

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ ИМЕНИ ПОЧЕТНОГО
АКАДЕМИКА Н.Ф.ГАМАЛЕИ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

На правах рукописи

Черкасова Мария Николаевна

**Разработка экспериментальной модели сепсиса для оценки эффективности
лекарственных средств**

1.5.11 – Микробиология

1.5.22 – Клеточная биология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

кандидат медицинских наук

Жуховицкий Владимир Григорьевич

доктор медицинских наук,

член-корреспондент РАН, профессор

Боровая Татьяна Геннадьевна

Москва, 2026

Оглавление

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ	7
ВВЕДЕНИЕ	9
Актуальность темы и степень ее разработанности	9
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	19
1.1 Патогенез сепсиса	19
1.2 Факторы патогенности <i>P. aeruginosa</i> и их роль в патогенезе сепсиса	20
1.3 Экспериментальные модели сепсиса	24
1.4 Реактивные изменения гистологических элементов печени, почек, селезенки, легких и надпочечников при сепсисе.....	30
1.5 Современные терапевтические подходы, апробированные на внутрибрюшинной модели сепсиса, вызванного <i>P. aeruginosa</i>	39
1.6 Препараты на основе малых доз альдегида муравьиной кислоты. Эндогенный альдегид муравьиной кислоты	41
1.7 Заключение	43
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	45
2.1 Дизайн исследования	45
2.2 Материалы	47
2.2.1 Штаммы бактерий	47
2.2.1.1 Эталонные штаммы:	47
2.2.1.2 Бактериальные штаммы, отобранные из рабочей коллекции лаборатории индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи	47
2.2.2 Лабораторные животные.....	47
2.2.3 Лабораторное оборудование	48
2.2.3.1 Лабораторное оборудование общего назначения	48

2.2.3.2 Лабораторное оборудование специального назначения	48
2.2.4 Химические реактивы, красители, диагностические наборы	49
2.2.5 Питательные среды	50
2.2.6 Экспериментальный препарат, используемый для лечения	51
2.3 Методы исследования	51
2.3.1 Методы исследования патогенных свойств штаммов <i>P.aeruginosa</i> , используемых для моделирование сепсиса	51
2.3.1.1 Выделение культур	51
2.3.1.2 Методика генотипирования штаммов <i>P. aeruginosa</i> на наличие генов экзотоксинов А (<i>exoA</i>), U (<i>exoU</i>), S (<i>exoS</i>), Т (<i>exoT</i>), Y (<i>exoY</i>), используемых для моделирование экспериментального сепсиса	52
2.3.1.3 Методика исследования штаммов <i>P. aeruginosa</i> на фосфолипазную активность	55
2.3.1.4 Методика исследования штаммов <i>P. aeruginosa</i> на гемолитическую активность	55
2.3.1.5 Методика оценки ассоциированной со жгутиком подвижности штаммов <i>P. aeruginosa</i>	56
2.3.1.6 Методика оценки действия Астрабионорма на ассоциированную со жгутиком подвижности штаммов <i>P. aeruginosa</i>	56
2.3.1.7 Метод определения антимикробного действия Астрабионорма	57
2.3.1.8 Подготовка культур <i>P. aeruginosa</i> для заражения экспериментальных животных	58
2.3.1.9 Подбор инфицирующих доз <i>P. aeruginosa</i> для создания моделей	58
2.3.1.10 Моделирование сепсиса с использованием разных штаммов <i>P. aeruginosa</i>	59

2.3.1.11 Методика определения <i>P. aeruginosa</i> в перитонеальном смыве, в крови и гомогенатах органов	61
2.3.2 Выбор терапевтической схемы введения Астрабионорма для лечения экспериментального сепсиса	61
2.3.3 Общегистологический и морфометрический анализ органов	62
2.3.3.1 Метод гистохимического окрашивания амидочерным - 10В на общий белок.....	63
2.3.3.2 Окрашивание гистологических срезов по методу Маллори	63
2.3.3.3 Методика иммуногистохимического окрашивания.....	64
2.3.3.4 Метод трансмиссионной электронной микроскопии	64
2.3.4 Молекулярно-биологические исследования	65
2.3.4.1 Определение уровней мРНК интерлейкинов в надпочечниках	65
2.3.5 Статистическая обработка результатов исследования	66
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	68
3.1 Разработка экспериментальной модели сепсиса	68
3.1.1 Характеристика штаммов, используемых для экспериментального моделирования сепсиса.....	68
3.1.2 Результаты генотипирования штаммов <i>P. aeruginosa</i> на наличие генов экзотоксинов А (exoA), U (exoU), S (exoS), Т (exoT), Y (exoY), используемых для моделирование экспериментального сепсиса.....	68
3.1.3 Результаты анализа штаммов на фосфолипазную и гемолитическую активность	70
3.2 Моделирование сепсиса	71
3.2.1 Экспериментальная модель сепсиса, вызванная внутрибрюшинным введением <i>P. aeruginosa</i> 5266.....	71

3.2.2 Экспериментальная модель сепсиса, вызванная внутрибрюшинным введением штамма <i>P. aeruginosa</i> 1623	73
3.3 Гистологические изменения органов на терминальной стадии экспериментального сепсиса	75
3.3.1 Гистологическая характеристика легких	75
3.3.1.1 Результаты проведенной гистохимической реакции на содержание внутриядерного и общего белка в легких	78
3.3.1.2 Анализ показателей высевов из гомогенатов легких и крови	80
3.3.2 Гистологическая характеристика надпочечников	83
3.3.2.1 Результаты электронной микроскопии надпочечников	86
3.3.2.2 Анализ показателей высевов из гомогенатов надпочечников и крови	89
3.3.2.3 Анализ мРНК провоспалительных цитокинов в тканях надпочечников в динамике экспериментального септического процесса	90
3.3.2.4 Результаты иммуногистохимического окрашивания тканей надпочечников на провоспалительные ИЛ-1бета и противовоспалительный ИЛ-10.....	91
3.3.3 Гистологическая характеристика селезенки	92
3.3.3.1 Анализ показателей высевов <i>P. aeruginosa</i> из гомогенатов селезенки и крови.....	95
3.3.4 Гистологическая характеристика печени.....	97
3.3.4.1 Результаты гистохимической реакции печени на содержание внутриядерного и общего белка	100
3.3.4.2 Анализ показателей высевов из гомогенатов печени и крови	100
3.3.5 Гистологическая характеристика почек	103
3.3.5.1 Анализ показателей высевов из почек и крови	107

3.3.6 Бактериологический анализ высеваемости <i>P. aeruginosa</i> из крови, перитонеальной жидкости и гомогенатов органов	108
3.3.7 Признаки взаимодействия <i>P. aeruginosa</i> с эритроцитами.....	113
3.4 Оценка эффективности лекарственного препарата под условным внутрилабораторным названием Астрабионорм.....	114
3.4.1 Изучение ингибирующего действия лекарственного препарата под условным внутрилабораторным названием Астрабионорм на ассоциированную со жгутиком <i>P. aeruginosa</i> подвижность	114
3.4.2 Изучение антибактериального действия Астрабионорма.....	116
3.4.3 Выбор терапевтической схемы введения Астрабионорма для лечения экспериментальных животных	117
3.4.4 Гистологическая характеристика органов, показатели высевок и результаты иммуногистохимического окрашивания срезов органов, после лечения Астрабионормом	121
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	129
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	150
ВЫВОДЫ	152
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	154
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	154
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	156
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	158

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

АБ – лекарственное средство под условным внутрилабораторным названием «Астрабионорм» (Астрабионорм)

АКТГ – адренотропный гормон

АМП – антимикробный пептид

АФК – активные формы кислорода

ГГН – гипоталамо – гипофизарно – надпочечниковая ось

ИЛ-1 – интерлейкин 1

ИЛ-1 бета – интерлейкин 1 бета

ИЛ-6 – интерлейкин 6

ИЛ-8 – интерлейкин 8

ИЛ-10 – интерлейкин 10

ИЛ-12 – интерлейкин 12

ИФН - γ – интерферон - гамма

ЛПС – липополисахарид

ЛТК – липотейховая кислота

мРНК – матричная (информационная) РНК

ОП – оптическая плотность

ОРДС – острый респираторный дистресс – синдром

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ССЗТ – система секреции третьего типа

ФНО α – фактор некроза опухоли - альфа

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) - программа, используемая для поиска гомологов заданной последовательности белка в различных базах данных

CASP – The Colon Ascendens Stent Peritonitis (стентирование брыжейки восходящей ободочной кишки)

CLP – Cecum Ligation and Puncture (перевязка слепой кишки с микроперфорированием ее стенки)

CRPA – карбапенемрезистентная *Pseudomonas aeruginosa*

DAMP (damage – associated molecular patterns) – молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением

HeLa – клеточная линия, полученная из раковой опухоли шейки матки

HT - 29 – клеточная линия, полученная из карциномы толстой кишки человека

HIF - 1 α – индуцируемый гипоксией фактор - 1альфа

ICAM – молекула межклеточной адгезии

NO – оксид азота

iNOS – индуцибельная синтаза оксида азота

LD₅₀ – средняя инфицирующая доза, вызывающая гибель половины животных опытной группы

LD₁₀₀ – средняя инфицирующая доза, вызывающая гибель всех животных опытной группы

MCP-1 – хемотаксический белок моноцитов 1

MIF – фактор торможения миграции макрофагов

MIP-1s – воспалительный белок макрофагов 1s

MIP-2 – воспалительный белок макрофагов 2

NF- κ B – ядерный фактор каппа B

P_aO₂ - парциальное давление кислорода в артериальной крови

Pa – *Pseudomonas aeruginosa* (синегнойная палочка)

Pa 5266 – *Pseudomonas aeruginosa* 5266

Pa 1623 – *Pseudomonas aeruginosa* 1623

PAMP (pathogen – associated molecular patterns) – патоген – ассоциированные молекулярные паттерны

PRR (pattern recognition receptors) – рецепторы распознавания паттернов патогенности (паттерн – распознающие рецепторы)

TLR 4 – Толл - подобный рецептор системы врождённого иммунитета 4

VCAM – васкулярная молекула клеточной адгезии

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы и степень ее разработанности

Несмотря на определенный прогресс в изучении патогенеза и терапии сепсиса, развитие этих направлений знаний остается актуальным как для отечественной, так и для мировой медицины. Согласно статистическим данным с 1990 по 2017 гг., около 48,9 миллионов человек в мире ежегодно страдают от сепсиса, 11 миллионов из них погибают [222]. Основными факторами риска данной патологии являются антибиотикорезистентность, несвоевременно начатая антибактериальная терапия, возраст старше 85 лет, сопутствующие заболевания и травмы (хирургическое вмешательство), иммуносупрессия [5]. Среди причин детской смертности сепсис занимает второе место [97]. Длительная госпитализация и частые инвазивные процедуры также повышают риск развития внутрибольничной инфекции, в то время как введение интенсивных лекарственных препаратов и иммуносупрессивное состояние могут способствовать формированию полирезистентности микроорганизмов и развитию оппортунистической инфекции вместе с отдаленными, в том числе фатальными исходами [268]. Высокий рост случаев нозокомиального сепсиса, связанных, в том числе, с оказанием медицинской помощи [198] – применением цитостатиков в онкологии, иммуносупрессивной терапии в трансплантологии и лечении системных заболеваний, вызывает обоснованное беспокойство [198].

Начиная со времени становления микробиологии в конце XIX века, понимание закономерностей взаимодействия организма человека и микроорганизмов постепенно раскрывало истинную природу сепсиса, приводя со временем к новым определениям и новым терапевтическим подходам. Гетерогенность данной патологии предопределяет как гиперактивацию каскадов защитной системы хозяина, так и разнообразные клинические проявления инфекционного процесса [268]. Для лучшего понимания патогенеза

сепсиса, своевременного выявления и диагностики его ранних стадий, а также эффективного лечения, международное академическое сообщество неоднократно пересматривало и обновляло определение сепсиса [96]. Так, согласно результатам консенсусного совещания, опубликованным в 1992 г. и одобренным в 2003 г., сепсис определялся как синдром системной воспалительной реакции (SIRS), вызванный инфекцией [42, 163]. Успехи в понимании патогенных механизмов сепсиса, признание того, что воспалительные и противовоспалительные реакции запускаются в начале инфекции, участие других механизмов в клеточных и органных дисфункциях, неэффективность стратегий лечения, направленных на воспалительную реакцию, а также озабоченность тем, что концепция очень чувствительна, но не обладает специфичностью, привела к пересмотру концепции сепсиса в 2016 г., в котором сепсис определяется как серьезная, потенциально угрожающая органная дисфункция, вызванная нерегулируемым ответом макроорганизма на инфекцию [224]. И если первая Согласительная Конференция «Сепсис-1» 1991 года выделяла 5 стадий развития септического процесса, то современная концепция «Сепсис-3» 2016 года различает лишь сепсис и септический шок, дифференцирующиеся по клиническим и лабораторно-инструментальным критериям [42, 107, 163]. Недавно группа ученых, (Seymour C.W. с коллегами), при ретроспективном анализе выделили 4 фенотипа сепсиса: альфа, бета, гамма и дельта. Авторами было предложено применение данных фенотипов для дальнейшего идентифицирования сепсиса и своевременного раннего начала лечения при поступлении в лечебное учреждение [232].

Однако, несмотря на проведение нескольких Консесусных конференций [42, 107, 163], до сих пор не удается дать унифицированного определения термина «сепсис»; кроме того, открытым остается вопрос о морфологических критериях сепсиса. Для достоверной диагностики, этиопатогенетически обоснованной терапии и эффективной профилактики сепсиса необходимы точные знания закономерностей его возникновения и развития, начиная с самых ранних стадий. Наряду с клиническими, инструментальными и клинико - лабораторными

исследованиями, одним из приоритетных направлений изучения мультидисциплинарной проблемы сепсиса является экспериментальное моделирование. Среди существующих разновидностей моделей сепсиса различают инъекционные, хирургические, ожоговые, респираторные модели, каждая из которых имеет собственные достоинства и ограничения [164, 191]. При этом, необходимым требованием к каждой модели является возможность неоднократного воспроизведения результатов и подтверждения их на микробиологическом, патоморфологическом, патофизиологическом и биохимическом уровнях [191, 201]. На международной конференции Wiggers-Bernard, состоявшейся в мае 2017 года в Вене, для повышения качества и эффективности исследований были предложены руководящие принципы, рекомендации и ограничения, применимые для доклинических моделей сепсиса. Они были представлены и опубликованы в журналах под аббревиатурой MQTiPSS («Minimum Quality Threshold in Pre-Clinical Sepsis Studies» – Минимальный порог качества в доклинических исследованиях сепсиса). Предполагается, что эти рекомендации должны служить вспомогательной платформой при анализе полученных экспериментальных данных и способствовать повышению уровня надежности при экстраполяции их на развитие сепсиса у человека [114, 167, 201, 269].

Одним из наиболее часто встречающихся патогенных микроорганизмов в условиях многопрофильного стационара является *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*, Pa) – синегнойная палочка [166, 189, 214]. В отчете за 2011-2012 гг. Европейский центр профилактики и контроля отметили, что Pa вызвала 9% внутрибольничных инфекций, являясь четвертым по распространенности возбудителем в больницах Европы [90, 214]. Согласно эпидемиологическим данным, ежегодно около 700 000 человек умирают от бактериальных инфекций, вызванных устойчивыми к антибиотикам штаммами Pa, выделявшейся в европейской популяции с частотой 12,9% [45, 214]. Будучи одной из главных причин инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, Pa относится к группе ESKAPE, куда также входят патогенные микроорганизмы, резистентные к

карбапенемам: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter spp.* Данная группа бактерий отнесена ВОЗ к «критической» группе патогенов, для борьбы с которыми требуется создание новых эффективных антибиотиков [214].

Клинические изоляты Ра, с высоким коэффициентом постоянства, встречающиеся при бактериемии, характеризуются высоким патогенным потенциалом, характеризующимся выраженными вариациями в продукции широкого спектра экзотоксинов (А, U, S, Т, Y), большинство из которых являются эффекторными белками системы секреции III типа. Вместе с тем, патогенный потенциал каждого отдельного штамма складывается не только из комбинации собственных ему экзотоксинов [7, 19, 119, 120, 189, 205, 214], но и протеолитических ферментов, сидерофоров, экзолизина, липаз, белков, индуцирующих апоптоз, пигментов и др. Мощный набор факторов патогенности делает Ра практически неуязвимой для действия бактериостатических и бактерицидных препаратов, а в случае развития сепсиса чаще всего обуславливает наступление летального исхода. Поскольку в модельных экспериментах сепсиса значительно расширяются возможности анализа (по сравнению с клиническими исследованиями), Ра может рассматриваться как кандидатный микроорганизм для моделирования септического процесса – в частности, в рамках модели перитонеального сепсиса мышей.

Цель диссертационной работы явилось создание экспериментальной модели синегнойного сепсиса и оценка эффективности лекарственного средства под условным внутрिलाбораторным названием Астрабионорм.

Для достижения поставленной цели были определены следующие **задачи**:

1. Отобрать из рабочей коллекции лаборатории индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России два штамма Ра, различающихся по наличию генов экзотоксинов *exoU* и *exoS*, оценить их фосфолипазную и гемолитическую активность и ассоциированную со жгутиком подвижность.

2. Определить дозы каждого штамма Ра, способные вызывать соответственно 50%-ную (LD_{50}) и 100%-ную (LD_{100}) воспроизводимую гибель мышей в результате внутрибрюшинного заражения.

3. Изучить динамику высева отобранных штаммов Ра из перитонеальной жидкости, крови и гомогенатов печени, почек, легких, селезенки, надпочечников септических животных от момента заражения до терминальной стадии септического процесса.

4. Проанализировать нарушения структуры указанных органов на терминальной стадии сепсиса, используя методы светооптического и ультраструктурного анализа.

