

УДК 57.086.3:579.23+579.22:616.24:612.118.22:579.8

В.М.Катола<sup>1</sup>, К.В.Самсонов<sup>2</sup>**ПРЯМАЯ ЭЛЕКТРОННОМИКРОСКОПИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА БАКТЕРИАЛЬНОГО ЭНДОТОКСИКОЗА ПРИ ГНОЙНО-НЕКРОТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЛЕГКИХ**<sup>1</sup>*Институт геологии и природопользования ДВО РАН,*<sup>2</sup>*ГУ Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания СО РАМН***РЕЗЮМЕ**

Методом прямой электронномикроскопической диагностики, в плазме крови 39 больных активным туберкулезом или абсцессом легких, констатирована бактериемия в виде микроскопических и субмикроскопических бактериальных структур, относящихся к L-формам. По количеству и качеству этих бактерий дифференцированы три степени бактериального эндотоксикоза.

**SUMMARY**

V.M.Katola, K.V.Samsonov

**DIRECT ELECTRON MICROSCOPIC DIAGNOSTICS OF BACTERIAL ENDOTOXICOSIS IN PATIENTS WITH PURULENT NECROTIC LUNG DISEASES**

We used method of direct electron microscopic diagnostics to examine 39 patients with acute tuberculosis and lung abscess. The method enabled us to show microscopic and submicroscopic bacterial L-shaped structures. This lead us to diagnose bacteriemia. Depending on the amount and character of the bacteria we diagnosed three degrees of bacterial endotoxiosis.

Специфическим и неспецифическим заболеваниями, хирургическим вмешательствам, послеоперационным осложнениям и другой патологии человека очень часто сопутствует синдром интоксикации, именуемый «эндотоксикозом». Его обуславливают токсические продукты распада белковых молекул, клеток, тканей, нарушения детоксицирующей функции легких, печени, почек, бактериальные токсины и др. [5, 9, 12]. Для диагностики эндотоксикоза и степени его выраженности используются клинические признаки, гематологические, биохимические маркеры и биологические тесты на экспериментальных животных или простейших [1, 2, 6, 7, 8, 11]. Однако при всех значимых достоинствах и недостатках эти методы относительно, несопоставимы, порою громоздки. Кроме того, из-за небольшого количества бактерий, находящихся в крови, с помощью этих методов не всегда можно диагностировать бактериемию, следовательно, определить наличие эндотоксикоза. Так, по наблюдениям многих авторов микобактерии туберкулеза обнаруживаются в крови у 1,13-5,3% больных различными формами туберкулеза [10], L-трансформанты – у 33% больных [3, 15], при бактериальных пневмониях гемокультура выделяется в 10-40% случаев [6], при сепсисе – в 90% [6]. Более того, даже по выделенной гемокультуре невозможно судить о всех изменениях, которые происходят с бактериями непосредственно во внутренней среде мак-

роорганизма. Мы предполагаем, что редкая высеваемость бактерий из крови при бактериальном эндотоксикозе может быть связана не только с их малым количеством, но и, в первую очередь, морфологической изменчивостью под влиянием продуктов деструкции тканевых белков, свободнорадикального окисления, биологически активных аминов и других веществ. Предположение базируется на том, что ранее одним из нас [4] с помощью прямой сканирующей электронной микроскопии в крови больных деструктивным туберкулезом легких впервые были обнаружены как типичные исходные клетки бактерий, так и другие микроскопические и субмикроскопические бактериальные формы, относящиеся к вариантам L-форм. В то же время большинство клинических бактериологических лабораторий, пользующихся традиционными методами исследования, такую бактериемию не выявляют.

В настоящей работе представлены результаты исследования плазмы у пациентов гнойно-некротическим процессом в легких (активный туберкулез, острый гнойный абсцесс) и здоровых лиц с помощью прямой электронной микроскопии и бактериологическим методом с целью выявления бактериемии и диагностики бактериального эндотоксикоза.

