

Верескунов Алексей Михайлович

**ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ И ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕЙСТВИЯ РИЦИНА**

14.00.20 - токсикология

14.00.25 - фармакология, клиническая фармакология
Автореферат

диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Санкт-Петербург 2005

Работа выполнена в 111-м Центре судебно-медицинских и криминалистических экспертиз и Военно-медицинской академии им. С.М.Кирова МО РФ

Научные руководители:

доктор медицинских наук профессор Петр Дмитриевич Шабанов

доктор медицинских наук Игорь Анатольевич Толмачев

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук профессор Виктор Константинович Бородавке

доктор медицинских наук профессор Георгий Иванович Дьячук

Ведущее учреждение: Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия

Защита состоится " " декабря 2005 года в 11.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.030.01 в Институте токсикологии ФУ Биомедэкстрем РФ (193019, г. Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, 1

. С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института токсикологии ФУ Биомедэкстрем РФ.

Автореферат разослан " " ноября 2005 года

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук Татьяна Николаевна Саватеева-Любимова

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Пектины - сложные мультидоменные белки с сахарсвязывающей активностью, которая обеспечивается карбогидрат-распознающим доменом (carbohydrate-recognition domain - CRD) (Игнатов В.В., 1995). Высокая специфичность углеводов рецепторной зоны клеток или молекулярной структуры к лектину, то есть комплементарность, лежит в основе многих важных биологических эффектов, например, каталитического действия и токсичности (Луцик М.Д. и др., 1981). Лектины содержатся в семенах различных растений и обладают широким спектром биологической активности. В частности, широко используемый в экспериментальных исследованиях фитогемагглютинин фасоли (ФГА) рассматривается как поликло-нальный активатор эффекторов иммунной системы. Под его воздействием происходит активация цитотоксической и пролиферативной активности лимфоцитов, а также усиление спонтанной продукции эндогенных биорегуляторов, в том числе провоспалительных цитокинов (Galasso I. et al., 2003). Растительные лектины характеризуются достаточно высоким уровнем токсичности, при этом самым токсичным представителем этого класса соединений является рицин. Рицин - лектин, выделяемый из семян клещевины обыкновенной. При парентеральном введении его летальные дозы для различных животных изменяются от сотых до десятых долей мг/кг массы (Ishiguro M. et al., 1992). Столь значительные различия в токсикометрических параметрах рицина обусловлены различной степенью очистки лектина, выбором лабораторных животных и путей введения токсина. В клинической практике хорошо известны случаи отравления касторовыми бобами, содержащими рицин. Клиническая картина отравления рицином напоминает бактериальную интоксикацию (пищевую токсикоинфекцию) и характеризуется повышением температуры, диареей, развитием дыхательной и почечно-печеночной недостаточности, вплоть до явлений эндотоксиноподобного шока. В ряде случаев описаны явления гемолиза и развитие геморрагического энтерита. Общность симптомов отравления рицином и бактериальной интоксикации обусловлена способностью лектинов, в том числе и рицина, связываться с рецептором липополисахаридов (бактериальных

эндотоксинов), экспрессируемых макрофагами, посредством которых инициируется каскад воспалительных реакций при участии эффекторов иммунной системы. Патоморфологические особенности отравления рицином проявляются системным геморрагическим синдромом. Токсическое действие рицина связано с ингибированием синтеза белков в рибосомах клеток-Мишеней. В литературе имеются указания на участие в патогенезе отравлений ряда эндогенных биорегуляторов, в частности провоспалительных цитокинов - пирогенных факторов (ФНО-а и ИЛ-1). В ряде исследований было установлено, что на фоне пирогенных реакций, вызываемых рицином, наблюдается повышение в крови этих цитокинов, а инкубация малых доз рицина с лимфоцитами человека вызывает усиление продукции ФНО-а и ИЛ-1. Однако, роль этих биологически активных медиаторов системной воспалительной реакции в органной и полиорганной недостаточности, а также развитии отравлений рицином практически не исследована. Кроме того, не изучены и многие другие аспекты механизма токсического действия этого лектина. И, наконец, до настоящего времени не разработаны дифференциально-диагностические признаки отравления рицином и методы идентификации в биологическом материале.

Цель исследования:

Фармакологическая и токсикологическая характеристика рицина и изучение особенностей механизма его действия.

Задачи исследования:

1. Изучить параметры острой токсичности рицина в опытах на лабораторных животных, провести сравнительную оценку симптомов интоксикации рицина, ФГА и бактериальных токсинов.
2. Провести гистохимическое исследование внутренних органов при интоксикации рицином.
3. Исследовать влияние рицина на цитотоксическую и пролиферативную активность мононуклеарных лимфоцитов крови и на продукцию цитокинов лимфоцитами крови.
4. Разработать методику идентификации интоксикации рицином.

Научная новизна. Впервые предложен метод идентификации отравлений рицином на основе повышенной экспрессии маннозных фрагментов гли-копептидов на поверхности лимфоцитов. Проведено сравнительное исследование интоксикации рицином, лектином фасоли и бактериальными токсинами; при этом исследованы патоморфологические, гистохимические и гистологические особенности поражения паренхиматозных органов при отравлении рицином. Оценено влияние рицина на функциональную активность лимфоцитов. Получены новые данные, характеризующие способность рицина индуцировать продукцию провоспалительных цитокинов.

Научно-практическая значимость. Дано описание патоморфологической картины отравления рицином. Отмечено, что рицин вызывает системный геморрагический синдром, токсическое поражение печени и почек, утолщение межальвеолярных перегородок легких. Детально изучен механизм иммунологических нарушений, развивающихся при интоксикации рицином. В частности, показано, что рицин действует как иммунотропный яд. Это проявляется истощением лимфоидных органов с образованием многочисленных апоптотических телец. При этом отмечается разрастание соединительной ткани в паренхиматозных органах, в том числе и в межальвеолярных перегородках легких (фиброз легкого) на фоне макрофагально-гистиоцитарной инфильтрации. Разработаны дифференциально-диагностические признаки интоксикации рицином и метод идентификации отравлений рицином с помощью проточной цитофлуорометрии.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Клиническая картина отравления рицином характеризуется симптомами, сходными с бактериальной интоксикацией, и проявляется нарушением функции дыхания, выраженной гипоксией и диареей. Патоморфологические особенности интоксикации рицином

проявляются резко выраженной гиперемией брюшины, полнокровием внутренних органов и кровоизлияниями во внутренних органах, ателектазами легких. Ригин вызывает системный геморрагический синдром, токсическое поражение печени и почек, утолщение межальвеолярных перегородок легких.

2. Особенностью действия ригина является разрастание соединительной ткани в паренхиматозных органах, в том числе и в межальвеолярных перегородках легких (фиброз легкого) на фоне макрофагально-гистиоцитарной инфильтрации. Ригин вызывает характерное истощение лимфоидных органов с образованием многочисленных апоптотических телец, что позволяет рассматривать его как иммунотропный яд.

3. В малых дозах ригин проявляет свойства иммуностимулирующего агента, он повышает цитотоксическую активность мононуклеарных лейкоцитов крови и индуцирует синтез провоспалительных цитокинов (ФНО-а и ИЛ-1).

4. Повышение на поверхности лимфоцитов уровня маннозных композитно-гликопептидов может служить показателем (качественной реакцией) отравления ригином, что доказано методом проточной цитофлуориметрии (повышенная экспрессия маннозных фрагментов гликопептидов).

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на научных конференциях "Актуальные вопросы судебной медицины и экспертной практики", посвященной 70-летию образования Красноярского края (Красноярск, 2004), "Лекарственные растения в фармакологии и фармации" (Барнаул, 2004), научно-практической конференции 111-го Центра судебно-медицинских и криминалистических экспертиз МО РФ (2005).