5. Исследовать иммуногистохимические уровни про- и противовоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β и ИЛ-10) и оптическую плотность мРНК провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6 и фактора некроза опухоли) в тканях надпочечников.

6. Изучить *in vitro* влияние Астрабионорма на ассоциированную со жгутиком подвижность отобранных штаммов Ра.

7. Обосновать отсутствие токсичности Астрабионорма и оценить его эффективность *in vivo* в рамках созданной модели, основываясь на вышеописанном комплексе бактериологических, гистологических и иммуногистохимических показателей.

Научная новизна

1. Впервые разработана надёжно воспроизводимая модель синегнойного сепсиса мышей, создаваемая путём внутрибрюшинного заражения штаммами Ра, различающимися по наличию генов экзотоксинов U и S, набору факторов вирулентности, механизму цитотоксического эффекта.

2. Впервые исследована динамика высевок возбудителей сепсиса из перитонеальной жидкости, крови и гомогенатов печени, почек, легких, селезенки, надпочечников в ходе развития септического процесса вплоть до терминальной стадии. Доказана целесообразность ранней бактериологической диагностики бактериемии при синегнойном сепсисе (в созданных моделях высокий высев

зарегистрирован уже через 15 минут после заражения), установлен факт раннего обсеменения исследованных органов возбудителями (в созданных моделях высокий высеv зарегистрирован уже через 30-60 минут после заражения).

3. Впервые охарактеризованы детали гистологических изменений селезенки, почек, печени в зависимости от свойств штамма возбудителя синегнойного сепсиса и выявлены общие для обоих штаммов признаки структурных изменений легких и надпочечников.

4. Впервые в тканях надпочечников мышей в рамках разработанных моделей сепсиса выявлены высокие показатели оптической плотности мРНК провоспалительных цитокинов (ИЛ-1бета, ИЛ-6, ФНО) наряду с деструкцией клеток коркового и мозгового вещества.

5. Впервые методом трансмиссионной электронной микроскопии в сосудах септических животных обнаружено исчезновение мелкодисперсной текстуры плазмы вокруг Ра и формирование эритроцитами микровыростов по направлению к Ра (признак перехода эритроцитов в стареющие формы – эхиноциты), что предполагает прямое воздействие факторов вирулентности исследованных штаммов Ра на белковый состав плазмы крови, мембрану и цитоскелет эритроцитов.

6. Впервые в условиях *in vitro* доказано эффективное (практически полное) подавление Астрабионормом подвижности и размножения Ра; в условиях *in vivo* – отсутствие токсического эффекта Астрабионорма, как в зонах введения, так и для организма животных в целом.

7. На основе проведенного бактериологического и гистологического анализов доказана эффективность Астрабионорма в терапии экспериментального синегнойного сепсиса мышей, вызванного Ра.

Теоретическая и практическая значимость работы

Показано, что экспериментальный синегнойный сепсис у мышей, вызванный внутрибрюшинным введением культуры штамма Ра 1623 ($LD_{100} = 7 \times 10^6$ КОЕ/мышь) и штамма Ра 5266 ($LD_{100} = 3 \times 10^7$ КОЕ/мышь), характеризуется острым характером течения. Получение высокого высева каждого штамма Ра из

крови возможен уже через 15 минут после инфицирования, поэтому с практической точки зрения может быть рекомендовано проведение бактериологического исследования крови в наиболее ранние сроки развития сепсиса, даже при отсутствии выраженных клинических проявлений. Полученные данные о гистологических изменениях органов дополняют существующие представления о патогенезе сепсиса как полиорганной патологии, детализируют изменения в зависимости от свойств штамма Ра – в частности, от наличия генов *exoU* и *exoS* и различий в фосфолипазной и гемолитической активности.

Получены доказательства эффективности лечения экспериментального синегнойного сепсиса мышей лекарственным средством Астрабионорм, действующим началом которого являются микродозы альдегида муравьиной кислоты.

Внедрение полученных результатов в практику

Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс кафедры микробиологии имени академика З.В. Ермольевой ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России: используются в лекционном курсе по медицинской микробиологии; включены в учебные планы циклов для подготовки ординаторов, циклов профессиональной переподготовки и повышения квалификации врачей по направлению «Бактериология».

Методические материалы внедрены в цикл лекций по изучению патогенеза сепсиса на кафедре инфектологии и вирусологии ИПО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России («Сеченовского Университета»).

Методические рекомендации по разработке экспериментальной модели сепсиса внедрены в исследовательскую практику лаборатории биологически активных наноструктур ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Методология и методы исследования

Методологическая основа исследования включала разработку экспериментальной модели сепсиса, вызванного введением разных штаммов Ра, различающихся по наличию генов экзотоксинов *exoU* и *exoS*, и оценку возможности использования разработанной модели для оценки эффективности

лекарственных средств. В работе использованы современные бактериологические, молекулярно-биологические, гистологические, гистохимические, иммуногистохимические, морфометрические и статистические методы исследования, а также методы работы с экспериментальными животными. Эксперименты были выполнены в соответствии с положениями «Директивы Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 года о защите животных, использующихся для научных целей» и в соответствии с ГОСТ 33216–2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами»; «Европейской Конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (2005). Работа с лабораторными животными была одобрена комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России (Протокол № 66 от 31 октября 2023 г.).

Степень достоверности полученных результатов

Необходимый уровень достоверности и обоснованность полученных результатов подтверждены достаточным количеством животных, экспериментов и наблюдений, проведенных с использованием современных методов, соответствующих поставленным цели и задачам, а также использованием статистических методов, позволяющих решить поставленные задачи.

Основные положения, выдвигаемые на защиту

1. Разработанные модели синегнойного сепсиса хорошо воспроизводимы, позволяют исследовать септический процесс в динамике. Ранний высеv возбудителей из крови (через 15 минут после заражения) и из гомогенатов органов (через 30 - 60 минут после заражения), наступление гибели 100% животных через 20-26 ч представляют общую характеристику экспериментального синегнойного сепсиса и указывают на целесообразность его ранней бактериологической диагностики.

2. Различия в свойствах штаммов *P. aeruginosa*, использованных в моделировании синегнойного сепсиса, реализуются в достоверных отличиях

морфологических изменений печени, почек и селезенки септических животных при отсутствии различий в структурных изменениях легких и надпочечников.

3. Лекарственное средство под условным внутрилабораторным названием Астрабионорм угнетает *in vitro* подвижность, размножение и гемолитическую активность использованных в моделировании штаммов Ра, не является токсичным для животных. Повторные внутримышечные инъекции средства в примененной дозировке, начиная с 60 минут после заражения, приводят к 100%-ному выживанию мышей, предотвращают развитие деструкции исследованных органов, обеспечивают полную элиминацию Ра из крови, перитонеальной жидкости и органов в течение одной недели после инфицирования.

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы доложены на 25-й Всероссийской научной конференции «Гистогенез, реактивность и регенерация тканей», (Санкт-Петербург, 2021); VII Российском конгрессе лабораторной медицины (Москва, 2021); IX Всероссийском съезде анатомов, гистологов и эмбриологов России с международным участием «Фундаментальная и прикладная морфология в XXI веке» (Оренбург, 2025).

Апробация диссертации состоялась **«25» февраля 2025 г.** на совместной научной конференции отдела медицинской микробиологии и отдела бактериальных инфекций ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (Протокол № 1 от 25.02.2025).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Научные положения диссертации соответствуют паспортам специальностей 1.5.11 – Микробиология и 1.5.22 – Клеточная биология. Результаты проведенного исследования соответствуют пунктам 4, 6 и 12 паспорта специальности 1.5.11 – Микробиология и пунктам 1 и 22 паспорта специальности 1.5.22 – Клеточная биология.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 7 научных работ (5 статей и 2 тезисов). 4 статьи и 1 тезисы – в рецензируемых научных изданиях,

рекомендованных ВАК Минобрнауки России для публикации основных научных результатов диссертации.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 190 страницах машинописного текста и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследований, обсуждение, заключение, выводы, список используемой литературы (269 источников, из которых отечественных публикаций – 19, иностранных публикаций – 250). Работа содержит 26 таблиц и 71 рисунок.

Личный вклад автора.

Автор самостоятельно запланировал исследование, разработал дизайн и протоколы экспериментов, определил сроки их выполнения, осуществил подбор штаммов Ра и их фенотипическую и генотипическую характеристику, разработал экспериментальную модель сепсиса, выполнил бактериологические, молекулярно-биологические, гистологические, гистохимические, иммуногистохимические, морфометрические, электронномикроскопические исследования. Автором самостоятельно разработана схема введения лекарственного средства Астрабионорм и оценка его эффективности, а также статистическая обработка и анализ результатов исследования.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Патогенез сепсиса

Согласно современному определению, сепсис представляет собой неуправляемый реактивный ответ иммунной системы организма, возникающий в результате попадания в организм инфекционного агента, который характеризуется дисбалансом различных механизмов коррекции гомеостаза на биохимическом, клеточном, тканевом, органном и организменном уровнях [128]. Триггерами системного воспалительного ответа при сепсисе являются как разнообразные паттерны патогенности микроорганизмов (PAMP), так и разнообразные паттерны опасности (DAMP): структурные компоненты продуктов деструкции тканей макроорганизма, поступающие в сосудистое русло и накапливающиеся в нём в ходе септического процесса [128]. В ответ на вторжение в организм патогенных микроорганизмов, происходит активация врожденной иммунной системы посредством связывания ассоциированных с патогенами молекулярных паттернов со специфическими рецепторами распознавания образов (PRR) на поверхности антигенпрезентирующих клеток и моноцитов [128, 218]. Взаимодействие ассоциированных с патогенами молекулярных паттернов с PRR приводит к активации внутриклеточных путей передачи сигнала, вызывая тем самым транслокацию энхансера ядерного фактора каппа – легкой цепи активированных В-клеток (NF- κ B) в ядро клетки, что приводит к экспрессии “генов ранней активации” и активации экспрессии цитокинов и хемокинов [136]. Клетки врожденного иммунитета проникают в инфицированные ткани, после чего следует массивный выброс провоспалительных цитокинов: фактора некроза опухоли (ФНО), интерлейкинов ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-12, ИНФ-гамма; и хемокинов: ИЛ-8; белков (MIP)-1s, MIP-2, хемотаксического белка моноцитов (MCP-1), фактора торможения миграции макрофагов (MIF) [34, 199], что впоследствии приводит к развитию так

называемого “цитокинового шторма” [199]. Наряду с провоспалительными цитокинами, моноциты и макрофаги продуцируют индуцируемый гипоксией фактор 1 α (HIF-1 α) [116] и хемотаксический белок моноцитов (MCP-1) [128], инициирующие противовоспалительную составляющую системного воспалительного ответа [136]. Наконец, PAMP, DAMP и провоспалительные цитокины стимулируют повышенную экспрессию на поверхности эндотелиоцитов молекул адгезии (ICAM и VCAM) [78], а также фактора прокоагулянтной активности крови (фактора фон Виллебранда) и P - селектина, а также выброс активных форм кислорода (АФК), оксида азота, что, в свою очередь, стимулирует активность индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) [78, 177]. Индуцированный выброс провоспалительных цитокинов, с одной стороны, и прокоагулянтная активность крови, с другой, потенцируются тромбоцитами, следствием чего становится микротромбоз капилляров и венул, приводящий, во-первых, к гипоперфузии и гипоксии тканей и органов, и к расстыковке эндотелиального пласта и капиллярной утечке в ткани – во-вторых [78, 116, 132, 136, 177, 219, 257, 264]. Наступающее в условиях гипоксии доминирование гликолиза над окислительным фосфорилированием, опосредованное HIF-1 α , приводит к окислительному стрессу и митохондриальной дисфункции – инициирующим этапам органной и, далее, полиорганной недостаточности [78, 116, 136, 244]. Повышенный уровень апоптоза Т - и В - клеток, истощение Т - клеток, клеточная анергия (например, моноцитов и макрофагов) и снижение экспрессии активирующих молекул клеточной поверхности впоследствии приводит к иммуносупрессии [252].

1.2 Факторы патогенности *P. aeruginosa* и их роль в патогенезе сепсиса

P. aeruginosa (Pa) представляет собой серьезную угрозу из-за своей высокой вариабельной патогенности, экологической гибкости, высокому уровню

антибиотикорезистентности, динамической природе генома и метаболической универсальности [153, 202]. Благодаря представительному арсеналу факторов патогенности, *Pa* способна вызывать серьезные инфекционные процессы. *Pa* демонстрирует обширный репертуар как клеточно - ассоциированных, так и внеклеточных факторов патогенности, эффекторное проявление которых контролируется сложными, взаимосвязанными регуляторными цепями и сигнальными системами, что придаёт этому патогену большую пластичность и специфичность для каждой системы органов [37, 140, 189].

Pa обладает различными структурами, обеспечивающими подвижность и адгезию бактериальных клеток: полярным жгутиком [7, 115], несколькими типами пилей IV (Т4Р: пили типа IVa, IVb, пили с плотным прилеганием [7, 108, 115], фимбриями [7], адгезиновыми лектинами PA-IL (LecA) и PA-III (LecB) [7, 131], а также альгинатом (слизью) и липидом А [7].

Важнейшим в патогенетическом отношении компонентом клеточной стенки *Pa* является липополисахарид (ЛПС), липид А которого обеспечивает взаимодействие ЛПС с Toll-подобными рецепторами (TLR) 4 типа [7, 208]. Инвазии и диссеминации бактерий способствуют протеолитические ферменты *Pa*: эластазы LasA и LasB (протеазы II типа), щелочная протеаза AprA (протеаза III типа), PrpL (протеаза IV типа) [7, 53].

В качестве факторов инвазии также могут выступать сидерофоры, экзолизин (ExlA), экзоферменты липазы LipA, LipB, LipC, фосфолипаза C, экзотоксин А, белки, индуцирующие апоптоз, ЛПС, а также другие ферменты, токсины и белки, находящиеся в патогенном арсенале *Pa* [7].

Для реализации многих ферментативных процессов *Pa* нуждается в таком важном кофакторе как железо [7, 66]. Из - за лимитированного свободного содержания железа *Pa* синтезирует синдерины трёх типов: флуоресцентный высокоаффинный пептид пиовердин (Pvd), пиохелин (Pch) и салициловую кислоту [7, 65]. Pvd и Pch обладают способностью хелатировать железо Fe^{3+} из трансферрина и лактоферрина, что приводит к стимуляции роста бактерий [68]. Порообразующий токсин экзолизин (ExlA) вызывает повреждение альвеол,

способствует росту и диссеминации бактерий в организме [46], а также проявляет цитолизинговую активность и вызывает разрыв плазматической мембраны, что приводит к некротической гибели клеток [166]. Липазы (LipA, LipB, LipC) совместно с фосфолипазой C способствуют расщеплению фосфолипидов мембран эукариотических клеток и сфингомиелина, а также обладают гемолитической активностью [7, 149]. Фосфолипаза C, разрушающая фосфотидилхолин внешнего слоя мембран эритроцитов, продуцируется Pa в трех формах: гемолитической (PlcHR), негемолитической (PlcN) и PlcB [200]. Несколько исследований показали, что гемолитическая фосфолипаза C способна индуцировать проницаемость сосудов хозяина, повреждение органов и гибель клеток [166]. Серьезные деструктивные изменения, характеризующиеся некрозами, кровоизлияниями и формирующийся острой и хронической дисфункцией в почках, паренхиме печени и легких вызывает экзотоксин A [7].

Большинство вышеописанных факторов патогенности высвобождаются из цитоплазмы Pa благодаря системам секреции 1 и 2 типов, следующая группа токсинов реализуется через так называемый “макромолекулярный шприц” – систему секреции 3 типа (ССЗТ) [19, 110]. В результате формирования “макромолекулярного шприца” бактериальная клетка оказывается плотно адгезированной к мембране эукариотической клетки и реализация токсинов происходит только “контактным путем” – из цитоплазмы в цитоплазму [7, 110]. ССЗТ Pa состоит из нескольких белков, которые образуют макромолекулярный комплекс, охватывающий внутреннюю бактериальную мембрану, периплазматическое пространство, пептидогликановый слой, внешнюю бактериальную мембрану, внеклеточное пространство и мембрану клетки – хозяина. В состав ССЗТ входят такие эффекторные белки, как ExoU, ExoS, ExoY, ExoT, а также белки, регулирующие процесс секреции и являющиеся модуляторами транскрипции [94, 110].

ExoU, обладающий высокой фосфолипазной активностью, является наиболее вирулентным эффектором ССЗТ, вызывающим быструю некротическую гибель клеток [19, 110, 119]. Он обладает активностью фосфолипазы A2, которая

необратимо разрушает плазматическую мембрану клетки - хозяина, вызывая быструю клеточную гибель [120]. Активность ExoU направлена против фагоцитов и эпителия, а также способствует диссеминации бактерий [110].

ExoY представляет собой растворимую аденилатциклазу, повышающую внутриклеточные уровни различных циклических нуклеотидов (цАМФ, цЦМФ, цГМФ и цУМФ) клеток млекопитающих [38, 110], что приводит к необратимой деструкции актиновых микротрубочек, некрозу клеток и нарушению целостности эндотелиального барьера [260].

Эфektorные белки ExoS и ExoT представляют собой бифункциональные белки, которые активируют ГТФ-азы и обладают активностью АДФ-рибозилтрансфераз [94, 110]. Разрушая актиновый цитоскелет эукариотических клеток ExoS и ExoT, препятствуют межклеточной адгезии, и индуцируют апоптоз клеток макроорганизма [94, 110]. ExoT и ExoS также играют значительную роль в снижении поглощения макрофагами *P. aeruginosa* [94, 110].