**Методы исследования**

В исследования было включено 39 взрослых мужчин и женщин, находящихся на лечении по поводу различных форм туберкулеза и абсцесса легких, и 15 здоровых людей (контрольная группа). У трех пациентов диагностирована туберкулема, у трех – инфильтративный туберкулез легких в фазе распада и обсеменения, у пяти – гематогенно-диссеминированный туберкулез в фазе распада, у четырех – прогрессирующий фиброзно-кавернозный туберкулез. Острым гнойным абсцессом легких болело 24 человека. Взятую у пациентов и здоровых лиц плазму крови в количестве 0,1 мл (одна капля) наносили на торцовую поверхность объектного столика сканирующего электронного микроскопа JEOL jsm-35C (Япония) и подсушивали в стерильной чашке Петри. Подсохшую плазму напыляли углеродом в вакуумной установке ВУП-4, затем просматривали в указанном микроскопе. Для обработки и интерпретации результатов в 7-12 полях зрения подсчитывали количество визуализированных бактериальных форм, определяли их размеры и функциональное состояние (способ размножения, образование конгломератов и элементарных телец). Степень надежности полученных данных оценивали статистическим анализом, сопоставляя с тяжестью клинического течения и исходом заболевания, показателями крови и «пара-медийным временем». Последнее указывает на про-

должительность жизни *Paramecium caudatum* в плазме крови здоровых лиц и пациентов [11].

Одновременно осуществляли посевы цельной крови и плазмы отдельно на плотную питательную среду Левенштейна-Йенсена, жидкую среду ФАСТ 3Л, 0,25% сахарный бульон, мясо-пептонный, кровяной и желточно-солевой агар. Посевы инкубировали в термостате при 37° С.

### Результаты исследования

Сразу же отметим, что в плазме, взятой у лиц контрольной группы, каких-либо изменений, видимых в электронном микроскопе, не обнаружено. У большинства страдающих активным туберкулезом и абсцессом легких в той или иной мере были симптомы интоксикации. Чаще всего они проявлялись при гематогенно-диссеминированном и фибринозно-кавернозном туберкулезе, абсцессах легких диаметром 2-6 и более см. Тем не менее, еще до получения результатов бактериологического исследования крови у всех пациентов, в том числе с легким течением заболевания без выраженной интоксикации, в процессе просмотра плазмы в электронном микроскопе констатирована бактериемия. Во многих полях зрения (п) в препаратах из плазмы больных активным туберкулезом обнаруживали палочковидные исходные бактериальные клетки (ИБК), нитевидные бактериальные структуры (НБС) и различные варианты L-форм: отличающиеся по величине конгломераты (К), сформированные шаровыми клетками, и элементарные тельца (ЭТ) диаметром 0,3-0,15 мкм, которые отпочковывались на поверхности нитей, конгломератов или располагались свободно. В плазме же больных гнойным абсцессом легких находились клетки овальной либо сферической формы – чаще всего они делились, но дочерние клетки не расходились и образовывали клеточные группы в состоянии несбалансированного роста (НРК), что присуще начальным этапам L-трансформации бактерий [14]. Встречались также деформированные шаровидные клетки (ДШК), небольшие К и ЭТ. Следует отметить, что несмотря на некоторую однотипность, обнаруженные в крови бактериальные формы при туберкулезе и абсцессе отличались индивидуальным морфогенезом: при туберкулезе они более детализированные, массивнее и многочисленнее, при абсцессе встречаются в меньших количествах и меньших размеров.

В отличие от электронномикроскопического бактериологического исследования крови (плазмы) не всегда давало положительную информацию. Через 48 часов инкубации посевов получен рост монокультуры *Staphylococcus aureus* лишь у 15 (62,5%) больных с множественными либо осложненными абсцессами легких, тогда как посевы крови от страдающих туберкулезом легких и здоровых лиц оставались отрицательными на протяжении 3-х месяцев. Поэтому выявить бактериемия, которая подтверждала бы сопутствующий основному заболеванию бактериальный эндотоксикоз, удается не всегда. Особенно это сложно при активном ограниченном туберкулезе легких, когда состояние пациентов удовлетворительное, клинические симптомы отсутствуют, гематологические, биохимические показатели и «парамеций-