Публикации. По теме диссертации опубликованы 3 научных статьи.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 129 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, трех глав собственных исследований, обсуждения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Текст иллюстрирован 7 таблицами и 59 рисунками. Список литературы включает 170 источников, из них 14 отечественных и 156 зарубежных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реактивы. Использовали флуоресцеинизотиоцианат ("Sigma", США), диметилсульфоксид, ЭДТА, реактив Фолина, дезоксихолат натрия, D-глюкозу ("Sen/a", Германия), соли Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , NaCl , NaN_3 , NaOH , Na_2CO_3 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, виннокислый натрий и калий "хч", уксусную, соляную, трихлоруксусную кислоты квалификации "ч".

Препараты. В работе использовали T-клеточный митоген - фитогемагглютинин (ФГА) ("ПанЭко", Россия), B-клеточные митогены - ЛПС *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli* ("Sigma"), ригин ("Sigma").

Животные. В работе использовали 136 мышей линии Fl(CBAxС57BL/6) и мышей линии С57BL/6, самцов и самок, а также 35 беспородных крыс самцов массой 200-220 г и 35 беспородных кроликов самцов массой 2,5-3 кг (питомник РАМН "Столбовая" Московской области).

Изучение острой токсичности. Была изучена острая токсичность лек-тинов, которую оценивали по способности вызывать гибель животных, изменять продолжительность их жизни и проценту павших животных в течение 30 дней после введения вещества, а также по изменению массы тела животных. Токсичность лектинов изучали на мышях линии СВА и крысах. Исследуемые препараты вводили в физиологическом растворе внутрибрюшинно в дозах и режимах, указанных при описании результатов.

Выделение мононуклеаров периферической крови (МНК). МНК выделяли из стабилизированной гепарином (25 ЕД/мл) периферической крови на градиенте фикокол-верогафин ("Pharmacia", плотностью 1,077 г/см³), центрифугированием при 400 g в течение 30 минут. Лимфоидные клетки, образовавшие интерфазное кольцо, собирали

пипеткой и трехкратно отмывали в среде 199. После каждой отмывки в 10-кратном объеме среды, клетки осаждали центрифугированием при 200 g.

Оценка жизнеспособности и функциональной активности МНК. Оценку жизнеспособности и функциональной активности лимфоцитов проводили морфологическим методом - реакцией бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) традиционным способом (Самойлина Н.Л., 1970). РБТЛ осуществляли в стерильных условиях, используя ламинарный бокс с горизонтальным потоком воздуха (Juan VFS 906). Среду с клеточной взвесью вносили в лунки 24-луночного культурального плоскодонного планшета (Costar) по 1 мл на лунку, затем добавляли митогены. Планшеты помещали в CO₂-инкубатор (37°C, 5% СС₂). В работе использовали диапазон концентраций от 5 до 20 мкг/мл. По окончании инкубации (72 ч) часть клеточной суспензии собирали в пробирки, осаждали центрифугированием (200 g, 10 мин), отмывали 10%-ной уксусной кислотой и снова центрифугировали. Осадок ресуспендировали в 20 мкл метанола и переносили на предметные стекла. Препараты окрашивали по Романовскому. Учет результатов проводили в световом микроскопе JENAMED-2 путем подсчета процента властных клеток при просмотривании 300-500 клеток. Результат выражали как индекс стимуляции (ИС), представляющий собой отношение процента властных клеток в стимулированной митогеном культуре лимфоцитов к проценту спонтанных бластных форм в контрольной культуре без добавления митогена.

Культирование клеток K-562 и Colo. Клетки опухолевой линии K-562 (эритробластный лейкоз человека) и Colo (колоректальный рак человека) культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением глутамина, 5% фетальной сыворотки плода крупного рогатого скота и тентамицина. Среду заменяли через 72 ч инкубации при 37°C и 4% CO₂.

Цитологическое исследование. № взвеси МНК печени готовили мазки, фиксировали метиловым спиртом и окрашивали РНК по Браше с контрольной обработкой РНК-азой.

Проточная цитометрия (FACS-анализ) и характеристика антител. Определение экспрессии поверхностных маркеров МНК проводили при помощи моноклональных антител против соответствующих антигенов (Caltag Laboratories, США), результаты учитывали методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитофлуориметре FACScan (Becton Dickinson, США). На МНК исследовали уровни экспрессии рецепторов. Гейт (окно) популяции клеток устанавливали на основе комбинации прямого и бокового светорассеяния и размера клеток. При учете результатов подсчитывали 10000 событий в гейте. Статистическую обработку материала проводили при помощи программного пакета WINMDI 2.8.

Определение гемагглютинирующей активности. Гемагглютинирующую активность проводили на эритроцитах человека. С этой целью к 1 мл донорской крови, содержащей ЭДТА, добавляли 9 мл физиологического раствора и центрифугировали 10 мин при 3000 g. Затем осадок ресуспендировали в 10 мл физиологического раствора и затем повторно центрифугировали в тех же условиях. Процедуру повторяли трижды. К осадку эритроцитов добавляли физиологический раствор в таком количестве, чтобы доля эритроцитов составляла 4% по объему (примерно 11 мл). В круглодонную 96-луночную плашку, содержащую 100 мкл физиологического раствора и различные концентрации лектина, добавляли 10 мкл 4%-ной суспензии эритроцитов. Содержимое лунок перемешивали и оставляли на 1 ч при 40°C. Агглютинацию эритроцитов регистрировали визуально (6А). Изучения гемагглютинирующей активности лектинов проводили также и на эритроцитах кролика.

Мечение лектинов флуоресцеинизотиоцианатом. Исходно раствор лектина хранился в 0,15 М раствора NaCl в 0,01 М фосфатном буфере (pH 7,2) с добавлением азида натрия до конечной концентрации 0,1% в концентрации 8 мг белка на мл. Для мечения брали 0,5 мл раствора и доводили этим же буфером объем до 2,5 мл. Этот объем наносили на колонку PD-10, уравновешенную 0,1 М карбонатным буфером pH 9,3. Белок элюировали 3 мл карбонатного буфера. Таким образом, был получен раствор белка с концентрацией в

пределах 0,5-2 мг/мл. 1 мг флуоресцеинизотиоцианата растворяли в 1 мл диметилсульфоксида и добавляли к раствору белка из расчета 25 мкл на мл буфера. Раствор перемешали и оставили на ночь при 40°C. По окончании инкубации к раствору добавляли 100 мкл 0,5М раствора хлорида аммония и оставили в прежних условиях при 40°C на 2 ч. Затем лектин переводили в исходный буфер с добавлением азида натрия до конечной концентрации 0,1%. Окраску клеток меченым лектином проводили по методике, аналогичной методике с антителами.

Электрофорез белков. Для определения молекулярной массы мономеров использовали электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии до-децилсульфата натрия и 2-меркаптоэтанола. Полипептидные цепи связывают додецилсульфат натрия равномерно. При этом комплекс приобретает сильный отрицательный заряд. Собственный суммарный заряд нативного белка маскируется, а отношение заряда к массе становится практически постоянным. В результате при электрофорезе в полиакриламидном геле комплексы мигрируют в соответствии с молекулярной массой (7А).

Цитотоксический тест. Это чувствительный колориметрический метод измерения оптической плотности (ОП) с помощью витального красителя МТТ (3-[4,5-диметилтриазола-2-ил]-2,5-дифенил тетразолия бромид) ("Sigma", МТТ, М 2128), который позволяет быстро измерить результаты. Метод основан на избирательной способности живых клеток восстанавливать МТТ в формазан митохондриями. Образовавшиеся кристаллы формазана фиолетового цвета растворяются в ДМСО.