ExoS — токсин, секретирующийся системой секреции III типа (ССЗТ) как через контактно - зависимые (внутриклеточное действие), так и через контактно-независимые пути (внеклеточное действие) [89]. При внутриклеточном воздействии ССЗТ через транслокационную пору осуществляется транспорт ExoS из бактериальной клетки в цитозоль клетки — мишени, приводя к клеточной цитотоксичности [19, 89]. В то же время, внеклеточный ExoS стимулирует как моноциты, так и Т - клетки напрямую. Внеклеточный ExoS вызывает активацию Т - клеток, приводя к их апоптозу, тогда как активация моноцитов приводит к выработке широкого спектра провоспалительных цитокинов и хемокинов [89]. Еще одной известной особенностью, характерной для ExoS является действие его на клетки — мишени, связываясь с рецепторами врожденного иммунитета TLR2 и TLR4 [89].

Как правило, спектр эфektorных токсинов ССЗТ, определяющих фенотип штамма Pa, и уровень их экспрессии коррелируют со степенью тяжести инфекционного процесса и клиническим исходом заболевания [94].

К числу прочих факторов патогенности Ра относятся липолитические ферменты лейкоцидин и секретируемая липоксигеназа (LoxA), способная вмешиваться в передачу сигналов и регулировать процесс бактериальной инвазии [188].

В качестве факторов инвазии Ра немаловажную роль играет пигмент пиоцианин, угнетающий биение ресничек и вызывающий разрушение эпителия и усиление секреции слизи в дыхательных путях, способствуя, тем самым, колонизации легких [7]. Пиоцианин также усиливает продукцию ИЛ - 8 альвеолярными макрофагами, обеспечивая, тем самым, привлечение нейтрофилов в очаг воспаления [109]; кроме того, пиоцианин, как и пиовердин, способен вызывать гемолиз эритроцитов [7].

Уклонение Ра от иммунного ответа обеспечивается рамнолипидами, которые вызывают некротическое уничтожение полиморфноядерных лейкоцитов [25, 138], гемолиз человеческих эритроцитов [225], а также некротическую гибель нейтрофилов [138].

Важнейшим в патогенетическом отношении качеством Ра, обеспечивающим её выживание и персистенцию в неблагоприятных условиях, а также реализацию патогенного потенциала, является способность к образованию биопленок [7].

Таким образом, охарактеризованный выше широкий спектр факторов патогенности обеспечивает Ра колонизацию разнообразных органов и тканей человека и персистенцию в них, что приводит к формированию инфекционного процесса, нередко завершающегося летальным исходом [7, 189].

1.3 Экспериментальные модели сепсиса

На данный момент существуют несколько категорий моделей сепсиса, используемых в экспериментах: инъекционные, хирургические, ожоговые, модель пневмонии с последующим переходом в сепсис [6, 211].

По характеру фактора, инициирующего развитие сепсиса, инъекционные модели распределяются следующим образом: введение животным токсинов (внутрибрюшинно или внутривенно вводится липополисахарид (ЛПС) – эндотоксин грамотрицательных бактерий, и липотейховая кислота грамположительных бактерий (ЛТК), а также зимозан – полисахарид, содержащийся в клеточной стенке некоторых видов дрожжей [6, 239]. При внутривенном или внутрибрюшинном введении липополисахарида мышам, запускается каскад реакций врожденного иммунитета, проявляющийся быстрым наступлением системных клинических признаков эндотоксинемии, ведущей к молниеносным осложнениям в короткие сроки после введения – диссеминированному внутрисосудистому свертыванию и шоку [185, 191]. В литературных источниках также было отмечено, что концентрация ЛПС, используемая для моделирования сепсиса на мышах, широко варьировала в зависимости от происхождения эндотоксина и линии животного [6, 239]. При введении зимозана – компонента клеточной стенки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* регистрируется достаточно продолжительный период течения сепсиса до его исхода в полиорганную недостаточность, что позволяет при этом подробно наблюдать динамику развития сепсиса. Недостатком модели является циклический вариант течения сепсиса и не всегда сопоставимые показатели экспрессии цитокинов, активации макрофагальной реакции и длительности фагоцитоза зимозана с аналогичными показателями у человека [139, 190, 239, 259].

Вариантами хирургической модели являются: имплантация зараженного материала в брюшную полость (очаг инфекции создается введением в брюшную полость желатиновых капсул со смешанным бактериальным содержимым, либо с одним из штаммов возбудителя), перевязка слепой кишки с микроперфорированием ее стенки (Cecum Ligation and Puncture, CLP), стентирование брыжейки восходящей ободочной кишки (The Colon Ascendens Stent Peritonitis, CASP). Основными преимуществами моделей хирургического профиля, например – перевязки слепой кишки с микроперфорированием ее стенки является то, что оператор может контролировать количество содержимого слепой

кишки, выделившегося в брюшную полость, а также величину ишемического повреждения кишки, изменяя диаметр иглы и (или) длину перевязанного участка кишки. Однако данные модели сложно стандартизировать, т. к. бактериальный состав содержимого кишки у разных животных варьирует не только от линии к линии, но и между животными одной линии и даже одного помета. Поэтому характер реактивных изменений, бактериологических, гематологических, иммунологических и биохимических показателей в различных вариантах этого моделирования могут существенно отличаться [191].

Часто для улучшения выживаемости экспериментальных животных (в первую очередь, в рамках хирургических моделей сепсиса) применяются антибиотики; при этом, применяются разные виды и комбинации этих препаратов, что объясняет имеющиеся разногласия в результатах проведенных опытов и ставит дополнительное препятствие для стандартизации модели [164]. Суть ожоговой модели заключается в подкожном введении инфицирующего агента (наиболее часто в этой роли выступают *P. aeruginosa* и *S. aureus*) в участок искусственно созданного термического ожога. В целом, при создании ожоговых моделей сепсиса в разных исследованиях на мышах либо на крысах, часто существенно варьируют фактор температуры, продолжительность и площадь воздействия термического раздражителя на кожу. Анатомическая и гистологическая структура эпидермиса и дермы человека и мыши довольно сильно различаются, что затрудняет интерпретацию результатов эксперимента и экстраполяцию их на организм человека [20, 215]. Модель пневмонии с последующим развитием сепсиса предполагает первоначальное моделирование бактериального воспалительного поражения легких. Таким образом, были предложены модели, использующие разные пути введения бактерий: интраназальный, интратрахеальный и аэрозольный [164, 193].

Видовая принадлежность избранного для моделирования сепсиса животного также влияет на способ введения бактерий. Например, мыши и крысы не имеют кашлевых рефлексов, что делает назальный путь особенно актуальным вариантом заражения у этого вида. Напротив, у морских свинок отмечен

выраженный кашлевой рефлекс, и это объясняет необходимость использования интратрахеальных или аэрозольных путей. Так как грызуны имеют высокую устойчивость к патогенам, в рассматриваемых моделях часто прибегают к иммуносупрессии для увеличения восприимчивости животного к инфекции. Применение иммуносупрессивных препаратов из-за их побочных действий на организм значительно осложняет интерпретацию результатов опытов [126].

Кроме того, следует отметить, что при хирургическом моделировании сепсиса, ожоговой модели, а также в моделировании пневмонии используется метод общей анестезии животных. Долгое время на выбор метода обезболивания обращали мало внимания, в то время как практически все анестетики негативно влияют на деятельность сердечно - сосудистой системы, изменяя активность перфузии органов кровью и требуя время на восстановление организма после наркоза. Иными словами, любой анестетик оказывает дополнительное негативное влияние на организм, и с разными способами анестезии могут быть связаны имеющиеся разногласия результатов разных исследований [164, 168, 254].

При моделировании сепсиса используются различные животные (мыши [213], свиньи [249], собаки [102], крысы [63, 242]), которым в зависимости от дизайна эксперимента внутривенно [242, 249, 250], внутрибрюшинно [63, 102, 213], интраназально, интратрахеально [164, 193] вводится живая бактериальная культура одного штамма, относящегося, как правило к видам *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* [60, 164, 191]. Показано, что, как при внутрибрюшинном [64, 117], так и при внутривенном [33, 141, 233] введении летальность животных в ходе эксперимента, в первую очередь, зависит от количества введенных бактерий, способов введения и сопутствующего применения антибиотиков [164]. Так, если бактерии были введены в высоких дозах, то они не колонизировали макроорганизм и не размножались в его органах, так как практически мгновенно лизировались системой комплемента; при этом возникал не сепсис, а состояние эндотоксинемии, которое проявлялось характерным молниеносным течением, снижением гемодинамики, бурной экспрессией цитокинов и, при отсутствии своевременной реанимации, приводило

к молниеносной летальности [191]. При анализе инъекционных моделей с использованием живого возбудителя, менее сложным и более атравматичным является внутрибрюшинной способ заражения [164]. Следует отметить важную деталь: при различных путях введения бактерий регистрируется разница в ответе цитокинов, которая характеризуется более выраженной экспрессией ФНО, ИЛ - 6, ИЛ - 1 при внутривенном введении, нежели при внутрибрюшинном [60]. В литературе имеют также место исследования, в которых сепсис был моделирован с последующим введением антибиотиков и проведением инфузионной терапии. Это способствовало выживанию животных в течение более длительного времени, что позволяло авторам этих исследований более детально регистрировать и анализировать структурно-функциональные перестройки органов [164]. Однако, антибиотикотерапия не всегда имеет положительное вспомогательное значение, и даже напротив: антибиотики, действуя бактерицидно, способствуют выраженному воспалительному ответу, сопровождающемуся высоким уровнем ФНО, и ухудшению гемодинамики с исходом в коллапс [211].

Анализ литературных источников показал, что при сепсисе, вызванном Ра, помимо повышения концентрации провоспалительных цитокинов в крови [141, 233], наблюдается распространение Ра из кровотока в желчный пузырь, где она размножается, попадает в кишечник и выделяется с калом, что способствует инфицированию других, не вовлечённых непосредственно в эксперимент, животных [33].

При моделировании сепсиса на свиньях были использованы как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии в одинаковой дозе. При этом, гемодинамические и легочные изменения зависели от используемых видов бактерий: в то время, как *S. aureus* вызывал минимальные изменения, *E. coli* и *P. aeruginosa* приводили к шоку и острой дыхательной недостаточности. Сепсис у экспериментальных животных, вызванный *S. aureus* характеризовался высоким уровнем бактериального клиренса в легких с легочной гипертензией, незначительным снижением P_aO_2 и относительно слабо выраженными морфологическими изменениями. При сепсисе, инициированном *P. aeruginosa* и

E. coli, зарегистрирована системная гипотензия, легочная гипертензия, повышенное сопротивление легочных сосудов, гипоксемия и снижение легочного клиренса [75]. Внутривенное введение *E. coli* павианам приводило к диссеминированному внутрисосудистому свертыванию, способствуя развитию полиорганной недостаточности [247]. На примере модели внутрибрюшинного инфицирования мышей *Toxoplasma gondii* [98], зарегистрирован апоптоз лимфоцитов селезенки, который является важным звеном патогенеза сепсиса [262].

Экспериментальный сепсис, также может быть инициирован внутрибрюшинным введением мышам *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978. В рамках этой модели была успешно продемонстрирована терапевтическая эффективность лизофосфатидилхолина, в результате лечения которым происходило уменьшение количества бактерий в крови и снижение концентрации провоспалительных цитокинов [203].

Несмотря на скептицизм некоторых исследователей по отношению модели внутрибрюшинного введения, она обладает несомненным достоинством: контролированию вводимой инфицирующей дозы бактериальной культуры. Кроме того, при инъекции одного штамма бактерий, возможно изучение специфических путей метаболизма макроорганизма, на которые влияет определенный, заведомо выбранный штамм возбудителя, что невозможно осуществить, к примеру, на модели лигирования слепой кишки. Следует заметить, что существует ряд видоспецифических особенностей взаимодействия макроорганизма и бактерий. Так, например, бактерии вида *Salmonella typhi* не вызывают генерализованную инфекцию у лабораторных мышей, но ответственны за возникновение брюшного тифа у человека. У мышей же родственный вид *Salmonella typhimurium* инициирует системную инфекцию и обычно используется в моделировании брюшного тифа, несмотря на его низкую вирулентность для человека. Таким образом, один и тот же вид бактерий может вызывать различные формы инфекционного процесса и его клинические проявления у разных видов хозяев [210].

Таким образом, несмотря на ограничения, которые касаются каждой модели сепсиса, целесообразно использовать разные модели на разных видах животных. Сопоставление и сравнение полученных в процессе экспериментов результаты, позволят выяснить основные общие патогенетические критерии сепсиса.

1.4 Реактивные изменения гистологических элементов печени, почек, селезенки, легких и надпочечников при сепсисе

В отличие от большинства патологических состояний, сепсис не имеет общепризнанных унифицированных морфологических критериев. Существуют лишь клиническо - диагностические и биохимические тесты (концентрация билирубина, креатинина и т.д.), результаты которых могут быть учтены при постановке клинического диагноза [203]. Согласно данным доступной литературы [1, 4, 9], основными микроанатомическими критериями сепсиса считаются зарегистрированный первичный септический очаг, гнойные очаги в органах, а также септическая селезенка. При этом, предполагается существование морфологических разновидностей сепсиса в зависимости от этиологического фактора, а морфологическая картина первичного очага может иметь ряд особенностей, зависящих от типа возбудителя. Так, при сепсисе, вызванном Ра, в тканях, регистрируются, главным образом, мелкие некрозы с резко выраженными нарушениями кровообращения, кровоизлияниями в виде геморрагического венчика. Вокруг этих очагов отмечается незначительная клеточная лейкоцитарная реакция, среди некротических масс содержатся обломки ядер лейкоцитов, а также моноциты и лимфоциты. При стафилококковом сепсисе отмечаются абсцессы в мягких тканях, а при сепсисе, вызванном стрептококками, выражены некротические изменения с лейкоцитарной инфильтрацией по периферии. В разных случаях отмечается неоднородность и различия в морфологической

картине органов при сепсисе [9, 18]. Кроме того, патологическим звеном характерным для сепсиса является наличие поражения в микроциркуляторном русле [17, 156, 157, 158, 159, 179].

Известно, что уникальной особенностью микроциркуляторного русла печени является ее обильная внутриорганный система [11]. Наличие обильного кровообращения приводит к системным микроциркуляторным нарушениям, происходящим при распространении бактерий и эндотоксинов, с последующей активацией воспалительных цитокинов [127]. Согласно литературным источникам [194, 230], при сепсисе происходит снижение печеночного кровотока, с последующим формированием в крупных сосудах и микроциркуляторном русле венозного застоя. Несмотря на прогностическую значимость дисфункции печени при сепсисе, на данный момент существует мало информации о ее гистологических изменениях [95, 176]. Согласно О.Д. Мишневу, А.И. Щеголеву, О.А. Трусову [9] гистологическая картина печени характеризуется выраженными в различной степени повреждениями и некрозами гепатоцитов, повреждениями и уменьшением числа эндотелиоцитов, уменьшением числа клеток Купфера. Перераспределение внутрипеченочного кровотока в сочетании со сложным взаимодействием между синусоидальными эндотелиальными клетками, макрофагами печени и лейкоцитами приводит к снижению перфузии и скорости кровотока в печеночных синусоидах [227, 236].

Реактивные гистологические изменения почек при септическом поражении у пациентов характеризуются деструктивными изменениями от минимальных до распространенных очагов апоптоза, некроза и воспаления в корковом веществе [246]. Поражения коркового вещества также регистрировались на животных при экспериментальном моделировании сепсиса и зависели от продолжительности и тяжести эксперимента [67, 74, 83, 265]. Поражение почек часто наблюдается при сепсисе, вызванном грамотрицательными бактериями [83, 221, 229, 267]. Уникальное анатомическое расположение капилляров и канальцевой гистоструктуры почек [11] обуславливает изменения в микроциркуляции, имеющие глубокое влияние на функцию почек. Это играет огромную роль в

основе восприимчивости почек к острому ишемическому повреждению [17, 23, 158, 160]. В клубочках почек расположена уникальная «чудесная сеть», отвечающая за гомеостаз гемодинамической регуляции и основную функцию почки: фильтрацию плазмы крови и образование мочи. Существуют свидетельства уменьшения внутривисочечного кровотока и фильтрационного давления при сепсисе и, соответственно, снижения эффективности процесса фильтрации [62, 106]. По данным литературы [84, 89] ЛПС грамотрицательных бактерий, проникает через почечный фильтр в полость капсулы и прямо воздействует на эпителий проксимальных извитых канальцев (первого участка канальцевой реабсорбции корковых нефронов), используя TLR4 - зависимый путь, вызывая деструктивные изменения в проксимальных канальцах. При воздействии ЛПС с TLR4 происходит активация функции пероксисом эпителиоцитов с последующей активацией по TLR4 - зависимому пути и инициацией деструктивных изменений данных клеток [82, 157]. Кроме того, ЛПС, а также цитокины увеличивают экспрессию Р - селектина на поверхности эндотелиальных клеток и иницируют адгезию тромбоцитов при сепсисе [169]. Следовательно, активация, агрегация и адгезия тромбоцитов к эндотелию при сепсисе способствует образованию микротромбов и вызывает закупорку капилляров. В норме плазма крови фильтруется из капилляров клубочков в просвет капсулы Шумлянського - Боумена, а проницаемость сосудов регулируется гидростатическим давлением в клубочках, онкотическим давлением и барьером клубочковой фильтрации [21]. Эндотелий микрососудов покрыт слоем гликокаликса, который состоит из протеогликанов (синдекан и глипикан), отрицательно заряженных гликозаминогликанов (гиалуронан, гепарансульфат и хондроитинсульфат) и растворимых компонентов. В нормальных физиологических условиях эндотелиальный гликокаликс играет активную роль в поддержании сосудистого гомеостаза, индуцируя эндотелиальные клетки к синтезу оксида азота (NO) и предотвращая адгезию тромбоцитов и лейкоцитов, а также регулируя сосудистую проницаемость и тонус [56]. На экспериментальной модели полимикробного сепсиса на крысах Adembri с коллегами было