ное время» нормальные, а организация бактериологической службы несовершенна. При абсцессе же легких распознавание бактериемии облегчается гораздо частым выделением гемокультуры. Но и гемокультура имеет ограниченную ценность, поскольку отражает далеко не все свойства, присущие многоклеточной популяции, циркулирующей непосредственно в крови. Например, не определяет форму ее клеток, целостность клеточной стенки бактерий и прочее. В организм больных туберкулезом легких или гнойными абсцессами легких бактерии испытывают влияние иммунобиологических сил, продуктов распада тканей, ферментов (лизоцим), некоторых аминокислот (аргинин, глицин, фенилаланин), избирательно действующих лекарственных средств (пенициллин, циклосерин) и других веществ. В итоге, прямо или косвенно, могут блокироваться звенья биосинтеза клеточной стенки [13, 14]. Именно от состояния клеточной стенки бактерий часто зависит выбор антибактериальных препаратов и эффективность лечения. Таким образом, электронномикроскопический просмотр плазмы крови у больных при гнойно-некротических процессах в легких более информативен, чем ее исследование известными микробиологическими методами, в том числе применяемыми для диагностики микробного эндотоксикоза.

Несмотря на заметные электронномикроскопические различия бактериальных морфотипов, циркулирующих в крови при туберкулезе и абсцессе легких, наблюдается четкая корреляция между их количеством, формой, размерами, функциональным состоянием и выраженностью интоксикации. С учетом этих тестов мы предлагаем (патент РФ №2291431) дифференцировать три степени тяжести бактериального эндотоксикоза (рис. 1, 2).

*1 степень тяжести – легкая.* В плазме крови больных активным туберкулезом легких обнаруживаются ИБК, тонкие и широкие НБС, отпочковывающие на своей поверхности ЭТ, свободнолежащие ЭТ и мелкие, до 5 мкм К. Численность ИБК  $3,0 \pm 0,49$  ( $n=10$ ,  $p<0,001$ ), НБС  $6,0 \pm 0,57$  ( $n=10$ ,  $p<0,001$ ), ЭТ  $4,0 \pm 3,75$  ( $n=7$ ,  $p<0,001$ ), К  $6,0 \pm 0,5$  ( $n=9$ ,  $p<0,001$ ). При стафилококковом абсцессе легких в крови пациентов содержатся (рис. 2а) овальные клетки стафилококков на стадии НРК ( $2,0 \pm 0,06$ ;  $n=8$ ,  $p<0,001$ ) и ЭТ ( $14,0 \pm 1,87$ ;  $n=8$ ,  $p<0,001$ ). По клиническим признакам самочувствие пациентов при активном туберкулезе и абсцессе диаметром до 2 см удовлетворительное, исход заболевания благоприятный.

*2 степень тяжести – средняя.* В препаратах из плазмы крови больных активным туберкулезом легких прослеживается увеличение численности НБС, часто переплетающихся между собой, различных по форме и размерам (до 10 мкм) К, которые формируются на поверхности НБС, и множество свободнолежащих ЭТ. При этом количество НБС составляет  $14,0 \pm 0,57$  ( $n=12$ ,  $p<0,001$ ), К  $7,0 \pm 0,91$  ( $n=10$ ,  $p<0,001$ ), ЭТ  $75,0 \pm 14,70$  ( $n=8$ ,  $p<0,001$ ). ИБК отсутствуют. При стафилококковом абсцессе легких диаметром 2-6 см в плазме крови просматриваются (рис. 2б): мелкие К  $5,0 \pm 0,46$  ( $n=8$ ,  $p<0,001$ ) и ЭТ  $6,0 \pm 0,7$  ( $n=8$ ,  $p<0,001$ ). По клиническим признакам состояние пациентов,