Исследование уровня цитокинов. Определяли содержание ИЛ-1, ИЛ-2, ФНО-а, а- и у-интерферонов в сыворотке крови, а также их спонтанной и индуцированной продукции методом твердофазного иммуноферментного метода (ИФА) с использованием коммерческих тест-систем фирмы "РгоСоп" (Россия). Спонтанную продукцию цитокинов оценивали после 24 ч инкубации разведенной в 10 раз РКС цельной крови при 37°C в атмосфере с 5% СО₂. Индуцированная продукция цитокинов осуществляется в аналогичных условиях с добавлением биологически активных соединений: ФГА в оптимальной конечной концентрации 3-5 мкг/мл (для ИЛ-1, ФНО-а, ИЛ-6), вирус болезни Ньюкасла 10 (-1) для индукции ИФН-а и Са-ионофор в конечной концентрации 100 нг/мл для индукции ИФН-у.

Метод вычисления LD₅₀. LD₅₀ определяли с использованием компьютерной программы "BIOSTAT".

Статистическая обработка результатов. Обработку результатов проводили с помощью метода вариационной статистики, используя t-критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Изучение острой токсичности рицина на лабораторных животных

Для исследования брали три партии пектинов. Чистоту контролировали электрофоретическим методом при нанесении образцов на полоску электрофореза с максимальной нагрузкой по белку (около 100 мкг препарата на дорожку), при этом не было зарегистрировано никаких дополнительных белковых полос, что соответствует примерно 99% чистоте белка. Белок растворяли в ампульном физиологическом растворе до конечной концентрации 0,005 г на 1 мл физиологического раствора.

Исследование токсичности рицина на мышах было исследовано в диапазоне доз 0,1 мг/кг - 0,0001 мг/кг. В дозе 0,1 мг/кг у животных наблюдались признаки интоксикации в виде адинамии и диспноэ, которые начинали проявляться через 3 ч после введения, а летальные эффекты развивались в течение 6-10 ч. Внутривентральное введение рицина в дозе 0,01 мг/кг вызывало гибель животных в течение суток. При этом у животных наряду со снижением двигательной активности и груминга, отмечали пилоэрекцию и выраженное затруднение дыхания с явлениями ортопноэ, Уменьшение воздействующих доз до 0,005 мг/кг приводило к гибели 100% животных на 2-3 сут после внутривентральной инъекции

на фоне нарастания угнетения двигательной активности, диареи и затруднения дыхания. К 3 сут дыхание приобретало терминальный характер, и животные занимали боковое положение. В дозе 0,002 мг/кг первые случаи гибели животных отмечены на 3 сут, на 4-5 сут погибли все мыши этой группы. В меньшей дозе 0,001 мг/кг была зарегистрирована частичная (30%) гибель животных на 3-5 сут. У выживших мышей в течение 10 дней отмечали снижение двигательной активности, пилоэрецию. При введении рицина в дозе 0,0001 мг/кг не было отмечено гибели животных, а также признаков интоксикации. В последующие сроки наблюдения (в течение 1 мес) состояние животных не отличалось от контрольной группы. Средне-смертельная доза (ЛД₅₀) для мышей составила 0,0023 (0,0012-:0,0035) мг/кг. Токсическое действие сублетальных доз (0,001-0,00001 мг/кг) позволило установить, что достоверное токсическое действие по интегральному показателю - снижению массы тела - отмечалось у выживших животных только при действии рицина в дозе 0,001 мг/кг. В этих условиях масса тела через 30 дней после однократного введения лектина уменьшалась в среднем на 18,8%. При меньших уровнях воздействующих концентраций, хотя и отмечалась тенденция к уменьшению массы тела, изменения имели недостоверный характер.

У крыс рицин в дозе 0,1 мг/кг внутрибрюшинно вызывал 100% гибель в течение 1 сут. Через 2-3 ч у животных отмечали адинамию, отсутствие груминга, диарею, первые летальные эффекты были зарегистрированы через 4 ч после введения. При введении рицина в дозе 0,01 мг/кг отмечали аналогичные симптомы интоксикации. Однако первые признаки отравления в виде снижения двигательной активности и агрегации животных отмечали через 24 ч после инъекции. В последующие сутки признаки отравления нарастали и в течение 48 ч регистрировали гибель всех особей данной группы. Меньшие дозы рицина (0,005 мг/кг), несмотря на выраженные проявления интоксикации, вызывали частичную гибель животных (3 особи из 8), при этом токсические эффекты имели отсроченный характер и достигали своего максимума на 2-3 сут после введения вещества. Летальные эффекты наступали на 3-4 сут. В дозе 0,001 мг/кг рицин не вызывал гибели животных в течение 30 сут наблюдения. В первые сутки отмечались лишь незначительные признаки интоксикации в виде снижения двигательной активности и изменения состояния волосяного покрова кожи. ЛД₅₀ рицина для крыс при внутрибрюшинном введении составила 0,0078 (0,052-:0,0104) мг/кг.

Учитывая литературные данные о сходстве клинической картины отравления рицином с инфекционной интоксикацией, в качестве препаратов сравнения были использованы липополисахариды *E. Coli* (ЛПСс) и *Klebsiella pneumoniae* (ЛПСк), а также сходный по химической природе лектин - фито-гемагглютинин фасоли (ФГА). В частности, ФГА не вызывал выраженного затруднения дыхания, в отличие от ЛПС, а диарея была характерна главным образом для отравления ЛПСк.

Патоморфологические особенности отравления рицином

Наиболее выраженные патоморфологические изменения внутренних органов наблюдали у животных через 8-10 ч после введения рицина в максимальной дозе (0,1 мг/кг). У мышей и крыс отмечали резкую гиперемию брюшины с извитыми наполненными кровью сосудами, были видны многочисленные петехиальные кровоизлияния. Отмечали выраженное полнокровие внутренних органов. Печень была увеличена в размере, полнокровна, под капсулой и на разрезе отмечали точечные и сливные кровоизлияния.

Селезенка и тимус были гиперемированы, плотной консистенции, с участками кровоизлияний. В паренхиме почек отмечалось повышенное кровенаполнение и точечные кровоизлияния. Наиболее выраженными были изменения в легких. В легких были видны участки массивных кровоизлияний и ателектазов. При надавливании на паренхиму легких на разрезе выделялось значительное количество слизи. Ткань легкого, особенно участки ателектазов, обладали пониженной воздушностью, что подтверждалось при проведении плавательной пробы. Дозы 0,005-0,02 мг/кг приводили к гиперемии и точечным

кровоизлияниям в паренхиматозных органах. У животных при действии нелетальных доз не было выявлено изменений внутренних органов.

При отравлении ФГА и ЛПС у животных не наблюдали столь выраженной тотальной гиперемии брюшины и внутренних органов. При этом для каждого из препаратов сравнения были характерны свои особенности. В частности, ФГА в меньшей степени, по сравнению с ЛПС, поражал легкие. В то же время ЛПСс, не вызывая выраженных геморрагических проявлений в легких, приводил к формированию в паренхиме участков печеночения, тогда как ЛПСк вызывал тотальное имбибирование легочной ткани кровью.