установлено, что сепсис также связан со значительным изменением состава гликокаликса. Авторы наблюдали снижение экспрессии синдекана - I, содержания гиалуронана и общего количества сиаловой кислоты в ткани почек; они также наблюдали увеличение уровней ФНО - альфа в плазме и уровня альбумина в моче с потерей проницаемости [21]. Мишневым О.Д. и коллегами была зарегистрирована ишемия коркового вещества почек при сепсисе, тубулярные некрозы, гипоперфузия, а также преренальная и ренальная формы острой почечной недостаточности [9]. В исследовании Aslan с коллегами при гистологическом исследовании почек от 27 пациентов, зарегистрировано практически полное отсутствие изменений в клубочках, инфильтрация нейтрофилами и макрофагами и преимущественно поражение тубуло - интерстициальной области с преобладанием острого тубулярного некроза [30]. В исследовании Garofalo с коллегами были найдены другие специфические гистологические изменения в почках: апоптоз, вакуолизация канальцевых клеток, отек и повреждение щеточной каемки, при этом регистрировалась низкая распространенность острого тубулярного некроза [95]. В исследовании Takasu с коллегами, у 20 пациентов, которые умерли от сепсиса, в 3 из 20 образцов обнаружены очаговые повреждения примерно 1% почечных канальцев, очаговое острое тубулярное повреждение присутствовало в 78% септических почек, при электронной микроскопии выявлено деструктивные изменения почечных канальцев при сепсисе, включая гидропические (набухшие) митохондрии и увеличение количества аутофагосом [246]. В исследовании Lerolle было обнаружено, что основные изменения в почках были представлены апоптозом клеток канальцев и инфильтрацией мононуклеарными лейкоцитами [162]. При этом Takasu с коллегами не обнаружили сколько-нибудь значимой роли апоптоза в сепсис-индуцированной почечной недостаточности [246]. В большом литературном обзоре Junko Kosaka с коллегами был проведен анализ гистологических изменений почек на животных моделях сепсиса (модель перевязки слепого кишечника с микроперфорированием ее стенки, модель введения фекальной суспензии и модель введения живых культур бактерий). Из

1059 животных, изученных в 102 исследованиях, только 53 (5,0%) не имели гистопатологических изменений почек. Острый некроз канальцев был зарегистрирован у 184 (17,4%), и только у животных с низким сердечным выбросом, сниженным почечным кровотоком. Также наблюдались неспецифические изменения: вакуолизация клеток канальцев у 423 (39,9%), потеря щеточной каймы у 250 (23,6%) и набухание клеток канальцев у 243 (22,9%). Следует отметить, что в 21 исследовании (170 животных), в которых анализировалось наличие апоптоза, апоптоз канальцевых клеток был обнаружен у 158 животных (92,9%) [151]. В исследованиях Lerolle с коллегами, Doi с коллегами острая почечная недостаточность характеризовалась инфильтрацией преимущественно мононуклеарными иммунными клетками, вакуолизацией клеток канальцев, потерей щеточной каемки и апоптозом [77, 162], а также разрушением межклеточных границ и базальной мембраны с последующей отслойкой клеток в просвет канальца [91].

Селезенка представляет собой орган иммунной системы, отвечающий за инициацию иммунных реакций. Уникальным образом она объединяет врожденную и адаптивную иммунную систему [184]. Для селезенки, как органа иммуногенеза, реагирующего на воспалительный процесс, характерно увеличение в размерах, напряжение или, напротив, сморщивание капсулы [9]. Недавние исследования на животных моделях сепсиса, а также у пациентов, умерших от сепсиса и полиорганной недостаточности, показали, что сепсис вызывает обширную потерю лимфоцитов посредством апоптоза [31, 32, 121, 122, 123, 124, 187]. Поскольку лимфоциты продуцируют провоспалительные цитокины и активируют макрофаги, потеря лимфоцитов может быть полезной для выживания за счет подавления чрезмерной воспалительной реакции [122, 187]. Но, в тоже время, пациенты отделений интенсивной терапии, у которых наблюдается снижение количества лимфоцитов в течение трёх дней, подвергаются значительно повышенному риску нозокомиального сепсиса [217]. Исследования на животных показали, что предотвращение апоптоза лимфоцитов либо путем гиперэкспрессии антиапоптотического белка Bcl - 2, либо путем введения препаратов,

предотвращающих активацию каспаз, улучшают выживаемость при сепсисе [123]. В исследовании Gunia с коллегами при морфометрическом анализе 60 случаев обнаружено лимфоидное истощение как В -, так и Т - областей, связанное со значительной гиперплазией герминативного центра. В исследование также отмечено, что в септических селезенках истощение лимфоидной ткани В - области оказалось более значительным в случаях сепсиса, вызванного *Enterococcus sp.*, по сравнению с сепсисом, вызванным иными бактериями [9].

Центральным понятием, определяющим повреждение легких при сепсисе, которое впоследствии ведет к острому респираторному дистресс - синдрому (ОРДС), являются деструктивные нарушения в области аэрогематического барьера [251]. Легкие имеют примерно 480×10^6 альвеол [196], которые могут по-разному поражаться при развитии ОРДС, что приводит к существенной гетерогенности, с тяжелым повреждением одних участков легкого и относительным сохранением других участков [88]. Как уже было описано ранее, активация врожденной иммунной системы с помощью PAMP или DAMP приводит к высвобождению многочисленных хемокинов, а также провоспалительных цитокинов (например, ИЛ - 1бета, ФНО, ИЛ - 6, ИЛ - 8) и противовоспалительных цитокинов (например, ИЛ -10) [182]. Провоспалительные цитокины важны для элиминации патогенов, но высокие уровни могут привести к разрушению аэрогематического барьера за счет повреждения эндотелиального слоя (циркулирующие цитокины) или повреждения эпителиального слоя (альвеолярные цитокины) [129]. После разрушения аэрогематического барьера провоспалительные эффекторы альвеолярной жидкости высвобождаются в кровотоки, способствуя дальнейшему воспалению и иммунным реакциям [69]. Активация врожденного иммунного ответа при инфекции регулируется различными клеточными путями, включая аутофагию, которая является высококонсервативным путем, участвующим в удалении поврежденных белков и органелл из клеток [195]. Помимо аутофагии, запрограммированная гибель клеток играет важную роль в воспалении и в индуцированном сепсисом повреждении легких [248].

Во время тяжелого системного воспаления гиперпроницаемость микроциркуляторного русла легких является первичным повреждением, вызванным сепсисом при прогрессировании ОРДС, и, альвеолы заполняются экссудатом плазмы [58]. Наряду с потерями клеток альвеолярного эпителия, вызванными сепсис - индуцированным апоптозом и некрозом, увеличение экссудата в пространствах альвеол приводит к альвеолярному отеку и образованию гиалиновой мембраны [36]. По данным Мишнева О.Д. с коллегами при гистологическом исследовании легких также регистрировался интерстициальный отек легочной ткани, внутрисосудистые скопления тромбоцитов, инфильтрация стенок альвеол лейкоцитами, гиалиновые мембраны. При электронной микроскопии отмечено расширение межклеточного пространства сосудистого эндотелия [9]. В другом исследовании у пациентов, находившихся на искусственной вентиляции легких, Soeiro с коллегами были обнаружены обширный альвеолярный коллапс, выраженные гиалиновые мембраны, облитерирующий фиброз, тонкие гиалиновые мембраны [234].

Schmidt с коллегами, используя прижизненную микроскопию на модели сепсиса, инициированного внутривенным введением липополисахарида, была обнаружена деградация легочного микрососудистого гликокаликса посредством механизмов, зависящих от ФНО. Деградация гликокаликса включала специфическую потерю гепарансульфата и приводила к адгезии нейтрофилов и воспалительной реакции [228].

Сепсис – патофизиологическое состояние, при котором происходит активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой (ГГН) оси с ее ключевым эффекторным органом – надпочечниками. В ответ на адренкортикотропный гормон (АКТГ) кора надпочечников вырабатывает большое количество кортизола, который вызывает активацию катаболических путей, сильное противовоспалительное и иммуномодулирующее действие [144]. У пациентов в критическом состоянии гомеостатическая активация ГГН-оси часто нарушена или даже связана с надпочечниковой недостаточностью [28, 223]. Согласно литературным данным, различные исследования показали доказательства того,

что реакция надпочечников на стресс имеет решающее значение для выживания при сепсисе и септическом шоке. Дефекты функции надпочечников, вызванные фармакологическими (этомидат), генетическими или хирургическими вмешательствами, связаны с более высокими показателями смертности при сепсисе [44, 55, 111]. Исследования *in vivo* показали, что при введении ЛПС развивается системное воспаление, приводящее к воспалительной реакции в надпочечниках, которая сопровождается апоптозом и повреждением органа [95, 143]. В исследовании Flierl с коллегами [93] на модели прокола и перевязки купола слепой кишки было продемонстрировано увеличение гибели клеток надпочечника путём апоптоза, связанное с увеличенным уровнем фактора комплемента C5a. Были зарегистрированы повышенные уровни мРНК iNOS, что предполагает повышенную концентрацию NO. Данный мощный вазодилататор вызывает артериальную гипотензию и нестабильность гемодинамики при сепсисе [73, 92]. В исследования *in vitro* было показано, что NO отрицательно влияет на стероидогенез пучковой зоны [70]. Кроме того, было отмечено множество кровоизлияний в надпочечниках у животных в модели CLP. Усиление геморрагических проявлений ранее связывали с бактериальными инфекциями, а также с септическим шоком, опосредованным эндотоксинами [137]. В исследовании, проведенном Guarner с коллегами, в 31 из 39 случаев в областях кровоизлияний в надпочечниках были обнаружены бактерии или бактериальные антигены. Наиболее часто связанными с кровоизлияниями в надпочечник бактериями, была *Neisseria meningitidis*, за которой следовали: стрептококки группы A, *Streptococcus pneumoniae*, *Rickettsia rickettsii* и *S. aureus*. Из перечисленных бактерий *N. meningitidis*, стрептококки группы A, *S. pneumoniae* и *S. aureus* были способны системно циркулировать в кровеносном русле, вызывая диссеминированное внутрисосудистое свертывание [105]. При введении ЛПС Kanczkowski с коллегами было отмечено влияние эндотоксина на функцию надпочечников через активацию иммунных клеток, которые высвобождают провоспалительные цитокины и простагландины, воздействующие на клетки, продуцирующие стероиды, либо напрямую, опосредованно активацией

Toll-подобного рецептора 4 типа (TLR4), экспрессируемого надпочечниками. Последняя активация TLR4 в коре надпочечников индуцирует повышенную экспрессию цитокинов, включая ИЛ - 6 и ФНО [146]. Высокая экспрессия рецепторов данных цитокинов на клетках коры надпочечников обеспечивают взаимодействие между иммунной системой и надпочечниками во время системного воспаления [43, 100, 142]. В исследовании Tkachenko I.V. с коллегами было показано, что *in vitro* высокие уровни вышеперечисленных цитокинов непосредственно влияют на стероидогенез надпочечников, но также вызывают гибель клеток коры надпочечников. Следует также отметить, что сверхэкспрессия TLR4 в клетках надпочечников человека приводит к нарушению продукции кортизола и альдостерона [145]. ЛПС также активирует синтез провоспалительных простагландинов, непосредственно влияющих на стероидогенез надпочечников [178], а также вызывает эндотелиальную дисфункцию в надпочечниках, о чем свидетельствует активация молекул сосудистой адгезии VCAM-1 и ICAM-1 (известно, что как ICAM-1, так и VCAM-1 контролируют прочную адгезию между лейкоцитами и эндотелием во время воспаления) [61, 143, 165]. По мнению Мишнева О. Д., при гистологическом исследовании надпочечников в корковом веществе на самых ранних стадиях развития септического процесса присутствует увеличение площади коркового вещества с уменьшением содержания липидов, а далее следует атрофия и очаговая делипоидизация; при этом, гистологические изменения в мозговом веществе надпочечников характеризуются полнокровием, сопровождающимся иногда очагами кровоизлияний [9].

1.5 Современные терапевтические подходы, апробированные на внутрибрюшинной модели сепсиса, вызванного *P. aeruginosa*

Широкое применение антибиотиков привело к повсеместному росту приобретённой резистентности *Pa*, что, в частности, послужило поводом для разработки новых лекарственных средств [175]. На перитонеальной модели сепсиса мышей, вызванного *Pa*, был апробирован антимикробный пептид (АМП) ZY4 [192], продемонстрировавший способность к подавлению роста и формированию биоплёнки в сочетании с низкой склонностью к формированию приобретённой резистентности. Однако, были отмечены заметные ограничения, препятствующие терапевтическому использованию упомянутого АМП – в первую очередь, присущая ему клеточная и тканевая токсичность [59, 206]. Также была исследована эффективность комбинации двух α -спиральных пептидов (магаинина II и цекропина А) и рифампицина на внутрибрюшинных моделях сепсиса крыс, с использованием двух штаммов *Pa* с различной чувствительностью к антибиотикам (*P. aeruginosa* ATCC 27853 и клинический изолят *P. aeruginosa*). Их эффективность также сравнивали с эффективностью пиперациллина / тазобактама. Магаинин II и цекропин А показали хорошую антибактериальную активность, сравнимую с пиперациллином/тазобактамом. При комбинировании пептидов с римфамицином также уменьшалось количество высеваемых бактерий [64].

В исследование Warrener с коллегами [261] на модели перитонеального сепсиса, инициированного *Pa*, был показан положительный эффект моноклональных антител (MAb) MAb, 29D2 и V2L2MD, против PcrV, расположенного на кончике инъекционной иглы CC3T [104]. Ингибируя функцию PcrV специфическими антителами, блокируется образование транслоконе и инъекция экзотоксина [103]. Таким образом, моноклональные антитела MAb, 29D2 и V2L2MD, обеспечивали мощную защиту от *Pa* на животных моделях септического процесса [261].

В исследовании Cai коллегами, при оценке посредством биолюминесцентной визуализации *in vivo* было отмечено, что комбинация колистина и рифампицина продемонстрировала более выраженный бактерицидный эффект через 2 часа после введения, по сравнению с каждым антибиотиком по отдельности. Это может стать альтернативой при лечении инфекций карбапенемрезистентной *Pa* (CRPA). Между тем, комбинация меропенема и колистина не показала лучшего бактерицидного действия, чем меропенем в отдельности, а подсчет бактерий *ex vivo* также подтвердил, что комбинация меропенема и колистина не снижала количество выросших колоний из большинства тканей, кроме селезенки и крови [52].

В исследовании Goma с коллегами было изучено влияния метформина (MET), наноземульсий метформина (MET-NE), наноземульсий метформина серебра (Ag-MET-NE) и наночастиц серебра (AgNP) на *Pa*. Фенотипические результаты показали, что MET-NE обладают самой высокой активностью ингибирования вирулентности. Однако, согласно результатам ОТ-ПЦР, все испытанные агенты значительно снижали экспрессию регуляторных генов *Pa*; *lasR*, *lasI*, *pqsA*, *fliC*, *exoS* и *pslA*, причем Ag-MET-NE являлся наиболее эффективным средством, хотя и не способным защитить мышей от инфекции, вызванной *Pa*. MET-НЭ продемонстрировали самую высокую защитную активность против инфекции *Pa in vivo*. Данные результаты подтверждают многообещающее использование нанопрепаратов, особенно Ag-MET-NE, в качестве альтернативы антибиотикам против *Pa* с множественной лекарственной устойчивостью, посредством ингибирования факторов вирулентности и экспрессии генов, отвечающих за «quorum sensing» [99].

1.6 Препараты на основе малых доз альдегида муравьиной кислоты.

Эндогенный альдегид муравьиной кислоты

В годы Великой Отечественной войны для профилактики пневмоний и септических осложнений среди личного состава Санитарное управление Красной Армии рекомендовало применять препарат «Кальдекс». В послевоенное время этот дешёвый отечественный препарат с гексаметилентетрамином в качестве действующего начала ещё длительное время использовался как один из компонентов профилактики и лечения вирусных и бактериальных инфекций, однако позже был забыт в связи с появлением противовоспалительных и иммуномодулирующих средств нового поколения. Лечебное и профилактическое действие гексаметилентетрамина основано на том, что в кислой среде, которая возникает в тканях при воспалении, он распадается с образованием альдегида муравьиной кислоты (формальдегида), вызывающего деструкцию клеток патогенов [3]. Известно, что в живых организмах альдегид муравьиной кислоты (составляющий также основу лекарственного средства под условным внутрилабораторным названием Астрабионорм) образуется эндогенно, т.е. является естественным метаболитом, участвующим во многих биохимических процессах. Концентрация альдегида муравьиной кислоты в клетках может достигать 0,2–0,5 мМ, а содержание его в крови здоровых людей составляет 0,05–0,1 мМ [235]. В организме постоянно поддерживается его физиологический уровень за счет действия окислительных ферментов – Р450 монооксигеназ, митохондриальной АлДГ2, формальдегиддегидрогеназы [8, 80, 81]. Альдегид муравьиной кислоты обнаруживается во всех внутренних жидкостях человека и животных и его определенная концентрация в организме важна для жизнедеятельности клеток, хотя при превышении таковой он может действовать как генотоксин [118]. Также в литературе отмечено, что альдегид муравьиной кислоты, вероятно, возникает из различных клеточных источников, таких

как деметилирование гистонов и разложение фолиевой кислоты [51, 255]. Реакция клеточных культур HeLa (рак шейки матки человека) и HT-29 (карцинома толстой кишки человека) на воздействие альдегида муравьиной кислоты в низких концентрациях (0,06–1,0 мМ) варьировала от повышенной пролиферации (при 0,01 мМ) до апоптоза и гибели клеток (0,0625–0,1 мМ) [147, 245, 253]. При сравнении реакции раковых и здоровых культивируемых клеток на действие муравьиного альдегида в низкой концентрации (0,1 мМ) оказалось, что линия раковых клеток (HT-29) к нему более чувствительна, нежели здоровые клетки (культура эндотелиальных клеток) [253]. Было обнаружено, что в организме человека существуют, по крайней мере, три биосинтетических цикла или источника, в которых муравьиный альдегид образуется в качестве промежуточного продукта [81, 130]. Кроме того, известно, что анаэробная ферментация кишечными бактериями приводит к образованию различных летучих органических соединений (ЛОС), включая все спирты в ряду от метанола до гептанола [79]. Метанол, который является побочным продуктом метаболизма микробиома кишечника, метаболизируется в печени в альдегид муравьиной кислоты, а затем в формиат [81]. Вторым источником альдегида муравьиной кислоты в организме – путь метаболизма креатина, который включает дезаминирование метиламина с помощью семикарбазидчувствительной аминоксидазы (SSAO, EC 1.4.3.21) [266]. Наконец, третьим источником эндогенного формальдегида является одноуглеродный (1C) фолатный цикл витамина B9 [51]. Ключевой особенностью является ADH5-зависимое окисление формальдегида в формиат, обеспечивающее последующий синтез нуклеотидов [35]. В свою очередь, окисление формальдегида в этом цикле приводит к образованию формиата, участвующего в реакциях биосинтеза аминокислот и нуклеотидов [79, 80, 81, 209]. Кроме того, в печени цитохром P450 (CYP) катализирует деметилирование эндогенных метаболитов и ксенобиотиков, высвобождая метильную группу в виде формальдегида или метанола [209]. В нейтрофилах миелопероксидаза (МПО) превращает глицин в формальдегид [113]. Согласно Darwin с коллегами, альдегиды вырабатываются как часть метаболических программ, которые

сопровожают активацию иммунных клеток интерфероном - гамма (ИФН - гамма). Предполагается, что альдегиды входят в арсенал индуцируемых ИФН - гамма эффекторов, необходимых для контроля над патогенами [72].

