

ЕРИТРОЦИТНИ СТАТУС WISTAR ПАЦОВА ИНФИЦИРАНИХ ЕШЕРИХИЈОМ (*Escherichia coli*) У ЗАВИСНОСТИ ОД ПОСТАПЛИКАЦИОНОГ ПЕРИОДА

Невена Шушкало, Радослав Декић, Свјетлана Лолић, Александер Иванц

Универзитет у Бањој Луци, Природно-математички факултет, Младена Стојановића 2,
78 000 Бања Лука, Република Српска

Abstract

ŠUŠKALO Nevena, R. DEKIĆ, Svjetlana LOLIĆ, A. IVANC: ERYTHROCYTE STATUS OF WISTAR RATS INFECTED BY *E. coli* DEPENDING OF POSTAPPLICATION PERIOD [University of Banja Luka, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, Mladena Stojanovića 2, 78000 Banja Luka]

There were observed parameters of erythrocyte lineage of Wistar rats, after bacterial infection in different time interval. Both male and female adult Wistar albino rats were used in experiment. Experimental animals were treated with bacterial suspension of *E. coli*, ATCC 11755. The rats were divided in three groups, two experimental and control group. The results of parameters erythrocyte lineage showed significantly decreasing of red blood cells, hemoglobin content and hematocrit. The differences between both experimental groups were statistical insignificant and they had tendency to reducing in function of time. The values of hematological parameters MCV and MCH were decreased in both experimental groups. The values of MCHC were increased in both experimental groups. The differences between both experimental groups were insignificant. The results of this work were show decreasing almost all followed hematological parameters in experimental groups. Any deviation of downward trend mean examined parameters are brought in relation with bacterial strain and dose of applied suspension.

Key words: *Escherichia coli*, Wistar rats, erythrocyte lineage

Сажетак

Праћени су параметри еритроцитне лозе лабораторијског пацова соја Wistar након бактеријске инфекције у различитим временским интервалима. У експерименту су коришћене 24 јединке, мужјаци и женке лабораторијских пацова (*Rattus norvegicus*) соја Wistar који су третирани бактеријском суспензијом *Escherichia coli*, соја ATCC 11755. Животиње су подијелене у три групе, двије експерименталне П (24h након интраперитонеалне апликације) и Н (72h након интраперитонеалне апликације), те контролну групу (К). Добијене вриједности параметара еритроцитне лозе показали су статистички значајно смањење броја еритроцита у крви, као и смањење концентрације хемоглобина и хематокрита. Разлика између двије експерименталне групе није статистички значајна са тенденцијом смањивања у функцији времена. Уочено је смањивање вриједности MCV и MCH, док су вриједности MCHC повећане код јединки из експерименталних група. Резултати истраживања показују смањење готово свих вриједности хематолошких параметара који су праћени у експерименталним групама. Свако одступање од тренда смањивања средњих вриједности испитиваних параметра доводи се у везу са бактеријским сојем и дозом апликоване суспензије.

Кључне ријечи: *Escherichia coli*, Wistar пацов, еритроцитна лоза

УВОД

Бактеријска инфекција узрокована апликацијом бактерије *Esherichia coli* може да доведе до озбиљних патолошких процеса у организму попут сепсе и менингитиса у неонаталном периоду (Korhonen и сар., 1985; Martindale и сар., 2000), те разних системских инфекција као што су инфекција уринарног тракта и колонизација гастроинтестиналног тракта у свим периодима онтогенезе (Sarff и сар., 1975; Orsakov и Orsakov, 1985; Plos и сар., 1995). Сепса, септички шок и отказивање физиолошких функција многих органа озбиљне су последице инфекција узрокованих Грам-негативним бактеријама које често воде ка смртном исходу (Pacheco и сар., 2002).

Бактерије показују експресију многих антигена и секрецију фактора вируленције (токсина) који могу омести имуни одговор. Бактеријски егзотоксини и ендотоксини важни су у патогенези специфичних болести (John, 1997). Фактори вируленције бактерије *Esherichia coli* који узрокују септикемију укључују манозно-резистентне (MR) фимбрије, цитотоксине, аеробактин и ColV плазмиде, протеине спољашње мембране, липополисахариде (LPS) и капсуле, O-антиген капсуле (Ngeleka и сар., 1993). Егзотоксини су по хемијској природи протеини које секретују многе врсте бактерија. Ендотоксини су соматски липополисахарид – протеински комплекси. Ови комплекси антигена смјештени су на спољашњој мембрани свих Грам-негативних бактерија (John, 1997). Ендотоксини (липополисахариди, LPS) су познати као најмоћнији бактеријски производи у индукцији инфекцијског процеса као одговора имуног система домаћина на одређени антиген. Липополисахариди такође индукују продукцију и ослобађање различитих цитокина (Othman и сар., 2006). Интеракција између липополисахарида поријеклом из Грам-негативних бактерија и домаћинових иницијалних продуката ланчане реакције медијатора инфекције из моноцита и макрофага одговорна је за ефективност имуног система. У случају септичког шока, секреција медијатора инфекције одговорна је за хемодинамичку неравнотежу, активацију комплемената и на крају, за отказивање физиолошких функција многих органа (Pacheco и сар., 2002).