Гистологическое и гистохимическое исследование отравлений рицином

Гистологическое исследование показало, что при введении рицина в дозе 0,001 мг/кг печень имела обычное строение. Печеночные дольки выражены, гепатоциты с гомогенным цитоплазмой, сосуды содержали незначительное количество крови. В легких отмечали незначительную гиперемию, изменений легочной ткани не было обнаружено. Селезенка имела обычное строение, в белой пульпе фолликулы крупные, заметна центральная и маргинальная зоны, зона мантии менее выражена. В белой пульпе синусы не выражены, присутствовало небольшое количество крови. Сердечная мышца не была изменена, кровенаполнение сосудов сердца незначительное. В ткани почки изменений обнаружено не было.

Рицин в дозе 0,01 мг/кг вызывал в печени умеренное полнокровие сосудов с явлениями точечных кровоизлияний, в гепатоцитах имела место очаговая гидропическая дистрофия. В легочной ткани обнаруживали гиперемии и утолщение межальвеолярных перегородок. Резкое полнокровие сосудов селезенки и скопление свободных эритроцитов было отмечено как в фолликулах, так и в красной пульпе. Усилено кровенаполнение сосудов сердца. В почке отмечали незначительное полнокровие сосудов. Наиболее выраженные изменения возникали при воздействии дозы 0,1 мг/кг. В печени наблюдали выраженную гиперемию сосудов, дисконплекцию дольчатого строения, во многих местах имелись обширные кровоизлияния.

Отмечали выраженное полнокровие и кровоизлияния в паренхиму легких. В селезенке на фоне атрофии фолликулов регистрировали массивные геморрагии. Миокард наряду с полнокровием имел участки кровоизлияний.

При воздействии рицина в дозе 0,1 мг/кг отмечали наименьшие изменения в виде умеренного полнокровия сосудов и дистрофии в клубочках и канальцах почек.

Полученные результаты подтвердили высокую острую токсичность рицина. Сроки гибели животных (мышей) существенно зависели от дозы. При воздействии рицина в дозе 5 ЛД₅₀ летальные эффекты наступали уже через несколько часов после введения. В меньших уровнях летальных доз смерть животных регистрировали через 3-4 сут. Проведенное гистологическое исследование свидетельствовало, что рицин вызывает у животных кровоизлияния в паренхиматозных органах, выраженность которых носит дозозависимый характер. Патологические изменения были наиболее выражены в печени, легких и селезенке, при этом наряду с геморрагическим синдромом отмечалась дистрофия гепатоцитов и атрофия фолликулов селезенки.

На следующем этапе работы было проведено более подробное и гистологическое и гистохимическое исследование паренхиматозных органов крыс и мышей при интоксикации рицином в сравнении с отравлениями, вызванными ФГА и ЛПС.

В селезенке интактных мышей к крыс было отчетливо видно разделение белой и красной пульпы, хорошо выражены все зоны фолликулов, при окрашивании гематоксилином и эозином и азуром и эозином. ШИК-реакция была слабо положительной. При окраске альцианом-синим вокруг капсулы и сосудов были видны слабо выраженные соединительнотканые волокна. При отравлении рицином, окрашивание селезенки животных гематоксилином и эозином позволяло констатировать, что белая пульпа теряла четкие границы.

Отмечалось множественное скопление лимфоцитов в красной пульпе. Белая пульпа

выглядела резко обедненной лимфоцитами. Встречалось большое количество фрагментов лимфоцитов (апоптотические тела). Особенно была оголена маргинальная зона и практически отсутствовали типичные реактивные центры. В ткани селезенки отмечалось большое количество макрофагов, многие из которых содержали пигментные включения сероватого цвета с бурым оттенком. Окраска азуром и эозином позволяла выявить в селезенке мышей и крыс оголение маргинальной зоны фолликулов селезенки, множество темных мелких фрагментов, расположенных в области кровоизлияний и в просветах сосудов, а также в виде фагоцитированных частиц в макрофагах. В ткани селезенки отмечалось выраженное полнокровие красной пульпы, были видны многочисленные диапедезные кровоизлияния, в просветах крупных и мелких сосудов была видна выраженная агрегация эритроцитов по типу внутрисосудистой коагуляции крови ("сладж" крови). Вокруг фолликулов регистрировалось выраженное концентрическое разрастание соединительной ткани (коллагеновых волокон). При изучении ШИК-реакции была хорошо видна оголенная маргинальная зона фолликулов, лимфоидная ткань замещалась макрофагами, с многочисленными включениями серо-бурых частиц. Соединительная ткань с ШИК-положительным компонентом прослеживалась во всех участках селезенки. При окрашивании ШИК с амилазой в участках разрастания соединительной ткани выявлялись нейтральные амингликаны.

Окрашивание альцианом-синим на коллагеновые волокна подтверждало разрастание соединительной ткани вокруг фолликулов и сосудов, а также в других участках селезенки. При воздействии ФГА в селезенке у крыс отмечалось разрастание белой пульпы, в фолликулах исчезали реактивный центр и маргинальные зоны.

Разделение красной и белой пульпы было нечеткое. ШИК-положительный компонент был выражен слабо и практически не выявлялся при обработке амилазой, что свидетельствовало о незначительном количестве соединительнотканых элементов в селезенке. При интоксикации ЛПСс в паренхиме селезенки отмечались крупные фолликулы без маргинальных зон и реактивных центров и четкого разделения белой и красной пульпы. В препаратах селезенки в данных условиях не было выявлено разрастания соединительной ткани. Аналогичная гистологическая картина была отмечена в селезенке у крыс при воздействии летальных доз ЛПСк и ФГА.

Не менее выраженные изменения отмечались при отравлении в дозе 5 ЛД₅₀ и в другом центральном органе иммунной системы - тимусе.

У интактных животных отмечалось характерное дольчатое строение тимуса, четкое разделение коркового и мозгового вещества и небольшое количество соединительной ткани, о чем свидетельствовала слабая ШИК-положительная реакция и окраска на коллагеновые волокна альцианом-синим.

У пораженных животных наблюдалось выраженное тяжелое полнокровие сосудов с характерной внутрисосудистой агрегацией эритроцитов. В ткани тимуса были видны многочисленные кровоизлияния. Корковое и мозговое вещество тимуса были значительно обеднены лимфоидными элементами, хорошо просматривались стромальные клетки. Отмечался выраженный апоптоз

лимфоцитов. Встречалось большое количество бурых частиц, особенно в крупных сосудах, на фоне резко выраженной агрегации эритроцитов.

На фоне гибели лимфоцитов увеличивалось количество макрофагов, ряд из которых имел бурые включения в цитоплазме. В тимусе редко встречались тельца Гассала небольшого размера. В корковом веществе отмечалось большое количество липоцитов. При окрашивании ШИК с последующей обработкой амилазой на фоне стирания границ между мозговым и корковым веществом выявлялся ШИК-положительный компонент в соединительной ткани. При окрашивании альцианом-синим хорошо выявлялись кислые ами-ногликаны в соединительной ткани. При воздействии на организм животных ФГА в тимусе наблюдались незначительные изменения в виде стирания границ между корковым и мозговым веществом и были отмечены явления агрегации эритроцитов в крупных

сосудах.

В печени интактных животных выявлялась типичная картина, при этом был выражен ШИК-положительный компонент, свидетельствующий о наличии в гепатоцитах гликогена.

При окрашивании альцианом-синим выявлялись соединительнотканые элементы вокруг сосудов. У крыс и мышей, отравленных летальной дозой рицина, в паренхиме печени отмечалось полнокровие сосудов различных калибров (от крупных до капилляров синусов). Наблюдались эритроцитар-ные стазы, внутрисосудистая агрегация эритроцитов ("сладж-феномен"). В портальных трактах выявлялась лимфоцитарно-гистиоцитарная инфильтрация. В цитоплазме многочисленных гистиоцитов и макрофагов был виден серо-бурый пигмент. Многие гепатоциты были вакуолизированы, или подвергались некробиотическим изменениям (гепатоциты с "мутными" ядрами).