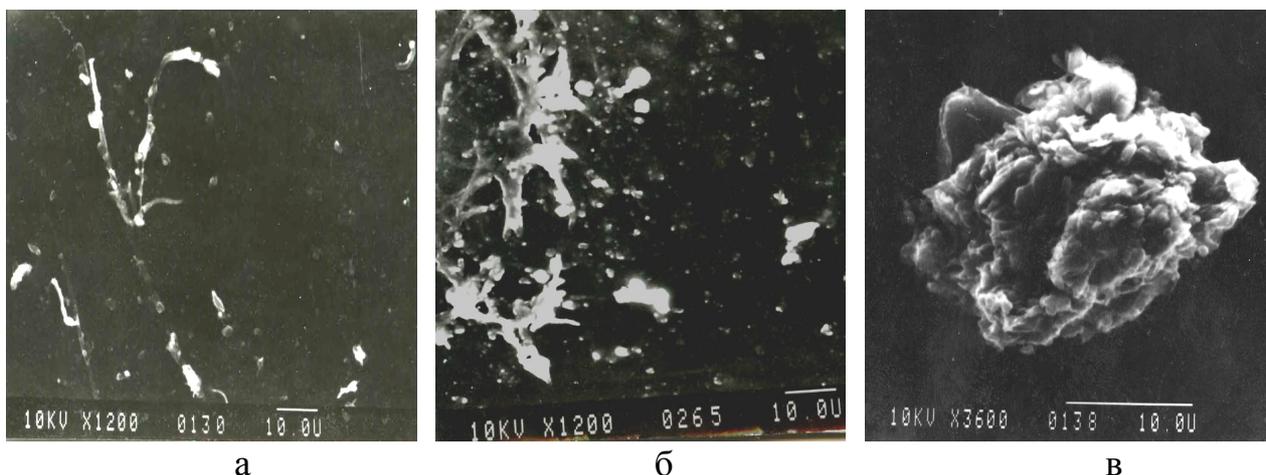


Рис. 1. Сканирующая электронная микроскопия степеней тяжести бактериального эндотоксикоза при активном туберкулезе легких:  
 а – 1-я степень (легкая). Исходные бактериальные клетки, различных размеров нитевидные бактериальные структуры, мелкие L-конгломераты и элементарные тельца (ЭТ). Увеличение  $\times 1200$ ;  
 б – 2-я степень (средней тяжести). Переплетающиеся нитевидные структуры, на их поверхности формируются L-конгломераты, вокруг множество свободнолежащих ЭТ. Увеличение  $\times 1200$ ;  
 в – 3-я степень (тяжелая). Огромный L-конгломерат, отпочковывающий ЭТ. Увеличение  $\times 3600$ .

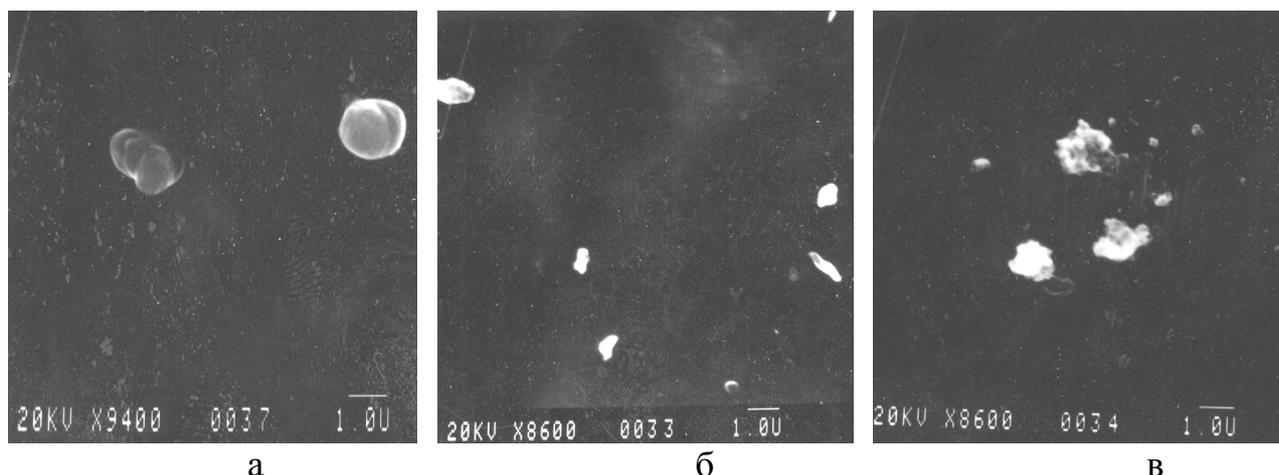


Рис. 2. Сканирующая электронная микроскопия степеней тяжести бактериального эндотоксикоза при гнойном абсцессе легких:  
 а – 1-я степень (легкая). Неразделившиеся дочерние клетки стафилококка. Увеличение  $\times 9400$ ;  
 б – 2-я степень (средней тяжести). Мелкие L-конгломераты и ЭТ. Увеличение  $\times 8600$ ;  
 в – 3-я степень (тяжелая). Небольшие L-конгломераты, отпочковывающие ЭТ, свободнолежащие ЭТ, Увеличение  $\times 8600$ .

