиновая агрессия в патогенезе хронических неспецифических воспалительных заболеваний органов малого таза или антиэндотоксиновое направление их терапии / Г. Г. Энукидзе, И. А. Аниховская, А. А. Марачев [и др.] // Акушерство и гинекология. — 2005. — № 3. — С. 42–45.

13. Токсикологічний контроль нових засобів захисту тварин: методичні рекомендації / [М. В. Косенко, О. Г. Малик, І. Я. Коцюмбас [та ін.]. — К., 1997. — 34 с.

14. Доклінічні дослідження ветеринарних лікарських засобів / [І. Я. Коцюмбас, О. Г. Малик, І. П. Патерега та ін.] — Львів: Тріада плюс, 2006. — 360 с. Штабский Б. М. ЇК оценке кумулятивных свойств химических веществ по индексу и стандартизированному коэффициенту кумуляции / Б. М. Штабский, Ю. С. Коган // Гигиена и санитария. — 1974. — № 3. — С. 65–68.

15 ГОСТ 12.1.007-76. ССБТ.-Введ. 01.12.81. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности. — М.: Изд-во стандартов, 1982 — 6 с.

Рецензент — О. Г. Малик, д. б. н., профессор, Інститут біології тварин НААН.