Отмечалась гидроимическая и мелкоочаговая жировая дистрофия гепатоцитов. При окрашивании гематоксилином и эозином были хорошо видны темные включения в клетках ретикуло-эндотелиальной системы и внутри сосудов на фоне резко выраженной агрегации эритроцитов. ШИК-положительный компонент в паренхиме печени практически не выявлялся, что свидетельствовало об отсутствии гликогена. В печени животных, пораженных ФГА, отмечались незначительные явления дистрофии гепатоцитов и агрегация эритроцитов в крупных сосудах. Выявлялась ШИК-положительная реакция гепатоцитов. При интоксикации ЛПС отмечалось полнокровие сосудов печени и умеренная дистрофия гепатоцитов.

В легочной ткани интактных животных отмечали, наряду с характерными особенностями паренхимы, инфильтрация бронхов различного калибра. ШИК-положительный компонент отмечался в участках соединительной ткани. В легких у животных, получивших летальную дозу рицина, наблюдали тяжелое полнокровие всех сосудов с явлениями внутрисосудистой коагуляции крови, при этом лимфоидная инфильтрация бронхов была выражена слабее, чем у интактных особей.

Отмечался отек ткани легкого, отдельные бронхи были спавшимися, в просвете ряда бронхов наблюдались крупные скопления эритроцитов и слизи (десквамация эпителия) и тотальный диапедез эритроцитов. В отдельных участках легочной ткани имелись очаговые кровоизлияния. Межальвеолярные перегородки были утолщены, инфильтрированы лимфоцитами и макрофагами, ШИК-положительный компонент был резко выражен. Наблюдались темные включения в макрофагах и частицы бурого цвета в участках скопления эритроцитов. При окраске альцианом-синим в утолщенных межальвеолярных перегородках были отчетливо видны волокна соединительной ткани (кислые аминогликаны). При поражении ФГА у животных в легких отмечали умеренное полнокровие и явления агрегации эритроцитов в крупных сосудах.

В отдельных бронхах содержалась слизь. Толщина альвеол была различной, встречались участки с утолщенными межальвеолярными перегородками, которые были инфильтрированы лимфоцитами и макрофагами. Интоксикация ЛПСс вызывала выраженные явления бронхоспазма. Бронхи были заполнены большим количеством слизи. Наблюдались большие поля спавшихся альвеол -дистелектазы (опеченение легкого). Были видны гиалиновые тромбы в сосудах. Летальные дозы ЛПСк в отличие от ЛПСс вызвали тотальные кровоизлияния в паренхиму органа, при этом альвеолы были практически полностью заполнены кровью. В отличие от действия рицина, при интоксикации ЛПСк; не наблюдали утолщения межальвеолярных перегородок и выраженной агрегации эритроцитов по типу "сладж-феномена".

Таким образом, при отравлении рицином в паренхиматозных органах развивались характерные изменения в виде полнокровия сосудов и геморрагического синдрома, которые могли проявляться в дозах, не вызывающих явной клинической картины отравления, что может рассматриваться как дифференциально-диагностические признаки для идентификации интоксикации рицином.

Почки у интактных животных имели обычное строение с умеренно выраженной ШИК-положительной реакцией. Кислые аминоклики выявлялись в клубочках. При действии рицина в почках отмечалась незначительная лимфоидная инфильтрация, сосуды клубочков были полнокровны, эритроциты агрегированы. Наблюдалась гидropическая дистрофия эпителия. Во многих канальцах в проксимальных участках встречались некротизированные эпителиальные клетки. Группы канальцев были заполнены в просветах белковыми массами. Отмечался достаточно выраженный ШИК-положительный компонент и более выраженная, чем у интактных особей реакция на аминоклики в соединительной ткани вокруг клубочков. ФГА и ЛПС вызывали весьма умеренные дистрофические изменения в ткани почки, при действии ЛПСк отмечали участки кровоизлияний без явлений агрегации эритроцитов.

В спинном мозге у животных после введения рицина наблюдалась очаговая дистрофия и незначительная инфильтрация лимфоидными элементами.

Полученные результаты позволяют заключить, что в летальных дозах рицин вызывал выраженные геморрагические изменения в паренхиматозных органах, которые были наиболее развиты в печени, легких, селезенке и тимусе. Обнаруженные изменения паренхимы легких могут быть расценены как дисстресс-синдром, который проявляется утолщением межальвеолярных перегородок за счет разрастания соединительной ткани. Кроме того, нарушения функции дыхания было обусловлено явлениями бронхоспазма с выделением в просвет бронхов слизи и крови, а также участков ателектазов легкого и нарушение воздушности ткани легкого.

Печеночная недостаточность была обусловлена дистрофией гепатоцитов и диапедезом эритроцитов в венозных синусах. О токсическом действии на печень рицина свидетельствовало также ее обеднение гликогеном. Гистологическая картина почек у животных, пораженных этим лектином, может быть расценена как токсическая тубулопатия. Особенностью отравления рицином являлась резко выраженная агрегация эритроцитов не только в зоне кровоизлияний, но и внутри сосудов различных калибров. Весьма характерным для отравления рицином оказались нарушения в центральных органах иммунной системы - тимусе и селезенке. Наряду с геморрагическим синдромом в этих органах наблюдалось резкое обеднение лимфоцитами и замещение лимфоидной ткани фолликулов макрофагами, гистиоцитами и соединительной тканью. О гибели лимфоцитов свидетельствовали фрагменты иммунокомпетентных клеток - апоптотические тельца. Данные нарушения свидетельствовали о состоянии глубокой иммуносупрессии и акцидентальной инволюции тимуса. Эти проявления соответствовали синдрому диссеминированной внутрисосудистой коагуляции крови (ДВС-синдром, или "сладж"). Изменения в нервной ткани в виде дегенеративных процессов, вероятно, имело вторичное гипоксическое происхождение. Основной причиной гибели при отравлении рицином следует считать полиорганную недостаточность.

Действие рицина, несмотря на общность клинической картины интоксикации с ФГА и бактериальными токсинами, имело ряд характерных особенностей, которые вызваны изменениями в паренхиматозных органах. Прежде всего, это системный геморрагический синдром с явлениями внутрисосудистой агрегации крови, разрастание соединительной ткани в ряде внутренних органов и резко выраженное обеднение лимфоидными элементами с образованием апоптотических телец иммунных органов - селезенки и тимуса. Эти нарушения позволяют отнести рицин к иммунотропным ядам.

Механизм инициируемой рицином иммуносупрессии до настоящего времени не описан. Однако известно, что лектины, выделенные из различных растительных источников, являются мощными активаторами клеток иммунной системы и индукторами синтеза эндогенных биорегуляторов, в частности провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ-1, ФНО-а и ИНФ-у. Избыток этих биологически активных пептидов может вызывать нарушения внутренних органов, приводить к системной воспалительной реакции и полиорганной недостаточности, нарушать проницаемость сосудов. Кроме того,

ФНО-а и ИНФ-у, могут вызывать программируемую гибель лимфоцитов (апоптоз). Сведения об иммуотропном действии рицина весьма малочисленны и противоречивы, поэтому представлялось целесообразным провести исследование его влияния на эффекторы им.мунокомпетентной системы с целью уточнения механизма действия токсина.

Изучение действия рицина на эффекторы иммунной системы

В настоящем разделе описаны результаты исследований по влиянию рицина на функциональную активность мононуклеарных клеток крови (лимфоцитов, моноцитов и макрофагов) человека, а также способности рицина индуцировать продукцию провоспалительных цитокинов в опытах *in vitro* и *in vivo*. В качестве препаратов сравнения были использованы родственные по химическому строению лектины фасоли (ФГА) - поликлональный активатор эффекторов иммунитета и бактериальный ЛПСк.