Как было показано на примере *Mycobacterium tuberculosis*, повышенное количество промежуточных альдегидов, обладающих бактерицидной активностью, накапливается в результате перекисного окисления липидов вследствие усиленного гликолиза и продукции АФК в макрофагах. Очевидно, снижение уровня экспрессии генов детоксикации альдегидов (*aldh2*, *glo1*) из-за воспалительных сигналов или естественной мутации в гене *aldh2* может усиливать антимикробную активность, опосредованную альдегидами [72].

1.7 Заключение

Проблема сепсиса изучалась с античных времен. Несмотря на то, что за последние годы было проведено несколько Согласительных Конференций, до настоящего времени отсутствуют унифицированное понятие и строгие морфологические критерии этого грозного жизнеугрожающего патологического состояния.

Как известно, системный воспалительный ответ организма подразделяется на две последовательные составляющие: провоспалительную и компенсаторную противовоспалительную. Первая, как полагают, является результатом активации механизмов врожденного иммунитета, сопровождающейся увеличением циркулирующих провоспалительных цито - и хемокинов. Развитие сепсиса происходит в том случае, когда иммунный ответ организма не может адекватно заместить провоспалительный ответ в компенсаторный противовоспалительный и, таким образом, разрешить инфекционный процесс. В подобных случаях течение воспаления становится неуправляемым и завершается септическим шоком с исходом в полиорганную недостаточность [16, 222].

Несмотря на разного рода ограничения, моделирование сепсиса на животных, безусловно, вносит значительный вклад в изучение патогенетических звеньев и закономерностей сепсиса. Благодаря моделированию найдены новые биомаркеры сепсиса, оптимизированы схемы терапии, получена дополнительная информация о фармакокинетике, токсичности и механизме действия различных лекарственных средств, потенциально эффективных для лечения сепсиса.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Дизайн исследования

Схема 1 – Дизайн диссертационной работы

I. Характеристика двух штаммов *P. aeruginosa*:

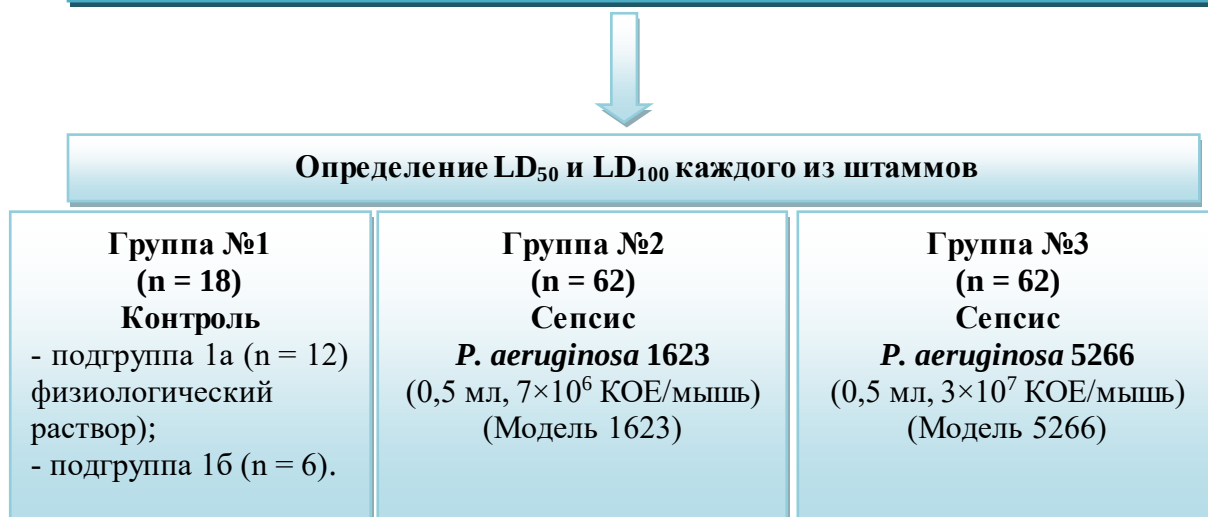
Бактериальные штаммы отобраны из рабочей коллекции лаборатории индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи:

- *P. aeruginosa* 1623;
- *P. aeruginosa* 5266.



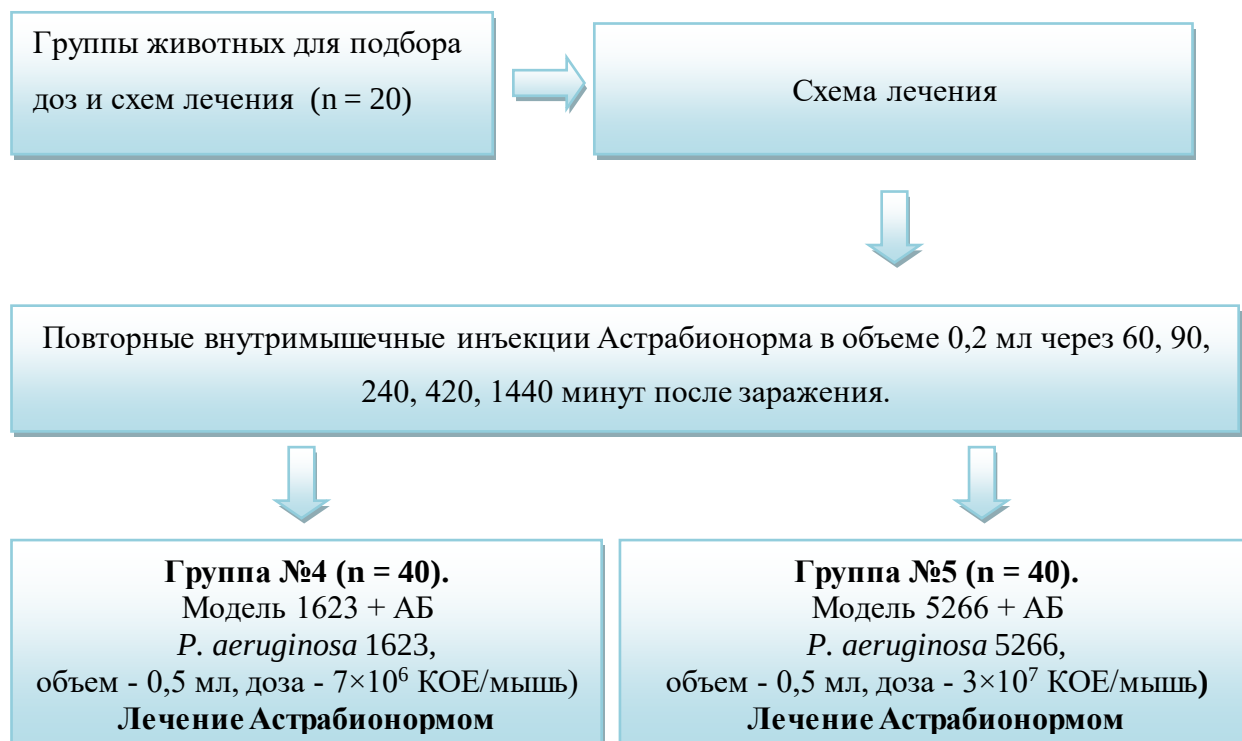
II. Создание двух моделей сепсиса, вызванных, соответственно, *P. aeruginosa* 1623 и *P. aeruginosa* 5266

Объект моделирования: самцы мышей линии C57Bl/6 (n = 242)



Продолжение Схемы 1:

III. Подбор дозы, отработка схемы введения, оценка эффективности (100%-е выживание животных) лекарственного средства под условным внутрилабораторным названием Астрабионорм (Астрабионорм) (АБ):



Методы исследования

- **Бактериологический анализ:** кровь, перитонеальная жидкость, гомогенаты печени, почки, селезенки, легких, надпочечников на 15', 30', 60', 120', 180', 240', 480', 1440'
- **Общегистологический и морфометрический анализ органов:** печень, почки, селезенка, легкие, надпочечники на терминальной стадии сепсиса;
- **Гистохимический анализ на общий белок** (амидочерный - 10В);
- **Окрашивание по методу Маллори;**
- **Метод трансмиссионной электронной микроскопии;**
- **Иммуногистохимический метод** (ИЛ-1бета, ИЛ-10);
- **Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени** (уровни оптической плотности (ОП) мРНК ИЛ-1бета, ИЛ-6, ФНО-альфа на парафиновых срезах надпочечников;
- Анализ ингибирующего действия Астрабионорма на ассоциированную со жгутиком подвижность штаммов *P. aeruginosa*;
- Анализ антимикробного действия Астрабионорма.

2.2 Материалы

2.2.1 Штаммы бактерий

Для разработки экспериментальных моделей сепсиса были использованы культуры следующих штаммов бактерий:

2.2.1.1 Эталонные штаммы:

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853;
- *Pseudomonas aeruginosa* PAO1;
- *Pseudomonas aeruginosa* PA103.

2.2.1.2 Бактериальные штаммы, отобранные из рабочей коллекции лаборатории индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи

- *Pseudomonas aeruginosa* 5266 (Pa 5266);
- *Pseudomonas aeruginosa* 1623 (Pa 1623).

2.2.2 Лабораторные животные

Эксперимент проводили на 242 половозрелых самцах мышей линии C57Bl/6 массой 18 - 20 г., полученных из питомника «Пушино».

Биологическим материалом для исследования служили: кровь, перитонеальная жидкость, легкие, надпочечники, печень, почки, селезенка лабораторных животных.

2.2.3 Лабораторное оборудование

2.2.3.1 Лабораторное оборудование общего назначения

- ламинарные боксы «Labculture» (Сингапур),
- термостат электрический суховоздушный ТС-1/80 СПУ (Россия)
- холодильник лабораторный
- морозильная камера -70°С (Sanyo, Япония);
- центрифуга Thermo scientific SL 16 (ThermoScientific, США);
- центрифуга Eppendorf MiniSpine Eppendorf 20 (ELMI, Латвия);
- центрифуга Centrifuge CM – 50 (ELMI, Латвия);
- аналитические и электронные весы (Sartorius, Англия);
- денситометр Densimat bioMerieux, Франция
- шейкер-инкубатор Ecotron (Infors, Швейцария);
- вортекс Realtop (Heidolph, Германия);
- источник питания «Эльф-4» (ДНК – технология, Россия);
- видеокамера Canon A800 (Canon, Япония);

2.2.3.2 Лабораторное оборудование специального назначения

- амплификатор нуклеиновых кислот «Терцик» (ДНК – Технология, Россия);
- трансиллюминатор Cleaver Scientific, Россия);
- спектрофотометр Wallac 1420 Manager (Turku, Финляндия);
- световой микроскоп «AxioPlus» (Zeiss, Германия);
- ультратом LKB-8800 (LKB AB, Швеция);
- камера для горизонтального электрофореза камера (BIO – RAD, США);
- прибор Nanodrop – 1000 (Celbio, Италия);

- трансмиссионный электронный микроскоп JEM 2100Plus” (JEOL, Япония);
- прибор LightCycler 1.0 (Roche Molecular Biochemicals);
- программное обеспечение LightCycler Software Version 3.5;
- многомодовый микропланшетный ридер Synergy HTX (BioTek Instruments, Inc., США);
- микропланшет Take3 Micro - Volume Plate (BioTek Instruments, Inc., США);
- система ПЦР в реальном времени QuantStudio 5 с TaqMan Universal Master Mix II для контроля (ThermoScientific, США)
- автоматический анализатор WalkWay 40S 67 (DadeBehring, США);
- анализатор микробиологический Phoenix100 (Becton Dickinson, США).

2.2.4 Химические реактивы, красители, диагностические наборы

- маркеры молекулярных длинн - Маркер длин ДНК 100+ bp DNA Ladder («Евроген», Россия);
- маркер длин ДНК 50+ bp DNA Ladder («Евроген», Россия);
- метакрилатная смола LR White (London Resin Company Ltd., Великобритания);
- краситель амидочерный - 10Б (В) (чда), («Ленреактив», Россия);
- набор реактивов для окрашивания по методу Маллори («BioVitrum», Россия);
- изделия медицинские полимерные лабораторные одноразовые для взятия и исследования биоматериала, иммунологические Sarstedt Mikrottestplatte 96 Well, F. (Sarstedt, Германия);
- набор для постановки ПЦР «ПЦР-комплект» (ООО «Синтол», Россия);
- праймеры для постановки ПЦР: ехoU, ехoS, ехoT, ехoY, ехoA («Евроген», Россия);

- набор для выделения РНК из парафиновых срезов RNeasy FFPE Kit (Qiagen, Германия);
- агарозный гель FlashGel System (Lonza, США);
- набор для обратной транскрипции QuantiTect для генов-мишеней (Qiagen, Германия);
- гены-мишени анализировали с помощью ПЦР в реальном времени с использованием набора QuantiFast SYBR Green PCR (Qiagen, Германия);
- праймеры для постановки ПЦР в реальном времени - ИЛ-1бета, ИЛ-6, ФНО-альфа (Sigma-Aldrich, США);
- для лизирования образцов цельной крови использовали набор TRI Reagent® (Sigma-Aldrich, США);
- набор для выделения РНК InviTrap Spin Universal RNA Mini (Strattec Biomedical Systems, Германия);
- набор для обратной транскрипции кДНК высокой емкости (Applied Biosystems, США);

2.2.5 Питательные среды

- цетримидный агар (для рекультивирования *P. aeruginosa* из лиофильно высушенного состояния) – Cetrimide Agar Base («HiMedia-Laboratories», Индия) с 1% глицерина;
- колумбийский агар (для культивирования *P. aeruginosa*) - Columbia Agar Base (Becton Dickinson, США);
- LB - питательный бульон (для культивирования *P. aeruginosa*) – Luria - Bertani Broth («Becton Dickinson», США);
- мясопептонный питательный агар с добавлением 20% желточной взвеси (для определения фосфолипазной активности);

- BBL™ Motility Test Medium (для изучения подвижности культур) («Becton Dickinson», США).

2.2.6 Экспериментальный препарат, используемый для лечения

Патент РФ № 2738719. Средство для лечения коронавирусных, ретровирусных инфекций и гепатита С / В.Н.Ласкавый, М.А.Шурдов [10]. Средство, включающее активное начало альдегид муравьиной кислоты в количестве 0,073-0,075% в изотоническом растворе хлорида натрия.

Экспериментальному препарату было дано название: лекарственное средство под условным внутрिलाбораторным названием «Астрабионорм» (Астрабионорм); (АБ).

2.3 Методы исследования

2.3.1 Методы исследования патогенных свойств штаммов *P.aeruginosa*, используемых для моделирование сепсиса

2.3.1.1 Выделение культур

Культуры штаммов *P. aeruginosa* рекультивировали из лиофильно высушенного состояния на Cetrimide Agar Base с 1% глицерина (HiMedia, Индия). Далее выращивали на LB – бульоне (LB - broth) и Columbia Agar Base (Becton Dickinson, США).

2.3.1.2 Методика генотипирования штаммов *P. aeruginosa* на наличие генов экзотоксинов А (*exoA*), U (*exoU*), S (*exoS*), Т (*exoT*), Y (*exoY*), используемых для моделирование экспериментального сепсиса

Бактериальные штаммы *P. aeruginosa* (Pa) характеризуются выраженными гено- и фенотипическими различиями, располагают большим патогенным потенциалом: в частности, - способностью к продукции экзотоксинов А (*exoA*), U (*exoU*), S (*exoS*), Т (*exoT*), Y (*exoY*) [7, 87], что в значительной степени определяет неблагоприятный исход септического процесса. Наличие выше упомянутых генов у штамма *P. aeruginosa* 5266 (Pa 5266) и штамма *P. aeruginosa* 1623 (Pa 1623), устанавливалось с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Культуры штаммов Pa 5266 и Pa 1623 культивировались на среде Columbia Base (Becton Dickinson, США) в течение 24 часов при температуре 37°C. Выделение ДНК чистых культур проводилось по методике Stone G.G. и соавторов [238]: с чашек Петри отбирали единичную колонию и ресуспендировали в 0,5 мл ddH₂O в пробирках по типу «Эппендорф». Далее проводили инкубацию в твердотельном термостате «Термит» (Россия) 10 минут при 99°, охлаждали и откручивали на центрифуге «MiniSpine» Eppendorf при 14000 оборотах в минуту в течение 5 минут. Надосадочную жидкость с ДНК применяли для исследования.