Апликација ендотоксина изолованих из бактерије *E. coli* у експерименталне животиње резултује разним патофизиолошким промјенама као што су системска хипотензија и плућна хипертензија, као и хематолошке промјене, манифестоване у смањењу броја леукоцита и тромбоцита у циркулацији (Erve и сар., 1978; Goodman и сар., 1979; Brigham и Meyrick, 1986 и Rojas и сар., 2005).

Многе студије показале су постојање неколико хематолошких промјена у експерименталној ендотоксемији. Van Lambalgen и сарадници (1988), Egan и сарадници (1989), Hawes и сарадници (1993), Kitajima и сарадници (1995), Pearson и сарадници (1995), Kosumi и сарадници (2001), Othman и сарадници (2006) и Oladunmoye (2006) показали су да апликација Грам-негативних бактерија у пацове као експерименталне животиње узрокује системску хипотензију, смањење односа уобличених елемената и плазме (хематокрит) и смањење концентрације хемоглобина, као и смањење броја леукоцита, еритроцита и тромбоцита у циркулацији.

Циљ истраживања је био показати дејство бактерије *Echerichia coli* на хематолошке параметре еритроцитне лозе лабораторијског пацова *Rattus norvegicus*, која

Wistar, након интраперитонеалне апликације у два временска интервала инкубације, након 24h и 72h.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

У експерименту су коришћене 24 јединке, мужјаци и женке, лабораторијских пацова (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) соја Wistar, масе тијела 120–340 g. Животиње су узгојене на Медицинском факултету у Сарајеву и транспортоване у Бању Луку по стандардној процедури. Прилагођавање на услове у штали прије почетка експеримента трајало је 15 дана. Температура у штали приликом извођења експеримента кретала се у интервалу 24–26 °С, што је регулисано клима-уређајем. Животиње су смјештене у кавезе димензија 41 cm x 25 cm x 14 cm, а храна и вода биле су им доступне *ad libitum*. Приликом експеримента коришћена је храна Teurlings (Холандија), а за пиће је коришћена вода из водоводне мреже.

Коришћена је бактерија *Esherichia coli*, сој ATCC 11755. Број бактерија одређен је спектрофотометријски, одређивањем оптичке густине по стандардизованом поступку (Dominguez и сар., 2001). На основу прикупљених података из претходно објављених научних радова одлучено је да број CFU (енг. colony forming units) у суспензији износи 10⁶/ml и да се убризгава у запремини од 0,2 ml. Пред почетак третирања бактеријском суспензијом *E. coli*, животињама је одређена маса помоћу техничке ваге ($\pm 0,001$). Приликом убризгавања суспензије коришћене су стерилне игле (промјера 0,4 mm) и шприце. Инјекције са бактеријском суспензијом убризгаване су интраперитонеално.

На основу литерарних података закључено је да је потребна инкубација у интервалу од најмање 24h (група Н), а за другу експерименталну групу (група П) одређен је период инкубације у интервалу од 72h после апликације. Контролној групи (група К) животиња на исти начин и у истој запремини убризгаван је физиолошки раствор.

Прије почетка поступка узимања крви, животиње су анестетисане кетаминем концентрације 50 mg/kg. Кориштен је фармацеутски производ Ketaminol 10 (100 ml /mg) произвођача Intervet, који је разријеђен са физиолошким раствором у омјеру 1:10. Кетамин је веома моћан анестетик који блокира провођење импулса бола до таламусног и кортикалног подручја (Green и сар., 1981). Анестетик је убризган интрамускуларно, у запремини која је одређена по маси тијела јединке, стерилним иглама (промјер 0,4 mm) и шприцама.

Крв је узимана кардијалном пункцијом у стерилним условима, иглом промјера 1,2 mm и шприцом запремине 2 ml. Крв је након тога остављена у вакутенере са антикоагулансом, а као антикоагуланс кориштен је КЗЕДТА.