Влияние рицина на цитотоксичность лимфоцитов периферической крови здоровых доноров

В специальной серии экспериментов было изучено влияние рицина в сравнении с ФГА и ЛПС на цитотоксическую активность мононуклеаров периферической крови здоровых доноров. Были использованы десятикратные разведения фитогемагглютина (ФГА), ЛПС и рицина. При этом их исходные концентрации составили 10 мкг/мл - для ФГА, 10 мг/мл - для ЛПС гороха и 0,1 мг/мл - для рицина. В качестве клеток мишеней была использована лейкозная клеточная линия K562. Исходное содержание как эффекторов (МНК), так и клеток-мишеней составило 1,5-10⁶ кл/мл среды. Для выявления цитотоксической активности клеток использовали тест восстановления 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромида (МТТ-тест), который является одним из основных нерадиометрических методов оценки жизнеспособности и пролиферативной активности клеток. Результаты цитотоксического действия 72-часовых культур мононуклеаров здоровых волонтеров на лейкозные клетки линии K562 в присутствии лектинов ЛПС представлены в табл. 1.

Проведенные эксперименты выявили резкое повышение цитотоксичности мононуклеаров периферической крови у здоровых доноров по отношению к лейкозным клеткам-мишеням K562 в присутствии низких концентраций лектинов. Возможно, что исследуемые лектины через связывание рецепторного аппарата клеток-эффекторов вызывают активацию последних и усиливают цитотоксический эффект.

При двукратных разведениях исходной взвеси мононуклеарных клеток у здоровых доноров отмечалось закономерное снижение их цитотоксической активности по отношению к клеткам-мишеням колоректального рака. Однако значения активности мононуклеарных клеток под воздействием лектинов также были повышены по сравнению с не стимулированными культурами.

При стимуляции МНК ФГА максимальные значения цитотоксичности наблюдались при минимальном разведении эффекторов в присутствии 10 мкг/мл лектина. А минимальные значения цитотоксичности - при восьмикратном разведении взвеси МНК в той же концентрации ФГА. В данном случае дозозависимого эффекта не наблюдалось.

ЛПС также вызывал статистически значимый цитотоксический эффект МНК по отношению к клеткам колоректального рака. Однако в минимальных концентрациях значения цитотоксичности приближались к контрольным. В этом случае цитотоксичность мононуклеаров зависела от содержания в культуре клеток лектина. Аналогичную картину наблюдали с рицином. РИЦИН также стимулировал цитотоксичность мононуклеаров в невысоких концентрациях.

Для выявления собственного влияния рицина на эффекторы и клетки-мишени клеточную культуру мононуклеаров и опухолевых линий K562 и колоректального рака культивировали в течение 72 ч в присутствии различных концентраций рицина. Было выявлено, что в низких дозах рицин сам по себе не оказывал цитотоксического эффекта ни на клетки-эффекторы здоровых доноров, ни на клетки-мишени опухолевых линий

(K562 и колоректального рака). По отношению к мононуклеарам цитотоксичность рицина была несколько ниже, чем в контроле.

Действие рицина, ФГА и ЛПС на пролиферативную активность МНК

Учитывая тот факт, что домен А рицина (265 аминокислотных остатков), проникая в клетку, инактивирует ферменты рибосом, вследствие чего нарушается внутриклеточный синтез белков (трансляция), интерес представлял изучение его влияния на пролиферативную активность лимфоцитов периферической крови здоровых доноров. Для решения этой задачи была произведена оценка собственного влияния лектинов растительного происхождения на митогенез лимфоцитов.

Было показано, что процент содержания бластных форм при добавлении лектинов в диапазоне доз от 5 до 20 мкг/мл при 72-часовой инкубации мононуклеаров периферической крови в полной среде культивирования в несколько десятков раз превышал таковые в контрольных культурах. Это свидетельствует о том, что каждый из исследуемых лектинов, в том числе и ривин, проявлял собственный митогенный эффект. С увеличением дозировок фитогемагглютинаина постепенно увеличивалось содержание бластных формлярных перегородках были отчетливо видны волокна соединительной ткани (кислые аминогликаны). При поражении ФГА у животных в легких отмечали умеренное полнокровие и явления агрегации эритроцитов в крупных сосудах.

В отдельных бронхах содержалась слизь. Толщина альвеол была различной, встречались участки с утолщенными межальвеолярными перегородками, которые были инфильтрированы лимфоцитами и макрофагами. Интоксикация ЛПСс вызывала выраженные явления бронхоспазма. Бронхи были заполнены большим количеством слизи. Наблюдались большие поля спавшихся альвеол - дистелектазы (опеченение легкого). Были видны гиалиновые тромбы в сосудах. Летальные дозы ЛПСк в отличие от ЛПСс вызывали тотальные кровоизлияния в паренхиму органа, при этом альвеолы были практически полностью заполнены кровью. В отличие от действия рицина, при интоксикации ЛПСк; не наблюдали утолщения межальвеолярных перегородок и выраженной агрегации эритроцитов по типу "сладж-феномена".

Таким образом, при отравлении рицином в паренхиматозных органах развивались характерные изменения в виде полнокровия сосудов и геморрагического синдрома, которые могли проявляться в дозах, не вызывающих явной клинической картины отравления, что может рассматриваться как дифференциально-диагностические признаки для идентификации интоксикации рицином.

Почки у интактных животных имели обычное строение с умеренно выраженной ШИК-положительной реакцией. Кислые аминогликаны выявлялись в клубочках. При действии рицина в почках отмечалась незначительная лимфоидная инфильтрация, сосуды клубочков были полнокровны, эритроциты агрегированы. Наблюдались гидropическая дистрофия эпителия. Во многих канальцах в проксимальных участках встречались некротизированные эпителиальные клетки. Группы канальцев были заполнены в просветах белковыми массами. Отмечался достаточно выраженный ШИК-положительный компонент и более выраженная, чем у интактных особей реакция на аминогликаны в соединительной ткани вокруг клубочков. ФГА и ЛПС вызывали весьма умеренные дистрофические изменения в ткани почки, при действии ЛПСк отмечали участки кровоизлияний без явлений агрегации эритроцитов.

В спинном мозге у животных после введения рицина наблюдалась очаговая дистрофия и незначительная инфильтрация лимфоидными элементами.

Полученные результаты позволяют заключить, что в летальных дозах ривин вызывал выраженные геморрагические изменения в паренхиматозных органах, которые были наиболее развиты в печени, легких, селезенке и тимусе. Обнаруженные изменения паренхимы легких могут быть расценены как дистресс-синдром, который проявляется утолщением межальвеолярных перегородок за счет разрастания соединительной ткани. Кроме того, нарушения функции дыхания было обусловлено явлениями бронхоспазма с

выделением в просвет бронхов слизи и крови, а также участков ателектазов легкого и нарушение воздушности ткани легкого. стимуляции (ИС). В диапазоне доз от 5 до 15 мкг/мл при инкубации моно-нуклеаров в присутствии лектина гороха также увеличивалось содержание бластных клеток, и индекс стимуляции аналогично возрастал. Однако при концентрации 20 мкг/мл количество бластных клеток по сравнению с предыдущей культурой не только не повышалось, а несколько снижалось.