Далее готовили реакционную смесь:

1. 10 мкл 2,5×ПЦР буфера;
2. 1 мкл каждого праймера
2. 0,2 мкл термостабильной полимеразы;
3. 12 мкл деионизированной воды
4. 1 мкл ДНК.

Структура праймеров и режим амплификации для *exoU*, *exoS*, *exoT*, *exoY* были заимствованы у Т. Ајауі с коллегами [22], а для *exoA* у Khan A.A. с коллегами [148].

Специфичность праймеров контролировали с помощью программы BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Присутствие генов, кодирующих эффекторы ССЗТ *P. aeruginosa* и Экзотоксина А определяли с праймерами для генов *exoA*, *exoU*, *exoS*, *exoT*, *exoY* (Таблица 1):

Таблица 1 - Последовательность праймеров и протоколы реакции для *exoA*, *exoU*, *exoS*, *exoT*, *exoY*

Название олигонуклеотида	Ген	Последовательность праймеров
<i>exoA</i> - F	<i>exoA</i>	GACAACGCCCTCAGCATCACCAGC
<i>exoA</i> - R		CGCTGGCCCATTCGCTCCAGCGCT
<i>exoS</i> - F	<i>exoS</i>	GCGAGGTCAGCAGAGTATCG
<i>exoS</i> - R		TTCGGCGTC ACT GTG GAT GC
<i>exoT</i> - F	<i>exoT</i>	AAT CGC CGT CCA ACT GCA TGC G
<i>exoT</i> - R		TGT TCG CCG AGG TAC TGC TC
<i>exoU</i> - F	<i>exoU</i>	CCG TTG TGG TGC CGT TGA AG
<i>exoU</i> - R		CCA GAT GTT CAC CGA CTC GC
<i>exoY</i> - F	<i>exoY</i>	CGG ATT CTA TGG CAG GGA GG
<i>exoY</i> - R		GCC CTT GAT GCA CTC GAC CA

Протокол для *exoA* реакции включал:

Температура	Время	Количество циклов
95°	2 мин	1
94°	30 сек	30
60°	30 сек	30
72°	30 сек	30
72°	5 мин	1

Продолжение Таблицы 1

Протокол для *exoU*, *exoS*, *exoT*, *exoY* реакции включал:

Температура	Время	Количество циклов
94°	2 мин	1
94°	30 сек	36
58°	30 сек	36
68°	1 мин	36
68°	420 сек	1

Для обнаружения ПЦР-продуктов использовался электрофорез в горизонтальном 1,5% агарозном геле при постоянном токе (120В, 400 мА) (источник питания «Эльф-4», ДНК - технология, Россия) при комнатной температуре в течение 25 минут. Для электрофореза применяли Трис-ацетатный буфер (ТАЕ) (2М Трис-(гидроксиметил) аминметан, 50мМ ЭДТА, 1М уксусная кислота, деионизованная вода высокой степени очистки, pH 8.4). В агарозный гель добавляли 3 мкл бромистого этидия. Гель заливали в камеру (BIO-RAD, США). Полосы на электрофорезе визуализировали на гель-документирующей системе (Cleaver Scientific, Россия).

Размер исследуемых фрагментов был: *exoA*-396-bp; *exoU*-134-bp; *exoS*-118-bp; *exoT*-153-bp; *exoY*-289-bp., маркеры молекулярных длинн - Маркер длин ДНК 100+ bp DNA Ladder и Маркер длин ДНК 50+ bp DNA Ladder («Евроген», Россия).

2.3.1.3 Методика исследования штаммов *P. aeruginosa* на фосфолипазную активность

Фосфолипазную активность определяли на мясопептонном агаре («Медгамал», Россия) с добавлением 20% желточной смеси через 24 часа инкубации культуры при 37°.

На 1л воды добавляли: мясного экстракта - 1,5г; дрожжевого экстракта - 1,5г; пептона - 5г; NaCl – 5г; Агара – 15г. После автоклавирования (121°, 20 минут) добавляли 20% желточной взвеси в физиологическом растворе. Для интерпретации результатов применяли коэффициент отношения диаметра радужного венчика к диаметру колонии (мм).

2.3.1.4 Методика исследования штаммов *P. aeruginosa* на гемолитическую активность

Для анализа клеточно – ассоциированного гемолиза бараньи эритроциты трижды промывали в фосфатно – солевом буфере (ФСБ) pH 7,4 (150 mM NaCl), затем из ресуспендировали в ФСБ до конечной концентрации 2% эритроцитов при 4°C. Суточные бульонные культуры бактерий выращивали на LB – бульоне, центрифугировали при 7000 об./мин и ресуспендировали в ФСБ доведя до мутности 2,0 McFarland. В пробирках по типу «Эппендорф» смешивали 1 мл смеси эритроцитов и бактериальную культуру, центрифугировали при 1000 об./мин 10 минут, инкубировали при 37°C и при 90 об./минуту в течение 1 часа. Затем после экспозиции производили оценку гемолитической активности культур. Выход гемоглобина оценивали путем добавления в 96 – луночный полистероловый планшет (Sarstedt Mikrotestplatte 96 Well, F. Изделия

медицинские полимерные лабораторные одноразовые для взятия и исследования биоматериала иммунологические) по 200 мкл супернатантов в каждую лунку. по оптической плотности при 490 нм на спектрофотометре (Wallac 1420 Manager). Процент лизиса рассчитывали по формуле: [71].

$$\% \text{ лизиса} = (X - B)/(T - B) \times 100\%$$

В – инкубация эритроцитов с 1 мл среды ФБС (отрицательный контроль); Т – раствор, где лизис эритроцитов произошел под действием 0,1% SDS (додецилсульфат натрия) (положительный контроль); X – анализируемый образец.

2.3.1.5 Методика оценки ассоциированной со жгутиком подвижности штаммов *P. aeruginosa*

Оценка подвижности выполнялась на среде Motility Test Medium (BBL™ Becton Dickinson, США). Материал суточных агаровых культур штаммов Ра доводили до множественности, соответствующей $\times 10^5$ КОЕ/мл, и высевали по 1 мкл в центр чашечной среды уколом наконечника. Чашки инкубировали при 37°C в течение 24 часов и оценивали диаметр (мм) зоны подвижного роста.

2.3.1.6 Методика оценки действия Астрабионорма на ассоциированную со жгутиком подвижности штаммов *P. aeruginosa*

Для изучения подвижности, ассоциированной со жгутиком суточные бульонные культуры штаммов Ра 1623 и Ра 5266 разводили в 100 раз и

культивировали 60 и 120 минут с добавлением 0,5 мл в LB - бульон лекарственного средства под условным внутрилабораторным названием Астрабионорм (АБ) (0,073-0,075%) и без него. Определение подвижности проводили на среде BBL™ Motility Test Medium: Говяжий экстракт – 3,0 г, Панкреатический гидролизат казеина – 10,0 г, хлорид натрия – 5 г, агар – 4 г. после культивирования бактериальных культур в LB - бульоне с препаратом, Ра 1623 и Ра 5266 довели до количества $\times 10^5$ КОЕ/мл и в объеме 1 мкл вносили в среду BBL™ Motility Test Medium уколом наконечника, чашки инкубировали при 37°C в течение 24 часов и оценивали зоны миграции бактерий.

Для изучения подвижности, ассоциированной со жгутиком, на среде BBL™ Motility Test Medium с АБ без инкубации в LB - бульоне, суточные бульонные культуры штаммов Ра 1623 и Ра 5266 довели до количества $\times 10^5$ КОЕ/мл и высевали на среду уколом наконечника в объеме 1 мкл. Чашки инкубировали при 37° С в течение 24 часов и оценивали зоны миграции бактерий.

2.3.1.7 Метод определения антимикробного действия Астрабионорма

Для определения антимикробного действия лекарственного средства под условным внутрилабораторным названием Астрабионорм (АБ), штаммы Ра 1623 и Ра 5266 выращивали при 35°C, 24 часа. Далее культуры довели до плотности 0,5 по стандарту мутности МакФарланда, до количества $\times 10^5$ КОЕ/мл, на приборе для определения оптической плотности бактериальных суспензий Densimat bioMerieux на LB – бульоне. Тестирование проводили на 96 - луночных планшетах, готовя серии десятикратных серийных разведений АБ в бульоне. Учет результатов проводили через 24 часа на приборе Wallac 1420 Manager путем измерения оптической плотности проб при длине волны 490 нм.

2.3.1.8 Подготовка культур *P. aeruginosa* для заражения экспериментальных животных

После роста на Cetrimide Agar Base с 1% глицерина (HiMedia, Индия), штаммы Pa 5266 и Pa 1623 пересевали и культивировали 24 часа на Columbia Agar Base (Becton Dickinson, США). Для заражения ночные культуры пересевали на LB - бульон (LB - broth), культивировали на шейкер - инкубаторе Ecotron (Infors, Швейцария) в течение суток, отмывали и суспендировали в стерильном физиологическом растворе, доводили до плотности по стандарту мутности 2 МакФарланда на приборе для определения оптической плотности бактериальных суспензий Densimat bioMerieux, Франция.

2.3.1.9 Подбор инфицирующих доз *P. aeruginosa* для создания моделей

Исследование вирулентных свойств штаммов Pa (показатели LD₅₀ и LD₁₀₀), создание экспериментальных моделей сепсиса и изучение динамики развития септического процесса проводили постановкой биопроб на 12 половозрелых самцах лабораторных мышей линии C57BL/6, весом 18-20 г, в двух повторах.

Расчет указанных доз Pa произведен на основе расчетов летальных доз для каждого из штаммов. Величину LD₅₀ рассчитывали по методу Рида и Менча. За LD₁₀₀ принимали минимальное количество бактерий, вызывающих гибель 100% мышей в эксперименте [14].

2.3.1.10 Моделирование сепсиса с использованием разных штаммов

P. aeruginosa

Для постановки эксперимента использованы самцы мышей линии C57Bl/6, весом 18-20 г в общем количестве 242. Животные были разделены на 5 экспериментальных групп.

Группа №1 – контрольная, состоящая из 2 подгрупп:

- подгруппа 1a (n = 12) – контрольная, состоящая из животных, получивших внутрибрюшинно стерильный физиологический раствор;

- подгруппа 1б (n = 6) – интактных здоровых животных.

Группа №2 (n = 62) – животные, получившие внутрибрюшинно суточную бульонную культуру штамма Ра 1623 в дозе 7×10^6 КОЕ/мышь, в объеме 0,5 мл;

Группа №3 (n = 62) – животные, получившие внутрибрюшинно суточную бульонную культуру штамма Ра 5266 в дозе 3×10^7 КОЕ/мышь, в объеме 0,5 мл;

Группа №4 (n = 40) – животные, получившие внутрибрюшинно суточную бульонную культуру штамма Ра 1623 в дозе 7×10^6 КОЕ/мышь, в объеме 0,5 мл и повторные внутримышечные инъекции Астрабионорма в объеме 0,2 мл через 60, 90, 240, 420, 1440 минут после заражения;

Группа №5 (n = 40) – животные, получившие внутрибрюшинно суточную бульонную культуру штамма Ра 5266 в дозе 3×10^7 КОЕ/мышь, в объеме 0,5 мл и повторные внутримышечные инъекции Астрабионорма в объеме 0,2 мл через 60, 90, 240, 420, 1440 минут после заражения.

От мышей группы №1 биоматериал (кровь, перитонеальная жидкость и гомогенаты органов) был отобран в первый день эксперимента. В группах №№ 2, 3 – биоматериал (кровь, перитонеальная жидкость и гомогенаты органов) был получен от 6 животных (на каждую временную точку) в нескольких временных точках (15, 30, 60, 120, 180, 240, 480, 1440 минут, считая от момента заражения). Для гистологического анализа биоматериал (n=12) получен на терминальной стадии сепсиса (через 24 часа после инфицирования). Для морфометрии

надпочечников и определения уровней мРНК интерлейкинов в их тканях биоматериал был отобран в динамике сепсиса (через 1-1,5 ч; 3,5-4 ч после заражения) от 4 животных на каждую временную точку в каждой модели. В группах №№ 4, 5 материал для бактериологического исследования крови, перитонеальной жидкости, гомогенатов органов был получен от 6 животных на 90, 240, 480, 1440 мин и на 7 сутки от момента заражения. Учитывая 100% выживаемость и хорошее состояние животных 4 и 5 групп, биоматериал для гистологического анализа был взят только от двух мышей через 24 часа после инфицирования и начала лечения Астрабионормом (что соответствовало времени наступления терминальной стадии у большинства нелеченых животных). Для уточнения гистологических деталей в реакции надпочечников у 2-х мышей этих подгрупп был взят биоматериал через 7 дней после инфицирования. Оставшиеся мыши (n=6) этих групп наблюдались в условиях вивария в течение 6 месяцев.

Мониторинг состояния экспериментальных животных проводили дважды в день: оценивалась двигательную активность, интерес к воде и еде, состояние шерстяного покрова и поведения. Терминальную стадию сепсиса определяли по снижению активности животного, вялости, влажности и взъерошенности шерсти, отсутствию реакции на внешние раздражители, учащенному дыханию, отсутствию интереса к еде и воде. Для подбора схем введения Астрабионорма было использовано 20 животных.

Из опыта экспериментальных животных выводили передозировкой внутримышечной инъекции смеси анестетиков «Золетил 100» + «Рометар» в дозах 15 мг/кг и 30 мг/кг, в объеме 0,2 мл.

Биоматериалом служил аутопсийный материал печени, почек, селезенки, легких, надпочечников, перитонеальная жидкость, кровь.

2.3.1.11 Методика определения *P. aeruginosa* в перитонеальном смыве, в крови и гомогенатах органов

Для определения динамики бактериальной нагрузки образцы органов гомогенизировали в стерильных фарфоровых ступках, проводили серию 10-кратных разведений и высевали в чашки с питательной средой Columbia Agar Base (Becton Dickinson). Чашки с посевами культивировали 24 ч при 37°C, после чего подсчитывали выросшие колонии Ра и определяли среднюю концентрацию возбудителя в пробах органов зараженных животных для каждой временной точки (КОЕ/г). Одновременно производили посев периферической крови и перитонеальной жидкости в динамике развития сепсиса (КОЕ/мл).

2.3.2 Выбор терапевтической схемы введения Астрабионорма для лечения экспериментального сепсиса

По рекомендации создателей Астрабионорма и авторов патента (Патент РФ № 2738719. Средство для лечения коронавирусных, ретровирусных инфекций и гепатита С / В.Н.Ласкавый, М.А.Шурдов) был произведен: расчет рабочих доз и определена схема введения Астрабионорма, имеющего в качестве активного начала альдегид муравьиной кислоты в количестве 0,073-0,075% в изотоническом растворе хлорида натрия. Септические животные получали повторные внутримышечные введения через 60 минут после заражения, 90 минут, 240 минут, 420 минут, 1440 минут. Эксперимент был проведен в двух повторах.

2.3.3 Общегистологический и морфометрический анализ органов

Подготовку образцов органов проводили по общепринятому стандартному протоколу, серийные срезы толщиной 4 – 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, анализировали и фотографировали в световом микроскопе «AxioPlus» (фирма Zeiss, Германия). Для количественного определения абсолютных площадей разных зон надпочечников и белой пульпы селезенки использовали срединные серийные срезы органов, компьютерную программу «PhotoM 1.21» и общие увеличения светового микроскопа равные, соответственно, $\times 200$ и $\times 100$.

Для количественного определения абсолютных площадей разных зон надпочечников и белой пульпы селезенки использовали срединные серийные срезы органов, окрашенных гематоксилином и эозином, компьютерную программу «PhotoM 1.21» и общие увеличения светового микроскопа равные, соответственно, $\times 200$ и $\times 100$; для определения топографии фильтрующих и юкстамедуллярных нефронов почек – срезы во фронтальной плоскости.

Изображение поля зрения светового микроскопа предварительно калибровали с помощью микрометра, фотографировали на одинаковом увеличении соответственно, $\times 200$ (для надпочечников) и $\times 100$ (для селезенки). Затем переносили в программу для морфометрии «PhotoM 1.21». Данная программа дает возможность обработки фотографий формата BMP, JPEG в цветном и черно – белом варианте, с определением расстояния, диаметра и площади. С помощью программы на каждом срезе надпочечников производили измерения каждой зоны (столбчатая часть пучковой зоны, «неструктурированная часть» пучковой зоны); коркового и мозгового вещества, а также на микрофотографиях селезенки измеряли площадь белой пульпы. Расчет площадей вышеуказанных структур производили в пикселях, переводя затем в усл.ед. Дальнейшие все расчёты анализировались в программе Microsoft Office Excel.

2.3.3.1 Метод гистохимического окрашивания амидочерным - 10В на общий белок

Для выявления общего белка парафиновые срезы печени, селезенки и легких подопытных животных депарафинизировали в ксилоле и спиртах нисходящей концентрации, промывали в 2х сменах бидистиллированной воды и 20 минут окрашивали срезы 0,02% раствором Амидочерного - 10В в смеси ледяной уксусной кислоты и метилового спирта [2]. Окрашенные срезы отмывали в 1% растворе ледяной уксусной кислоты, обезвоживали в серии спиртов восходящей концентрации, проводили через ксилол и заключали в канадский бальзам.

2.3.3.2 Окрашивание гистологических срезов по методу Маллори

Для окрашивания применяли коммерческий набор реактивов фирмы «BioVitrum» для выявления коллагена, ретикулярных волокон, хряща, кости, амилоида согласно инструкции производителя: срезы печени и почек подопытных животных депарафинизировали и промывали в дистиллированной воде. Окрашивание проводили в растворе карболового фуксина - 10 минут. После промывки в дистиллированной воде, срезы опускали в кислотный буфер на 2 минуты, затем промывали в водопроводной воде (2-3 сек) и помещали в раствор фосфорномолибденовой кислоты на 5 минут. Подсушенные срезы, не промывая, помещали на 1 минуту в полихромный раствор по Маллори. Промывали в дистиллированной воде и дегидратировали в спиртах возрастающей концентрации с одномоментной задержкой в последнем – абсолютном этаноле, затем просветляли и заключали препарат в канадский бальзам.