Број црвених крвних ћелија одређен је методом бројања у комори (хемицитометру) уз кориштење одговарајућег раствора (Наумов раствор). При раду је кориштен хемоцитометар по Thomi (Иванц и Декић, 2006). Однос између уобличених крвених елемената и крвне плазме (хематокит) одређен је помоћу хематокрит центрифуге и хематокрит цјевчица (Иванц и Декић, 2006). Концентрација хемоглобина одређивана је методом по Drabkinu по стандардном поступку, при чему је коришћен колориметар (Colorimetar 254) и Drabkinov реагенс (Иванц и Декић, 2006). Хематолошки индекси (МСV – средња вриједност запремине еритроцита, МСН – средња вриједност количине

хемоглобина у еритроциту и МСНС – средња вриједност концентрације хемоглобина у еритроциту) вриједности су које се рачунски одређују када су познате вриједности броја еритроцита у литри крви, хематокрита и концентрације хемоглобина по стандардним формулама (Иванц и Декић, 2006).

У статистичкој обради података коришћени су сљедећи параметри: средња вриједност, стандардна девијација, минимална вриједност, максимална вриједност, коефицијент варирања и t-тест. Вриједност мања од 0,05 сматра се статистички значајном са тачношћу од 95%.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

У Табели 1. приказани су добијени резултати вриједности хематолошких параметара контролних и третираних јединки. Контролна група садржила је укупно 8 јединки, 4 женке и 4 мужјака којима је интраперитонеалном апликацијом убризган физиолошки раствор.

Табела 1. Вриједности параметара еритроцитне лозе контролних и третираних јединки

Статистички параметри	Маса (g)	RBC (Т/л)	Hct (l/l)	Hb (g/l)	MCV (fl)	MCH (pg)	МСНС (g/l erit.)
Контролна група (група К)							
Средња вриједност	180,069	7,174*	0,416	128,20*	58,99**	17,99*	309,84**
Стандардна девијација	18,901	1,162	0,047	15,65	9,16	1,38	37,65
Минимална вриједност	152,300	5,350	0,357	107,07	47,73	16,33	259,26
Максимална вриједност	207,020	8,380	0,500	151,85	72,46	20,01	379,63
Коефицијент варирања	10,497	16,194	11,255	12,20	15,53	7,68	12,15
Третиране јединке (група П)							
Средња вриједност	197,851	4,321	0,373	82,38	88,82*	19,02	232,14*
Стандардна девијација	77,038	0,643	0,083	15,42	29,42	1,85	68,13
Минимална вриједност	125,000	3,230	0,272	55,55	57,26	17,03	111,10
Максимална вриједност	333,800	5,220	0,500	103,70	154,79	21,60	326,76
Коефицијент варирања	38,937	14,876	22,331	18,72	33,12	9,73	29,35
Третиране јединке (група Н)							
Средња вриједност	166,293	4,225*	0,371	85,37*	88,02*	20,24*	235,57*
Стандардна девијација	46,073	0,311	0,062	6,87	14,55	1,35	42,13
Минимална вриједност	133,800	3,930	0,300	77,77	63,42	18,44	181,81
Максимална вриједност	254,120	4,730	0,455	98,52	107,00	22,70	308,63
Коефицијент варирања	27,706	7,372	16,799	8,04	16,53	6,69	17,89

* – статистички значајан резултат ($p < 0,050$); ** – статистички значајан резултат у двије групе ($p < 0,050$)

Прва експериментална група (група П) садржавала је 8 јединки, 6 мужјака и 2 женке, којима је интраперитонеалном апликацијом убризгавана бактеријска суспензија. Вријеме инкубације код ове групе трајало је 24h.

Примјећује се да су средње вриједности хематолошких параметара броја еритроцита у литри крви, хематокрит, концентрација хемоглобина и МСНС смањене, док су вриједности МCV и МСН веће у односу на контролну групу.

Резултати t-теста поређења П и К групе показали су да разлике између средњих вриједности за број еритроцита/л крви, хематокрит, хемоглобин и МСН нису статистички значајне, док су разлике средњих вриједности МСНС ($p=0,006$) и МCV ($p=0,008$) статистички значајне.

Друга експериментална група садржавала је јединке код којих је вријеме инкубације трајало 72h, а у овој групи такође је било заступљенио 8 јединки (6 мужјака и 2 женке). Компарација добијених резултата друге експерименталне групе са контролном групом показује постојање значајних разлика. Тако су средње вриједности броја еритроцита у литри крви, хематокрита, концентрације хемоглобина, МСНС смањене, док су добијене вриједности МCV и МСН веће у односу на контролну групу. Резултати t-теста поређењем П и Н групе показали су да разлике средњих вриједности хематокрита немају статистички значај, док су средње вриједности за број еритроцита/л крви ($p=0,0001$), концентрацију хемоглобина ($p=0,0034$), МCV ($p=0,0001$), МСН ($p=0,0026$) и МСНС ($p=0,0011$) статистички значајне. Вршено је поређење и између двије третиране групе, гдје примјећујемо да су средње вриједности хематолошких параметара броја еритроцита у литри крви и хематокрита мање, док су вриједности концентрације хемоглобина, МCV, МСН и МСНС веће у Н групи.