При этом индекс стимуляции снижался практически вдвое. Аналогичная картина наблюдалась при культивировании МНК в присутствии рицина. Известно, что сигнал пролиферации, включаемый через рецепторный комплекс TCR-CD3, равно как и сигналы активации, связанные с лектиновыми рецепторами, благодаря активации мембранных тирозинкиназ, а затем фос-фолипазы C, разделяются на два пути, инициируемые разными продуктами расщепления фосфоинозитолов. Образующийся при этом инозитолтрифосфат обуславливает мобилизацию ионов Ca^{2+} активацию Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой протеинфосфатазы каппациневрина и, в конечном счете, - формирование транскрипционного димерного фактора AP-1. Другой инозитид - диацилглицерин - активирует протеинкиназу C и обуславливает включение каскада активации протеинкиназ, завершающейся экспрессией генов c-fos и c-jun и димеризацией их продуктов с формированием другого транскрипционного фактора NF-AT. При участии AP-1 и NF-AT индуцируется экспрессия генов ИЛ-2 и его рецептора, что служит проявлением активации Т-клеток и предпосылкой их вступления в митоз.

Таким образом, эксперименты выявили, что ригин в минимальных концентрациях обладает выраженным иммуностимулирующим действием, оказывая стимулирующее влияние на цитотоксичность и пролиферативную активность моноклеарных лейкоцитов. По характеру иммуностимулирующего действия ригин не отличается от известного поликлонального активатора эффекторов иммунитета ФГА. Аналогичным с лектином активирующим эффектом на МНК обладает и ЛПС. Сходство эффектов, очевидно, обусловлено общностью механизма иммуномодулирующего действия лектинов, в частности ФГА и бактериальных токсинов, реализующих свои эффекты посредством активации макрофагом в результате взаимодействия с одним и тем же ЛПС-рецептором (CD14⁺). Вполне вероятно, что ригин, являясь по своей природе, как и ФГА, лектином, способен связываться с означенным рецептором макрофагов и запускать каскад реакций, приводящих к активации клеток иммунокомпетентной системы. Механизм иммуностимулирующей активности ФГА и ЛПС, как известно, в значительной степени обусловлен их способностью индуцировать синтез и секрецию спектра регуляторных пептидов и, прежде всего, провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ-1, ФНО-а, ИНФ-у. Эти эндогенные биологически активные вещества, как известно, не только участвуют в процессах регуляции иммунной системы, но играют важную роль в развитии типовых патологических состояний, таких как системная воспалительная реакция, полиорганная недостаточность, сепсис, респираторный дис-стресс синдром и др. Отмеченные цитокины также могут приводить к нарушению сосудистой проницаемости, изменению реологических свойств крови и вызывать апоптоз клеток. Учитывая тот факт, что многие из этих патологических реакций имели место при отравлении ригином, представлялось необходимым исследовать способность рассматриваемого лектина влиять на спонтанную продукцию цитокинов МНК крови.

Влияние лектинов и бактериального липополисахарида на продукцию цитокинов моноклеарными лейкоцитами человека

В настоящем разделе исследовали влияние рицина, в сравнении с ФГА и ЛПС, в широком диапазоне концентраций (5-20 мкг/мл) на спонтанную продукцию провоспалительных цитокинов: фактора некроза опухоли (ФНО-а) и интерлейкина-1 (ИЛ-1) и интерферона-у (ИНФ-у). Изучение проводили с использованием коммерческих тест-систем методом иммуоферментного анализа. Ригин в минимальных концентрациях вызывает достоверное повышение продукции ИНФ-у, ФНО-а и ИЛ-1 по сравнению с

контрольной серией опытов. По своей способности стимулировать синтез и высвобождение цитокинов из МНК крови ризин превосходит ФГА и ЛПС, при этом эффект максимальной индукции для ризина отмечается в более низких концентрациях по сравнению с ФГА и ЛПС. Известно, что природные лектины (ФГА, конконавалин А и др.), а также бактериальные токсины являются мощными индукторами провоспалительных цитокинов и при введении животным приводят к повышению ФНО-а в крови до критических (более 500 пг/мл). В то же время экспериментально установлено, что при экзогенном введении крысам ФНО-а летальные эффекты наступают при содержании в сыворотке этого цитокина 600 пг/мл. Аналогичные результаты были получены при изучении ранних послеоперационных осложнений, где было установлено, что системная воспалительная реакция, сепсис, органная и полиорганная недостаточность развиваются на фоне гиперцитокинемии, достигающей 1000 пг/мл.

Была проведена специальная серия экспериментов на мышах, у которых определяли уровень сывороточных цитокинов через 24 ч после введения сублетальных доз ризина, ФГА и ЛПС.

Все исследуемые соединения вызывали достоверное увеличение содержания в сыворотке крови основных провоспалительных цитокинов (ФНО-а и ИЛ-1), однако наибольшие уровни этих эндогенных биорегуляторов отмечались у животных, пораженных ризином. Проведенное исследование показало, что ризин является мощным индуктором синтеза провоспалительных цитокинов, стимулируют их спонтанную продукцию МНК крови человека при воздействии в минимальных концентрациях и вызывают значительное повышение содержания исследуемых провоспалительных пептидов у животных, пораженных сублетальными дозами ризина. По своей способности индуцировать ФНО-а и ИЛ-1 ризин превосходит известные стимуляторы продукции эндогенных биорегуляторов, такие как ФГА и ЛПС (табл. 3).

Поскольку, как отмечалось выше, ФНО-а и ИЛ-1 имеют определяющее значение в развитии системной воспалительной реакции, органной и полиорганной недостаточности, значительное повышение продукции этих цитокинов при поражении ризином является одним из важных патогенетических звеньев интоксикации лектином клещевины.

Особенности изменений гликозилирования лейкоцитов крови мышей при воздействии природных лектинов

Известно, что ризин проникает в клетки благодаря избирательному взаимодействию с галактозой клеточной мембраны. Связываясь именно с этим сахаром, молекула ризина вначале фиксируется на цитоплазматической мембране, а затем по механизму эндоцитоза проникает внутрь клетки. С другой стороны, известно, что молекула ризина сама гликозилирована. Основным сахаром, который входит в состав гликозидных структур, является ман-ноза. В свою очередь, по маннозным остаткам макрофаги и лимфоциты также могут захватывать и пиноцитировать молекулы ризина. Результатом такого пиноцитоза во всех случаях будет гибель клеток. Таким образом, из вышеизложенного следует, что применение токсических доз ризина приведет к отбору такой популяции лимфоцитов, которая по гликозилированию будет отличаться от исходной (контрольной) популяции. Поэтому целью настоящего раздела было изучение особенностей изменения гликозилирования лимфоцитов у животных, получивших токсические дозы ризина в сравнении с другими лектинами - ФГА и лектином гороха.

Распределение клеток интактных животных не отличалось от животных, получивших токсин. При окраске клеток лектином гороха (узнает ман-нозу и глюкозу) отмечалось усиление средней геометрической флуоресценции клеток, выделенных из животных, получивших ризин, в 1,5 раза по сравнению с интактными животными (99,86 ед. и 72,5 ед. соответственно). Характер гистограмм сравниваемых клеток при окраске лектином фасоли отличался очень сильно. Лейкоциты интактных животных при их окраске лектином фасоли дают гистограмму с двумя выраженными пиками со средним геометрическим уровнем флуоресценции 170,92 ед., тогда как лейкоциты опытной группы

дают гистограмму с одним пиком со средним уровнем свечения 484,54 ед., т.е., наблюдали увеличение в 2,8 раза. Аналогично этому, выраженные различия между гистограммами интактной и опытной группами наблюдали при их окраске рицином. Интактная группа дает двугорбую гистограмму со средним геометрическим свечением второго пика 59,65 ед., тогда как опытная группа дает гистограмму с одним пиком и со средним уровнем свечения 78,23 ед. Таким образом, при изучении изменения гликозилирования лейкоцитов крови наблюдается компенсаторное его увеличение по различным сахарам более чем в 2 раза. Также наблюдаются значительные изменения в характере гистограмм при окраске лейкоцитов лектином фасоли и рицина, что свидетельствует об избирательности данного теста по отношению к различным природным лектинам. Изложенное выше позволяет рекомендовать данную методику для качественной оценки отравлений рицином.