2.3.3.3 Методика иммуногистохимического окрашивания

Иммуногистохимический анализ парафиновых срезов органов проводили в ручном режиме. Для восстановления антигенных свойств, образцы инкубировали в 10мМ растворе цитратного буфера (Citrate buffer 0,01M, pH $\approx$ 6,0) в водяной бане с микропроцессором pT Link (Dako, Дания) (t = 95°C). В качестве первичных использовали кроличьи антитела к: ИЛ - 1бета (Rabbit Polyclonal Antibody; P420B; Invitrogen / Thermo Fisher Scientific, США, 1:200,); ИЛ - 10 (Rabbit Monoclonal Antibody; Invitrogen / Thermo Fisher Scientific, США, D1, 1:200); ИЛ - 4 (Rabbit Polyclonal Antibody; Invitrogen / Thermo Fisher Scientific, США, PA5-25165, 1:200). Вторичные антитела – универсальная двухкомпонентная система детекции HiDef Detection™ HRP Polymer system, («Cell Marque», США), анти-IGG мыши/кролика, пероксидаза хрена (HRP) и субстрат DAB, Россия. Для каждого маркера выполнялись контрольные исследования для исключения псевдопозитивных и псевдонегативных результатов. Титр антител подбирали с использованием раствора для разведения антител (DAKO Antibody Diluents, DAKO, Дания).

2.3.3.4 Метод трансмиссионной электронной микроскопии

Для проведения трансмиссионной электронной микроскопии надпочечники, печень и легкие экспериментальных животных фиксировали по методу Ито – Карновски [134]. Фиксирующий раствор состоял из 2,5% глutarового альдегида, 2% формальдегида и 0,02% пикриновой кислоты. Постфиксацию препарата проводили 1% тетрооксидом осмия (OsO₄) на 0.2 М какодилатном буфере и 1% уранилацетата на 0.2 М малеатном буфере. Дегидратацию фиксированного материала проводили с постепенным повышением концентрации этанола 50%,

70%, 96%, 100% этанолом. После 100% этанола материал переносили в ацетон и пропитывали смесью метакрилатной смолы LR White (London Resin Company Ltd., Великобритания) с 100% этанолом, затем чистой смолой LR White и помещался в желатиновые капсулы со смолой, которые инкубировались 1 сутки при 56°C для полимеризации. Для трансмиссионной электронной микроскопии готовили полутонкие срезы на ультратоме LKB - 8800 (LKB AB, Швеция) и окрашивали 1% раствором метиленового синего для определения участков прицельной заточки. Ультратонкие срезы толщиной 70-75 нм контрастировали по методу Reynolds E.S [220], 1% уранилацетатом на 70% этаноле и цитратом свинца. Препараты просматривались на электронном микроскопе JEM-100B (JEOL Ltd., Япония) при ускоряющем напряжении 80кВ.

2.3.4 Молекулярно-биологические исследования

2.3.4.1 Определение уровней мРНК интерлейкинов в надпочечниках

Для определения уровней мРНК интерлейкинов в парафиновых срезах надпочечников проводили выделение тотальной клеточной РНК с использованием «TriPure Isolation Reagent» в соответствии с инструкциями производителя («Roche Diagnostics GmbH», Германия). Концентрацию, чистоту и целостность РНК оценивали путем измерения OD при 260 нм и соотношений 260/280 и 260/230 с помощью «Nanodrop-1000» («Celbio», Италия). Качество РНК проверяли с помощью электрофореза на агарозном геле («FlashGel System», США). Обратную транскрипцию для генов-мишеней выполняли с использованием набора для обратной транскрипции «QuantiTect» («Qiagen», Германия) в соответствии с инструкциями производителя. Гены-мишени анализировали с помощью ПЦР в реальном времени с использованием набора «Quantifast SYBR Green PCR» («Qiagen», Германия).

Проведение количественной ПЦР происходило в стеклянных капиллярах с применением LightCycler 1.0 (Roche Molecular Biochemicals). В качестве программного обеспечения использовался LightCycler Software Version 3.5. Процедура реакции для амплификации генов-мишеней включала в себя 5 циклов при 95°C, 40 циклов по 15 секунд при 95°C и 30 секунд при 60°C. На последнем этапе температура была повышена с 60°C до 95°C со скоростью 0,1°C / шаг для построения кривой плавления. Для дальнейшего анализа кривых диссоциации мы визуализировали длину ампликонов в агарозном геле, чтобы подтвердить правильность амплификации полученных продуктов ПЦР. Для анализа данных значения C_t в каждом образце и эффективности набора праймеров были рассчитаны с использованием программного обеспечения LinReg, а затем преобразованы в относительные количества (RQ) и нормализованы в соответствии с моделью Pfaffl. Нормализация проводилась с применением гена домашнего хозяйства *β -actin*. Этот ген был выбран программой geNorm версии 3.5. Для выявления РНК ИЛ-1 β применялись в качестве прямого праймера 5'-TGTGGCAGCTACCTATGTCT-3', в качестве обратного праймера 5'-GGGAACATCACACACTAGCA-3', для ИЛ-6 в качестве прямого праймера 5'-AATTCGGTACATCCTCGACGG-3', в качестве обратного праймера 5'-GGGCATGGATTTTCAGACCC-3', для ФНО-альфа в качестве прямого праймера использовался 5'-CATCTTCTCAAACTCGAGTGACAA-3', в качестве обратного 5'-TGGGAGTAGATAAGGTACAGCCC-3'.

2.3.5 Статистическая обработка результатов исследования

Для статистической обработки полученных результатов и определения средних значений использовали программу MS Excel 2010. Для оценки статистической значимости между группами, проводили сравнения по t - критерию Стьюдента. Данные представлены в виде среднеарифметического

значения $\pm$ стандартная ошибка. Степень достоверности различий показана соответствующими обозначениями $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Разработка экспериментальной модели сепсиса

3.1.1 Характеристика штаммов, используемых для экспериментального моделирования сепсиса

Для моделирования экспериментального сепсиса, два штамма *P. aeruginosa* были отобраны из рабочей коллекции лаборатории индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи. Штаммы были охарактеризованы по наличию генов экзотоксинов А (*exoA*), U (*exoU*), S (*exoS*), T (*exoT*), Y (*exoY*), проведен анализ на фосфолипазную и гемолитическую активность, а также на ассоциированную со жгутиками подвижность.

3.1.2 Результаты генотипирования штаммов *P. aeruginosa* на наличие генов экзотоксинов А (*exoA*), U (*exoU*), S (*exoS*), T (*exoT*), Y (*exoY*), используемых для моделирование экспериментального сепсиса

У всех проанализированных клинических Ра было выявлено наличие гена экзотоксина А (*exoA*).

У штамма Ра 5266 было определено присутствие генов экзотоксинов U (*exoU*), T (*exoT*), Y (*exoY*), отсутствие гена экзотоксина S (*exoS*).

У штамма Ра 1623 из четырех генов, характерных для Ра (*exoU*, *exoS*, *exoT*, *exoY*), присутствовали гены *exoS*, *exoT*, *exoY*, отсутствовал ген *exoU*.

В исследование были также использованы эталонные штаммы Ра с заранее известными генотипами (Рисунок 1.1), (Рисунок 1.2), (Рисунок 1.3), (Рисунок 1.4), (Рисунок 1.5), (Таблица 2).

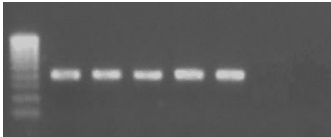
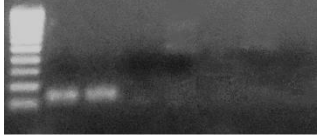
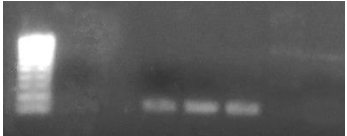
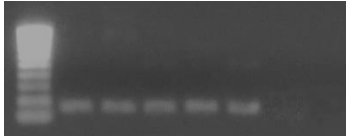
М 1 2 3 4 5 6  Рисунок 1.1 - Электрофореграмма продуктов амплификации гена <i>exoA</i>: М – маркер длины фрагментов ДНК; <i>ExoA</i> <i>bp</i> =396 1 – Ра 5266; 2 – РА103; 3 – Ра 1623; 4 – Ра АТСС27853; 5 – РАО1; 6 – отрицательный контроль.	М 1 2 3 4 5 6  Рисунок 1.2 - Электрофореграмма продуктов амплификации гена <i>exoU</i>: М – маркер длины фрагментов ДНК; <i>ExoU</i> <i>bp</i> =134 1 – Ра 5266; 2 – РА103; 3 – Ра 1623; 4 – Ра АТСС27853; 5 – РАО1; 6 – отрицательный контроль.
М 1 2 3 4 5 6  Рисунок 1.3 - Электрофореграмма продуктов амплификации гена <i>exoS</i>: М – маркер длины фрагментов ДНК; <i>ExoS</i> <i>bp</i> =118 1 – Ра 5266; 2 – РА103; 3 – Ра 1623; 4 – Ра АТСС27853; 5 – РАО1; 6 – отрицательный контроль.	М 1 2 3 4 5 6  Рисунок 1.4 - Электрофореграмма продуктов амплификации гена <i>exoT</i>: М – маркер длины фрагментов ДНК; <i>ExoT</i> <i>bp</i> =153 1 – Ра 5266; 2 – РА103; 3 – Ра 1623; 4 – Ра АТСС27853; 5 – РАО1; 6 – отрицательный контроль.
М 1 2 3 4 5 6  Рисунок 1.5 - Электрофореграмма продуктов амплификации гена <i>exoY</i>: М – маркер длины фрагментов ДНК; <i>ExoY</i> <i>bp</i> =289 1 – Ра 5266; 2 – РА103; 3 – Ра 1623; 4 – Ра АТСС27853; 5 – РАО1; 6 – отрицательный контроль.	

Таблица 2 - Результаты генотипирования штаммов *P. aeruginosa* на наличие генов экзотоксинов А (*exoA*), U (*exoU*), S (*exoS*), Т (*exoT*), Y (*exoY*)

<i>P. aeruginosa</i>	Экзотоксины ССЗТ	<i>exoA</i>
ATCC 27853	<i>exoS, exoT, exoY</i>	+
PAO1	<i>exoS, exoT, exoY</i>	+
PA103	<i>exoU, exoT, exoY</i>	+
Pa 5266	<i>exoU, exoT, exoY</i>	+
Pa 1623	<i>exoS, exoT, exoY</i>	+

3.1.3 Результаты анализа штаммов на фосфолипазную и гемолитическую активность

При определении содержания таких факторов патогенности как гемолитическая активность и продукция фосфолипазы С на мясопептонном агаре с добавлением 20% желточной смеси было обнаружено, что фосфолипазную активность в большей степени проявлял штамм Pa 1623 (Рисунок 2.1), (Таблица 3).

В то же время, показатель клеточно – ассоциированного гемолиза превалировал у штамма Pa 5266 (Рисунок 2.2), (Таблица 4).

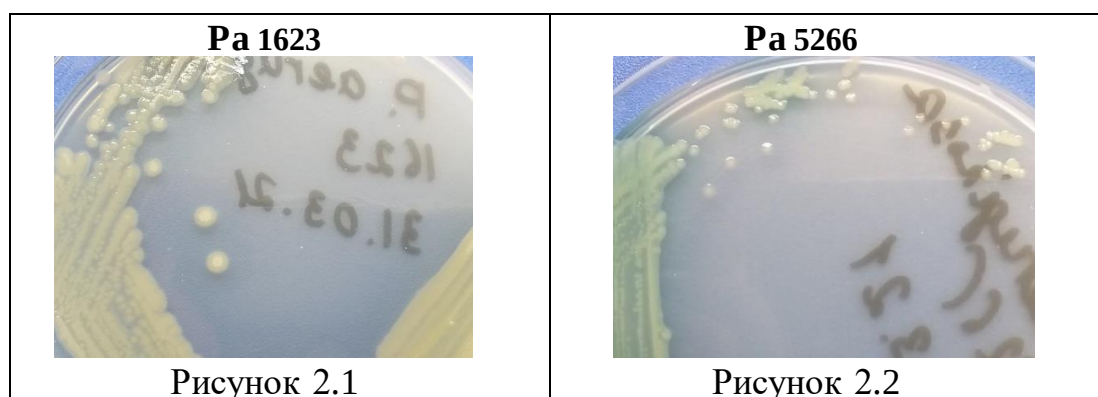


Рисунок 2.1 - Показатели фосфолипазной активности штамма Pa 1623;

Рисунок 2.2 - Показатели фосфолипазной активности штамма Pa 5266

Таблица 3 - Показатели фосфолипазной активности штаммов Pa 1623 и Pa 5266

Pa	Диаметр венчика $M \pm m$	Диаметр колонии $M \pm m$	Коэффициент $M \pm m$
Pa 1623	$0,91 \pm 0,06$	$1,77 \pm 0,15$	$0,53 \pm 0,02^*$
Pa 5266	$0,013 \pm 0,0058$	$1,97 \pm 0,033$	$0,007 \pm 0,0067^*$

Примечание: данные представлены: $M \pm m$ – среднеарифметическое значение $\pm$ стандартная ошибка

* – различия статистически значимы (при $p < 0,05$)

Таблица 4 - Показатели гемолитической активности Pa 1623 и Pa 5266

<i>P. aeruginosa</i>	Результат (ОП – оптическая плотность) ($M \pm m$)	%
Pa 1623	$0,138 \pm 0,0016^*$	65,03
Pa 5266	$0,183 \pm 0,0011^*$	92,64
Контроль (Физиологический раствор)	$0,032 \pm 0,00064$	-
SDS	$0,195 \pm 0,00295$	-

Данные представлены: $M \pm m$ – среднеарифметическое значение $\pm$ стандартная ошибка

* – различия статистически значимы между опытной и контрольной группой (при $p < 0,05$)

3.2 Моделирование сепсиса

3.2.1 Экспериментальная модель сепсиса, вызванная внутрибрюшинным введением *P. aeruginosa* 5266

Заражение мышей осуществляли внутрибрюшинно дозой культуры штамма Pa 5266 (модель 5266) и регистрировали гибель животных в течение 2 суток после заражения. Таким образом, были установлены:

- LD₅₀ составила $1,3 \times 10^7$ КОЕ/мышь;

- LD₁₀₀ - 3×10^7 КОЕ / мышь.

Терминальная стадия при LD₁₀₀ наступала через 20 - 24 часа после заражения, а при LD₅₀ гибель 50% отмечалась на 48 часа (Таблица 5), (Рисунок 3).

Таблица 5 - Показатели гибели и выживаемости экспериментальных животных с экспериментальным сепсисом, вызванным Ра 5266 при LD₅₀ и LD₁₀₀

Время, часы	Погибшие		Выжившие	
	Количество	%	Количество	%
Ра 5266, LD ₅₀ , $1,3 \times 10^7$				
24	3	25	9	75
48	3	25	6	50
3×10^7 КОЕ/мышь, LD ₁₀₀ **				
24	12	100	0	-
Всего	по 12 животных			

** - график не представлен

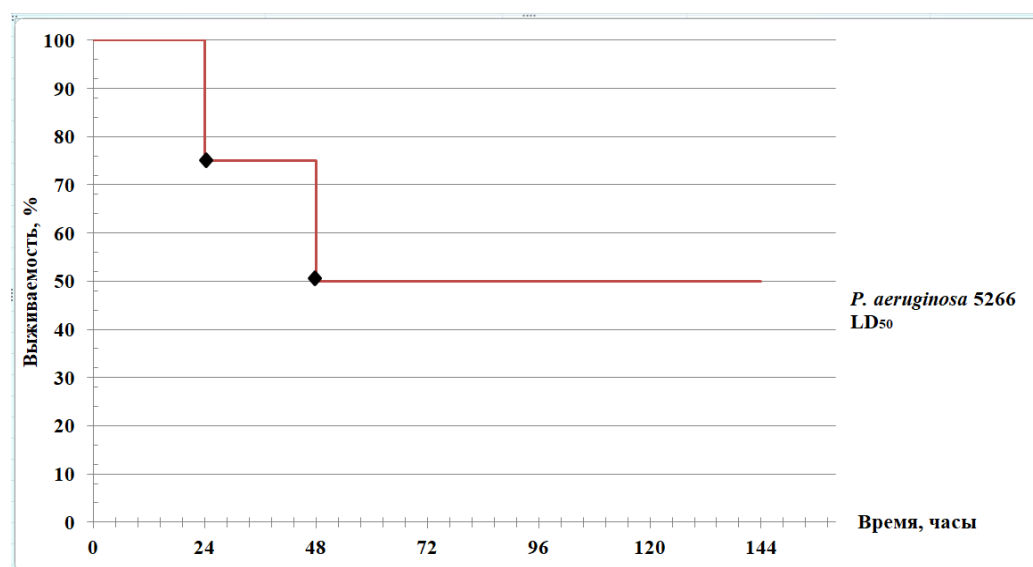


Рисунок 3 - Динамика выживаемости мышей с экспериментальным сепсисом, вызванным штаммом Ра 5266 при LD₅₀

3.2.2 Экспериментальная модель сепсиса, вызванная внутрибрюшинным введением штамма *P. aeruginosa* 1623

Мышей заражали внутрибрюшинно культурой штамма Ра 1623 (модель 1623) и регистрировали гибель животных в течение 3 суток после заражения. Таким образом, были установлены:

- LD₅₀ составила $6,2 \times 10^6$ КОЕ/мышь;

- LD₁₀₀ - 7×10^6 КОЕ/мышь.