страдающих активным туберкулезом или абсцессом диаметром 2-6 см, средней тяжести, исход заболевания благоприятный.

*3 степень тяжести – тяжелая.* В препаратах из плазмы крови больных туберкулезом легких ИБК и НБС практически не обнаруживаются. В крови находятся лишь крупные полиморфные К, достигающие длиной 28-65 мкм и шириной 10-35 мкм, и свободно лежащие ЭТ. Количество К- $14,0 \pm 1,23$  ( $n=10$ ,  $p<0,001$ ), ЭТ- $14,0 \pm 1,4$  ( $n=8$ ,  $p<0,001$ ). При стафилококковом абсцессе легких диаметром больше 6 см в плазме крови обнаруживаются (рис. 2в) конгломераты величиною до 5 мкм, деформированные шаровидные клетки и различных размеров ЭТ. Количество К составляет  $3,0 \pm 0,21$  ( $n=10$ ,  $p<0,001$ ), ДШК- $2,0 \pm 0,042$

( $n=10$ ,  $p<0,001$ ), ЭТ- $6,0 \pm 0,63$  ( $n=10$ ,  $p<0,001$ ). По клиническим признакам состояние пациентов тяжелое, лечебные мероприятия при активном туберкулезе и осложненном абсцессе (эмпиема плевры) не помогают. Летальный исход при активном туберкулезе легких наступает через 1-2 недели, при осложненном стафилококковом абсцессе легких – в 9% случаев.

*Пример 1.* Больной С., 1970 г.р. поступил с диагнозом: инфильтративный туберкулез легких, локализованный в верхней доле правого легкого, фаза распада. Заболевание диагностировано впервые. Жалобы на редкий кашель, утомляемость при физической нагрузке. Общее состояние удовлетворительное. Микобактерии туберкулеза в мокроте не выявлены. На рентгенограмме: в верхней доле правого легкого

неоднородная малоинтенсивная тень с просветлением в центре. Анализ крови: число лейкоцитов в 1 мкл 5700, нейтрофильных лейкоцитов: палочкоядерных – 3%, сегментоядерных – 61%. Лимфоциты – 18%. СОЭ – 9 мм/час. При просмотре плазмы крови в сканирующем электронном микроскопе обнаружены 3 исходные бактериальные клетки, 6 различного размера нитевидных бактериальных структур, 41 элементарное тельце и 6 мелких конгломерата. «Парамедианное время» – 13,2 минуты. Диагностирован бактериальный эндотоксикоз легкой степени тяжести. Исход заболевания благоприятный.

*Пример 2.* Б-й К., 1969 г.р. поступил с диагнозом: абсцессы нижней доли левого легкого, абсцесс средней доли правого легкого. Токсический миокардит, токсический гепатит. Сепсис. Простудился во время охоты, к врачу не обращался, лечился домашними средствами. За день до госпитализации во время кашля отошло большое количество гнойной мокроты с прожилками крови. По клиническим признакам состояние крайне тяжелое. Жалобы на высокую температуру, кашель с выделением большого количества мокроты неприятного запаха, слабость, одышку, боли в области сердца, отеки голеней и стоп. На рентгенограмме: в нижней доле левого легкого выявлены два абсцесса диаметрами 3 см и 10 см, содержащих жидкость. В средней доле правого легкого абсцесс диаметром 5 см с перифокальным воспалением. Анализ крови: количество лейкоцитов в 1 мкл 22000, палочкоядерных лейкоцитов – 18%, сегментоядерных лейкоцитов – 50%. Количество лимфоцитов – 24%, моноцитов – 8%. Токсическая зернистость нейтрофилов +++ (75%). СОЭ 44 мм/час. При просмотре плазмы крови в сканирующем электронном микроскопе обнаружены 3 больших конгломерата, 2 ДШК и 6 свободнолежащих ЭТ. ИБК и НБС не выявлены. «Парамедианное время» – 6 мин. Заключение: бактериальный эндотоксикоз тяжелой степени. Через двое суток во время кашля у больного возник спонтанный пневмоторакс слева, развилась эмпиема плевры. Летальный исход наступил спустя 5 суток.