Помоћу t-теста упоређене су добијене вриједности обје третиране групе и утврђено је да не постоји статистички значајна разлика у поређењу праћених параметара.

Andonova и сарадници (1998) доказали су да је експериментална ендотоксемија узрокована интраперитонеалном апликацијом 1 mg *E. coli*/kg у пацове. Они су пратили динамику вриједности хематокрита и броја еритроцита које се повећавају у временском интервалу од 2h након апликације. Затим долази до смањења вриједности. Праћењем датих параметара примијећено је да свој максимум достижу 72h након апликације.

Пацови показују карактеристичне промјене у вриједностима хематокрита током ендотоксемије. Вриједност праћеног параметра повећава се у интервалу од 20 до 45 минута након апликације. Затим долази до смањења вриједности на оне прије третирања или још мање у временском интервалу од 120 минута (Van Lambalgen и сарадници, 1998). Othman и сарадници (2006) и Oladunmoye (2006) уочили су знатно снижавање вриједности параметара еритроцитне лозе након апликације ендотоксина из бактерије *E. coli*, посебно укупног броја еритроцита у крви, хематокрита и концентрације хемоглобина. Промјене у хематолошким параметрима током инфекције бактеријском суспензијом зависе од дозе исте апликоване у јединку, док је анемија (смањена концентрација хемоглобина у крви) присутна код свих јединки третираних ендотоксинима бактерије *E. coli* (Othman и сарадници, 2006).

Резултати истраживања показују смањење готово свих вриједности хематолошких параметара који су праћени у експерименталним групама. Свако одступање од тренда смањивања средњих вриједности испитиваних параметра доводи се у везу са бактеријским сојем и дозом апликоване суспензије.

ЗАКЉУЧАК

Испитан је утицај који има бактерија *Escherichia coli* након интраперитонеалне апликације на хематолошке параметре еритроцитне лозе лабораторијског пацова соја Wistar. Бактеријска инфекција дјеловала је очекивано на праћене параметре. Доказано је да временски интервал након апликације бактеријске суспензије (24–72h) нема велики значај. Под утицајем бактеријске инфекције дешава се смањивање готово свих праћених хематолошких параметара еритроцитне лозе. Средње вриједности хематолошких индекса MCV и MCH повећале су се у обје експерименталне групе, док се средња вриједност MCHC смањила.

ЛИТЕРАТУРА

1. Andonova, M. G., Goundasheva, D., Georgiev, P., Ivanov, V. : Effects of indomethacin on lipopolysaccharide-induced plasma PGE2 concentration and clinical pathological disorders in experimental endotoxemia. *Vet. Hum. Toxicol.*, 40 (1): 14–18, 1998.
2. Brigham, K. L., Meyrick, B. : Endotoxin and lung injury. *Am Rev Respir Dis.* 133(5): 913–927, 1986.
3. Dominguez, M. C., de la Rosa, M., Borobio, V. : Application of a spectrophotometric method for the determination of post- antibiotic effect and comparison with viable counts in agar. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47: 391–398, 2001.
4. Egan, J. W., Jugus, M., Kinter, L. B., Lee, K., Smith, E. F. : Effect of selective V1 vasopressin receptor antagonist on sequelae of endotoxemia in the conscious rat. *Circ. Stock. Oct*; 29(2): 155-66, 1986.
5. Erve, P. R., Shuler, J. J., Schumer, W. : Endotoxin-challenged monkey and rats. *Arch. Surg. May*; 113, 5. 561–564, 1978.
6. Goodman, M. L., Way, B. A., Irwin, J. W. : The inflammatory response to endotoxin. *J. Patholol.*; 128, 1: 7–14, 1979.
7. Green, C. J., Knight, J., Precious, S., Simpkin, S. : Ketamin alone and combined with diazepam or xynazine in laboratory animals: A 10 years experiance. *Lab. Anim.* 15, 163–170, 1981.
8. Hawes, A. S., Fischer, E., Marano, M. A., Van Zee, K. J., Rock, C. S., Lowry S. F., Calvano, S. E., Moldawer, L. L. : Comparison of peripheral blood leukocyte kinetisc after live *Escherichia coli*, endotoxin, orr interleukin-1 alpha administation. Studies using a novel interleukin-1 receptor antagonist. *Ann Surg.*, 218(1):79–90, 1993.
9. Иванц, А., Декић, Р. : Практикум опште физиологије животиња. Природно-математички факултет, Бања Лука, 2006.
10. John, L. R. : **Medical Immunology**. Chapter 48, page, 684, 1997.
11. Kitajima, S., Tsuda, M., Eshida, N., Matsushima, Y., Saitoh, M., Momma, J., Kurokawa, Y. : Lipopolysaccharide-associated elevation of serum and urinary nitrite/nitrate levels and hematological changes in rats. *Toxicol. Lett.*, 78, 2: 135–140, 1995.
12. Korhonen, T. K., Valtonen, M. V., Parkkinen, J., Väisänen-Rhen, V., Finne, J., Orsakov, F., Orsakov, I., Svenson, S. B., Mäkelä, P. H. : Serotypes, Hemolysin Production, and Receptor Recognition of *Escherichia coli* Strains Associated with Neonatal Sepsis and Meningitis. *Infection and Immunity*, pp. 486–491, 1985.