Методика и особенности судебно-медицинского исследования трупа при подозрении на отравление рицином.

Рицин, введенный в организм человека, вызывает в тканях и органах визуальные выраженные морфологические изменения, имеющие важное диагностическое значение.

При судебно-медицинской экспертизе, в случае подозрения на отравление рицином, необходимо начинать исследование трупа с осмотра одежды, находящейся на трупе или доставленной вместе с ним отдельно.

На поверхности одежды и белья могут быть повреждения от действия острых предметов, разрывы одежды от действия пневматических инъекторов, частицы растительного происхождения, целые кастровые бобы, наложения рицина в виде мелкодисперсного порошка, введенного в организм при отравлении. Такие же остатки вещества могут обнаруживаться в карманах и складках одежды, на материале, служившем для упаковки вещества. При осмотре одежды и вещей, доставленных одновременно с трупом, могут быть найдены документы, указывающие на род занятий и профессию потерпевшего, тексты с описанием действия рицина и технология его изготовления в кустарных условиях и т. д. Все названные объекты, обнаруженные экспертом, должны быть подробно описаны, а требующие дополнительного исследования объекты направлены в соответствующую лабораторию одного из судебно-экспертных учреждений.

Во время наружного исследования особое внимание необходимо уделять осмотру возможного пути введения яда: через желудочно-кишечный тракт, подкожно, внутримышечно, внутривенно. При инъекционных методах поступления в организм ядовитых веществ на коже обнаруживаются точечные следы уколов или действия пневматического инъектора, однако они могут возникнуть и при введении лекарственных средств в ходе лечебных и реанимационных мероприятий.

При внутреннем исследовании трупа следует обращать внимание на следующие важные диагностические признаки отравлений рицином: 1) выраженное резкое полнокровие внутренних органов; 2) гиперемированная, инъецированная сосуда брюшина; 3) многочисленные точечные и сливные кровоизлияния во внутренних органах; 4) участки геморрагии и ателектазов в легких, сужение просвета и скопление слизи в бронхах; 5) увеличенные и ги-перемированные лимфатические узлы с признаками воспаления; 6) асцит; 7) плеврит.

При судебно-медицинской экспертизе отравлений рицином со смертельным исходом применяются различные методы лабораторных исследований внутренних органов или их частей, а также тканей, изъятых при вскрытии трупа. Ввиду сложности диагностики отравления рицином необходимо производить гистологическое, микроскопическое, ботаническое, фармакогностическое, бактериологическое и биологическое (иммунологическое) исследования. Следует отметить особую важность бактериологического исследования для возможности исключения инфекционных заболеваний со схожими клиническими проявлениями.

Отравление рицином по своей клинической и патоморфологической картине может маскироваться под септические состояния (септический шок), поэтому дифференциальная

диагностика должна проводиться, прежде всего, между отравлением рицином и инфекционными заболеваниями. Подозрение на интоксикацию рицином должно вызывать молниеносное нарастание клинических симптомов с развитием острой полиорганной недостаточности, системный геморрагический синдром, неукротимая рвота и диарея с примесью крови, гиперкоагуляция крови с явлениями агрегации эритроцитов, отсутствие признаков гнойно-септических процессов и реакции на адекватную антибиотикотерапию при проведении лечебных мероприятий. Обязательным является проведение микробиологического исследования для исключения возможности инфекционного заболевания. Диагноз отравления рицином подтверждается патоморфологическими особенностями, прежде всего, системным геморрагическим синдромом, гистологическим и гистохимическим исследованиями, в результате которых выявляются явления внутрисосудистой и экстраваскулярной агрегации эритроцитов с образованием частиц гемосидерина ("сладж-синдром"), дистрофией гепатоцитов и эпителия почечных канальцев, резким обеднением лимфоцитами селезенки и тимуса с наличием апоптотических телец и замещением макрофагами и гистиоцитами, разрастанием соединительной ткани в межальвеолярных перегородках легких, паренхиме почек, селезенки и тимуса.

Важное диагностическое значение при идентификации отравления рицином имеют биологические (иммунологические) методы исследований с использованием проточной цитофлуорометрии, позволяющие определить характерные для действия рицина изменения уровня экспрессии Сахаров на мембранах клеток иммунокомпетентной системы.

ВЫВОДЫ

1. Рицин является высокотоксичным соединением, ЛД₅₀ для мышей составляет 0,0023 (0,0012-:-0,0035) мг/кг и для крыс 0,0078 (0,052-:-0,0104)мг/кг, при этом сроки гибели зависят от уровня воздействующих доз токсина.

2. Клиническая картина отравления рицином характеризуется симптомами, сходными с бактериальной интоксикацией, и проявляются нарушением функции дыхания, выраженной гипоксией и диареей.

3. Патоморфологические особенности интоксикации рицином проявляются резко выраженной гиперемией брюшины, полнокровием внутренних органов и кровоизлияниями во внутренних органах, ателектазами легких.

4. При гистологическом исследовании установлено, что рицин вызывает системный геморрагический синдром, токсическое поражение печени и почек, утолщение межальвеолярных перегородок легких.

5. Особенностью действия рицина является разрастание, на фоне макрофагально-гистиоцитарной инфильтрации, соединительной ткани в паренхиматозных органах, в том числе и в межальвеолярных перегородках легких (фиброз легкого).

6. Рицин вызывает характерное истощение лимфоидных органов с образованием многочисленных апоптотических телец, что позволяет рассматривать его как иммунотропный яд.

7. В малых дозах рицин является иммуностимулирующим агентом, повышающим цитотоксическую активность мононуклеарных лейкоцитов крови и индуцирующим синтез провоспалительных фитокинов (ФНО-а и ИЛ-1).

8. Лабораторным показателем отравления рицином может служить повышение уровня маннозных компанетор-гликопептидов на поверхности лимфоцитов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Детально описанную патоморфологическую картину отравления рицином (системный геморрагический синдром, токсическое поражение печени и почек, утолщение межальвеолярных перегородок легких) следует использовать при подозрении на

отравления соответствующими ядами.

Обнаруженная иммунотропность в действии рицина позволяет проводить диагностические исследования, прежде всего, лимфоидных органов при подозрении на отравления рицином.

Разработан лабораторный диагностический показатель отравления рицином, заключающийся в оценке уровня маннозных компанетор-гликопептидов на поверхности лимфоцитов. Данный тест следует использовать для дифференциальной диагностики отравлений рицином в сравнении с бактериальными отравлениями.

Список основных публикаций по теме диссертации

1. Верескунов А.М. Токсикологическая характеристика рицина // Актуальные вопросы судебной медицины и экспертной практики. Сб. научу. тр., посв. 70-летию образования Красноярского края. Красноярск, 2004. С.91-94.

2. Колкутин В.В., Верескунов А.М. Токсикологическая характеристика рицина// Судебно-медицинская экспертиза. 2004. № 6. С.42-45.

3. Сухарев Д.Н., Ахматова Н.К., Зайчикова С.Г., Верескунов А.М. Влияние лектинов растительного происхождения на пролиферативную активность мононуклеарных клеток периферической крови здоровых доноров// Лекарственные растения в фармакологии и фармации. Барнаул, 2004. - С.233-236.