### Выводы

1. С помощью прямой сканирующей электронной микроскопии плазмы крови у всех больных (100%), принимавших лечение по поводу активного туберкулеза или стафилококкового абсцесса легких, констатирована бактериемия. Ее маркерами и признаками бактериального эндотоксикоза служат микроскопические и субмикроскопические бактериальные структуры, проникающие в кровяное русло из очага первичного внедрения. Большинство этих структур соответствуют известным вариантам L-форм бактерий - деформированным шаровидным клеткам, их конгломератам и элементарным тельцам. Среди них встречаются исходные палочковидные или сферические (овальные) бактериальные клетки, а также их нитевидные формы.

2. Морфологическое разнообразие циркулирующих в крови бактериальных форм при активном туберкулезе и абсцессе легких позволяет дифференцировать три степени (фазы) тяжести бактериального эндотоксикоза: 1-ю степень (легкую), 2-ю степень

(средней тяжести) и 3-ю степень (тяжелую), а в ряде случаев даже прогнозировать исход заболевания.

3. Предлагаемый способ диагностики бактериального эндотоксикоза посредством бактериемии с помощью прямой сканирующей электронной микроскопии наиболее эффективен, объективен, позволяет уменьшать количество и объем исследуемого материала, материальные и временные затраты.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Верификация эндотоксикоза у больных с разлитым перитонитом [Текст]/Беляков Н.А. [и др.]// Эфферентная терапия.-1995.-Т.1, №2.-С.14-19.
2. Диагностика различных степеней эндотоксикоза при абсцессах легких: методические рекомендации [Текст]/В.П.Самсонов, М.Т.Луценко, Е.В.Новик.- Благовещенск, 1988.-10 с.
3. Динамика выделения и клиническое значение L-форм микобактерий у больных туберкулезом легких [Текст]/Ю.Е.Балта: автореф. дис. ... канд. мед. наук.-М., 1980.-24 с.
4. Индукция L-форм микобактерий туберкулеза и их электронномикроскопическая визуализация *in vitro* и *in vivo* [Текст]/Катола В.М. [и др.]//Бюл. физиол. и патол. дыхания.-2005.-Вып.21.-С.75-77.
5. Молекулярные и клеточные механизмы патогенного действия бактериальных эндотоксинов [Текст]/Б.Э.Шенкман//Успехи современ. биол.-1988.-Т.105, вып.3.-С.423-438.
6. Общая хирургия [Текст]/В.К.Гостищев.-М.: Медицина, 1993.-С.349-350.
7. Пневмония [Текст]/В.П.Сильвестров, П.И.Федоров.-М.: Медицина, 1987.-246 с.
8. Ранняя биохимическая диагностика острой гнойной деструкции легких у детей [Текст]/С.Н.Гисак, И.Э.Есауленко//Национальный конгресс по болезням органов дыхания, 8-й: сборник резюме.-М., 1998.-№XXV.-С.3.
9. Состояние системы перекисного окисления липидов и антиоксидантов у здоровых и больных хроническим бронхитом в регионе Карелии [Текст]/Г.А.Карапетьян, Н.В.Доршакова, Ю.М.Ильина //Национальный конгресс по болезням органов дыхания, 8-й: сборник резюме.-М., 1998.-№ XLV11.-С.9.
10. Туберкулез органов дыхания у взрослых [Текст]/А.Е.Рабухин.-М.: Медицина, 1976.-С.86.
11. Экспресс-метод определения токсических свойств крови и лимфы с помощью парамедий при экзо-эндотоксикозе [Текст]/Г.А.Пафомов, Ф.А.Бурдыго, М.А.Широнова//Сов. мед.-1980.-№1.-С.42-45.
12. Эндогенные токсины в хирургии: современные исследования в биологии и медицине. Сообщение 2. Диагностика [Текст]/А.Л.Харьков//Клин. хирургия.-1997.-№11-12.-С.90-93.
13. L-формы бактерий и семейство *Mycoplasmataceae* в патологии [Текст]/В.Д.Тимаков, Г.Я.Каган.-М.: Медицина, 1973.-391 с.
14. L-формы бактерий (Механизм образования, структура, роль в патологии) / С.В.Прозоровский, Л.Н.Кац, Г.Я.Каган.-М.: Медицина, 1984.-236 с.
15. L-variation in mycobacteria [Text]/Mattman L.H. [et al.]//Am. Rev. Respir. Dis.-1960.-Vol.82.-P.202.

Поступила 20.11.2006