13. Kosumi, T., Usui, N., Kubota, A., Hoki, H., Yamauchi, K., Nogami, T., Ohyanagi, H., Yonekura, T., Hirooka, S., Kakinoki, S., Kaetu, I. : Application of a drug delivery system in a novel rats model of hronic hyperendotoxemia. *Pediatr. Surg. Int.*, 17, 4: 321–325, 2001.
14. Martindale, J., Stroud, D., Moxon, E. R., Tang, C. M. : Genetic analysis of *Echericha coli* K1 gastrointestinal colonization. *Molecular Microbiology* 37(6), 1293–1305, 2000.
15. Ngeleka, M., Martineau-Doize, B., Fairbrother, J. M. : Septicemia-Inducing *Escherichia coli* O115:K“V165“F1651 Resists Killing by Porcine Polymorphonuclear Leukocytes In Vitro: Role of F1651 Fimbriae and K“V165“ O-Antigen Capsule. *Infection and Immunity*, pp. 398–404, 1993.
16. Oladunmoye, M. K. : Immunostimulatory Activity of Ethanolic Leaf Extract from *Ocimum gratissimum* in Albino Rat Orogastrically Dosed with *Escherichia coli* (NCIB 86), *Journal of Pharmacology 1 (4)* 389–394, 2006.
17. Orsakov, I., Orsakov, F. : *Escherichia coli* in extra-intestinal infection. *J. Hyg. Camb.*, 95, 551–575, 1985.
18. Othman, A. Al Sagair, Ezzat S. El Daly, Ahmed A. Mousa: Influence of Bacterial Endotoxins on Bone Marrow and Blood Components in Rats. *Saudi Journal of Biological Sciences* 13 (2) 163–177, 2006.
19. Pacheco, P., Bozza, F. A., Gomes, R. N., Bozza, M., Weller, P. F., Castro-Faria-Neto, H. C., Bozza, P. : Lipopolysaccharide-Induced Leukocyte Lipid Body Formation In Vivo: Innate Immunity Elicited Intracellular Loci Involved in Eicosanoid Metabolism. *The Journal of Immunology* 169: 6498–6506, 2002.
20. Pearson, J. M., Schulze, A. E., Jean, P. A., Roth, R. A. : Platelet partipation in liver injury from gram-negative bacterial lipolysaccharide in the rat. *Shock*, 4, 3: 178–186, 1995.
21. Plos, K., Conneli, H., Jodal, U., Markulund, B., Maild, S., Wettergren, B.: Intestinal carriage of P fimbried *Escherichia coli* and the susceptibility to urinary tract infection in young children. *J.Infect. Immun.* 39: 599–699.
22. Rojas, M., Woods, C. R., Mora, A. L., Xu, J., Brigham, K. L. : Endotoxin-induced lung injury in mice: structural, functional, and biochemical responses. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, Vol. 288 no. 2, 333–341, 2005.
23. Sarff, L. D., McCracken, J. R., Schiffer, M. S., Glode, M. P., Robbins, J. B., Orsakov, I., Orsakov, F. : Epidemiology of *Escherichia coli* K1 in healthy and diseased newborns. *Lancet I*: 1099–1104, 1975.
24. Van Lambalgen, A. A., Rasker M. T., van den Bos, G. C., Thijs, L. G. : Effects of endotoxemia on sistemic plasma loss and hematocrit in rats. *Microvase. Res.*36, 3: 291–304,1988.

Примљено: 18.01.2016.
Одобрено: 20.04.2016.