Терминальная стадия при LD₁₀₀ наступала через 24 - 26 часов после заражения, а при LD₅₀ гибель 50% зарегистрирована на 72 часах, соответственно. (Таблица 6), (Рисунок 4)

Таблица 6 - Показатели гибели и выживаемости животных с экспериментальным сепсисом, вызванным Ра 1623 при LD₅₀ и LD₁₀₀

Время, дни	Погибшие		Выжившие	
	Количество	%	Количество	%
Ра 1623, LD ₅₀ , $6,2 \times 10^6$				
24	2	16,7	10	83,3
48	3	25	7	58,3
72	1	8,3	6	50
7×10^6 КОЕ/мышь, LD ₁₀₀ ***				
24 - 26 часов	12	100	0	-
Всего	по 12 животных			

*** - график не представлен

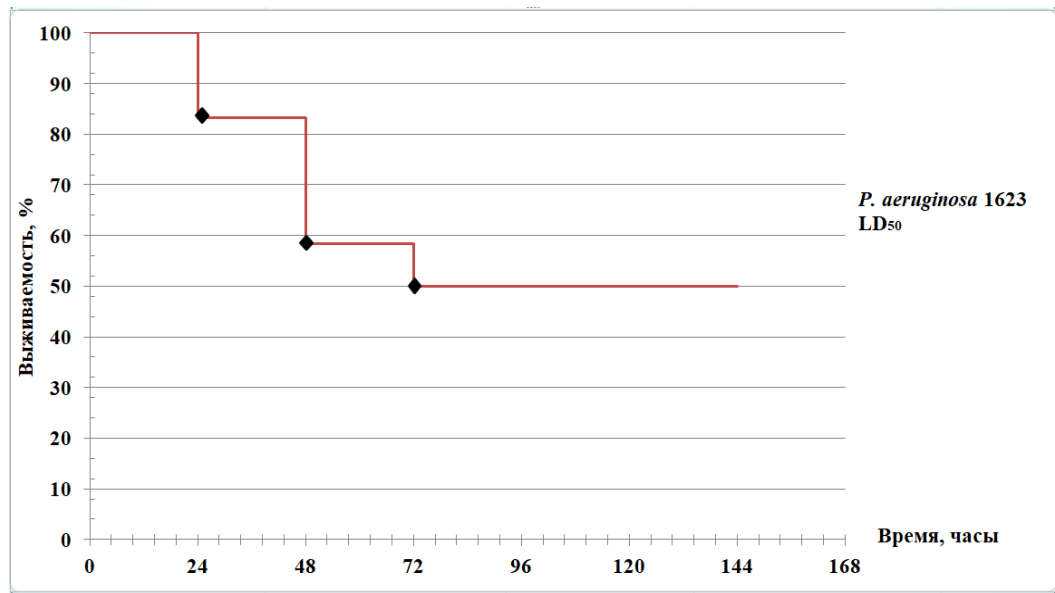


Рисунок 4 - Динамика выживаемости мышей с экспериментальным сепсисом, вызванным Ра 1623 при LD₅₀

Таким образом, были определены дозы LD₅₀ и LD₁₀₀ для Ра 5266 и Ра 1623, секретирующих ExoS и ExoU белки ССТТ.

Мыши, зараженные штаммом LD₁₀₀ Ра 5266 с *exoU*⁺ погибали через 20 - 24 часа, а при заражении Ра 1623 с *exoS*⁺ гибель наступала через 24 - 26 часов.

Для штамма Ра 5266 при LD₅₀ 1,3×10⁷ гибель 50% животных продолжалась до 48 часов, при этом при LD₅₀ Ра 1623 50% мышей погибли к 72 часам.

Для эксперимента были выбраны дозы заражения Ра LD₁₀₀, так как животные погибали в одинаковый период времени.

3.3 Гистологические изменения органов на терминальной стадии экспериментального сепсиса

3.3.1 Гистологическая характеристика легких

У контрольных животных паренхима легких равномерно аэрирована (Рисунок 5.1), просветы внутрилегочных бронхов свободны, четко контурируются легочные ацинусы и альвеолы. Интерстициальные прослойки тонкие, сосуды стромы умеренно кровенаполнены.

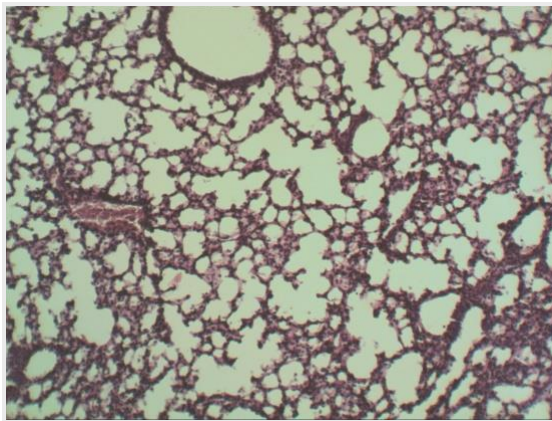


Рисунок 5.1

Рисунок 5.1 – Контрольное животное. Фрагмент легкого. Описание - в тексте. Окрашивание: гематоксилин и эозин. Увеличение: $\times 100$

На терминальной стадии сепсиса изменения структуры легких животных в обеих моделях (5266, 1623) были идентичны: участки паренхимы с признаками интерстициального отека (Рисунок 5.2) и спавшимися альвеолами (слабо аэрированные участки) присутствовали наряду с гипераэрированными участками, характеризовавшимися резко расширенными и разорванными легочными ацинусами (Рисунок 5.3).

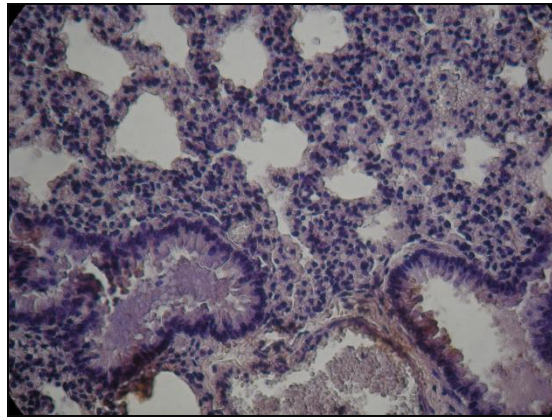


Рисунок 5.2

Рисунок 5.2 – Модель 5266, терминальная стадия сепсиса. Фрагмент легкого животного: интерстициальный отек, спавшиеся легочные ацинусы. Окрашивание: гематоксилин и эозин. Увеличение: $\times 200$

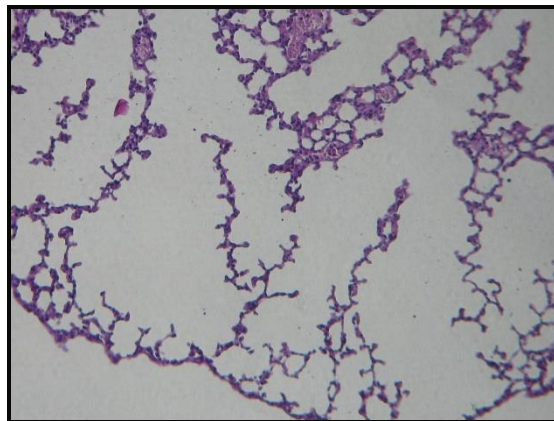


Рисунок 5.3

Рисунок 5.3 – Модель 5266, терминальная стадия сепсиса. Фрагмент легкого животного. Разрывы легочных ацинусов. Окрашивание: гематоксилин и эозин. Увеличение: $\times 100$

Во многих альвеолах регистрировались признаки диапедеза эритроцитов (Рисунок 5.4).

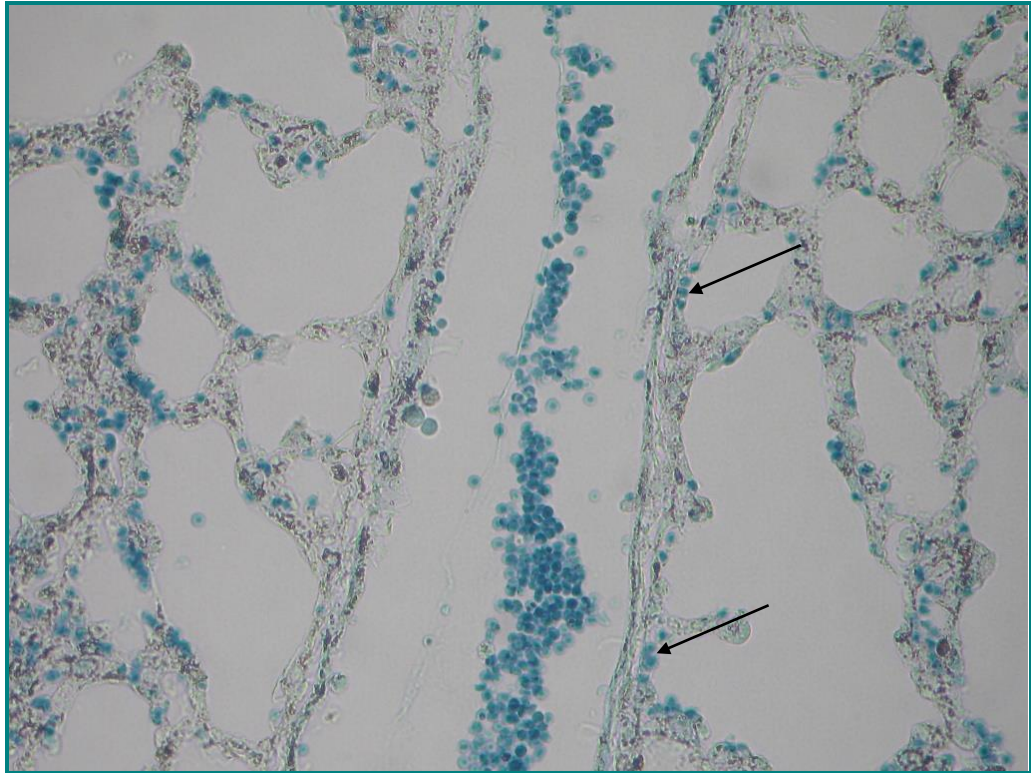


Рисунок 5.4

Рисунок 5.4 – Модель 1623, терминальная стадия сепсиса. Фрагмент легкого животного. Диапедез эритроцитов в легочные ацинусы (стрелки). Гистохимическая окраска амидочерным - 10В на общий белок. Увеличение: $\times 400$

В строме легких регистрировались тромбозы, геморрагии и очаги лейкоцитарной инфильтрации (Рисунок 5.5) В венах стромы отмечалось краевое стояние лимфоцитов (Рисунок 5.6).

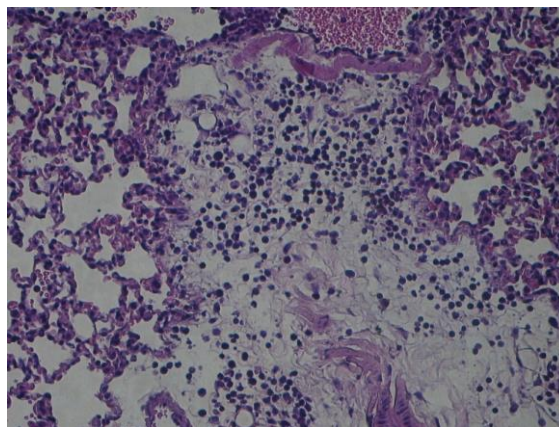


Рисунок 5.5

Рисунок 5.5 – Модель 5266, терминальная стадия сепсиса. Фрагмент легкого животного. Лейкоцитарная инфильтрация участка стромы. Окрашивание: гематоксилин и эозин. Увеличение: $\times 200$.

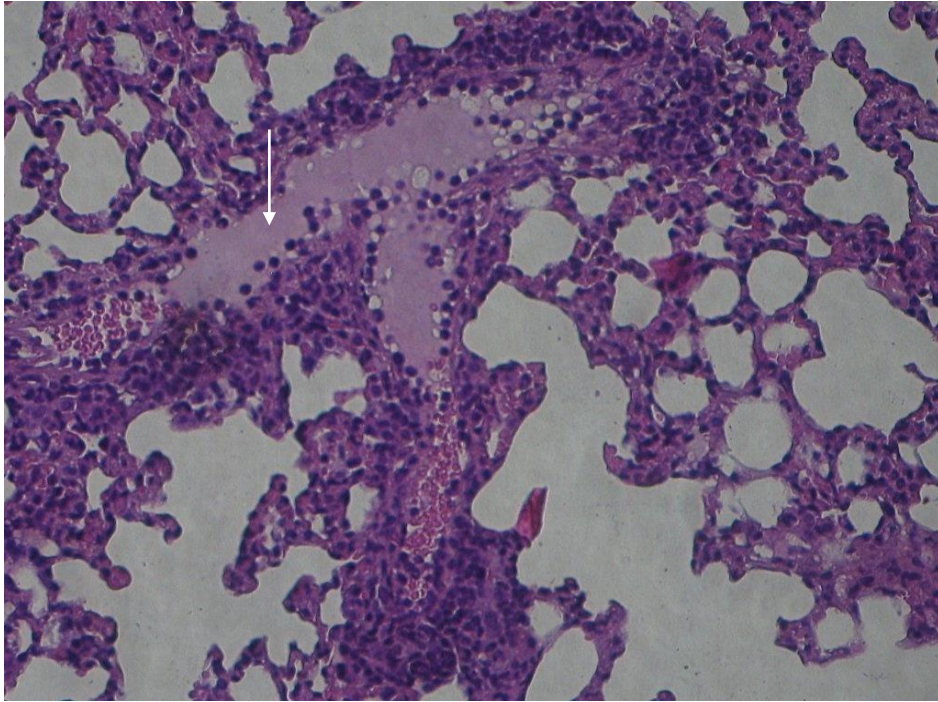


Рисунок 5.6

Рисунок 5.6 - Модель 1623, терминальная стадия сепсиса. Краевое стояние лимфоцитов в венах легкого (стрелка). Окрашивание: гематоксилин и эозин. Увеличение: $\times 200$.

3.3.1.1 Результаты проведенной гистохимической реакции на содержание внутриядерного и общего белка в легких

При гистохимическом окрашивании срезов легких септических животных амидочерным - 10В ярко маркировались альвеолярные макрофаги (Рисунок 5.7, стрелки), что косвенно свидетельствовало об усилении их ферментативного потенциала, такая же картина отмечалась в макрофагах и плазмочитах легочного интерстиция (Рисунок 5.8, обводки).

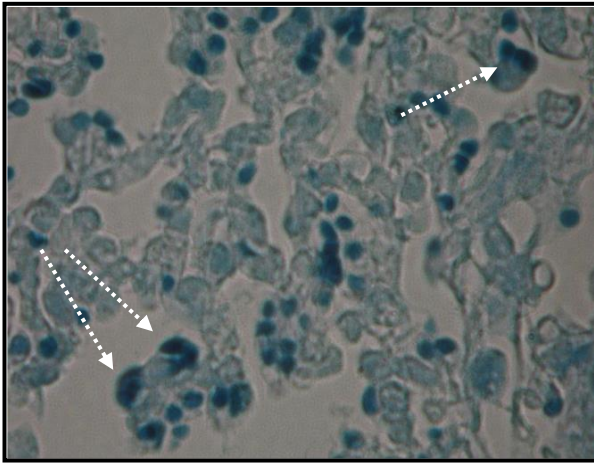


Рисунок 5.7

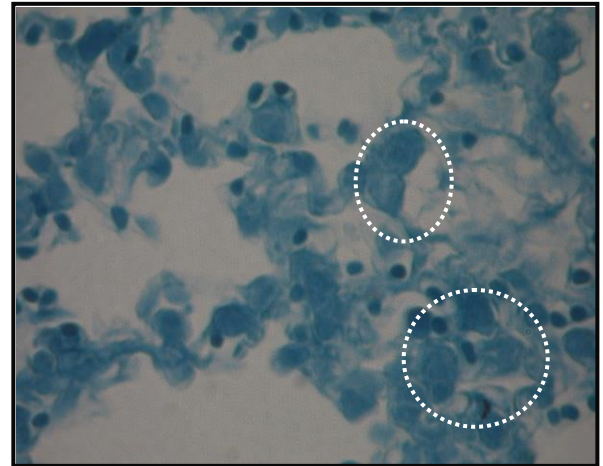


Рисунок 5.8

Рисунок 5.7, Рисунок 5.8 - Модель 1623, терминальная стадия сепсиса. Фрагменты легочной паренхимы. Описание - в тексте. Гистохимическая окраска амидочерным - 10V на общий белок. Увеличение: Рисунок 5.7; Рисунок 5.8 – $\times 400$

В стенках мелких внутрилегочных бронхов в исследованных моделях наблюдалась деструкция слизистой оболочки с клазматозом фрагментов эпителиоцитов в просветы бронхов (Рисунок 5.9), (Рисунок 5.10). Клазматозные частицы и слизь частично или практически полностью закрывали просветы мелких бронхов (Рисунок 5.10). Подобным образом измененные мелкие бронхи находились в основном в тех участках легкого, где наполнение альвеол воздухом было резко снижено (Рисунок 5.2), (Рисунок 5.10).

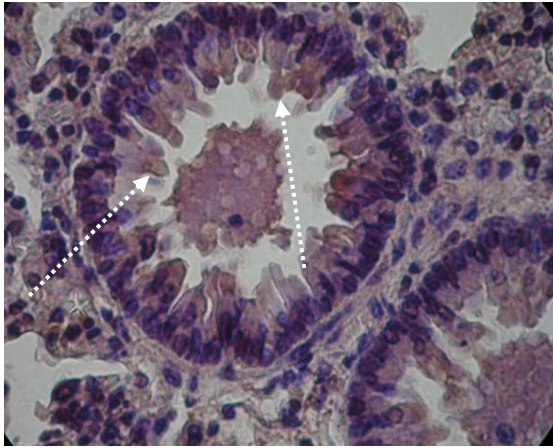


Рисунок 5.9

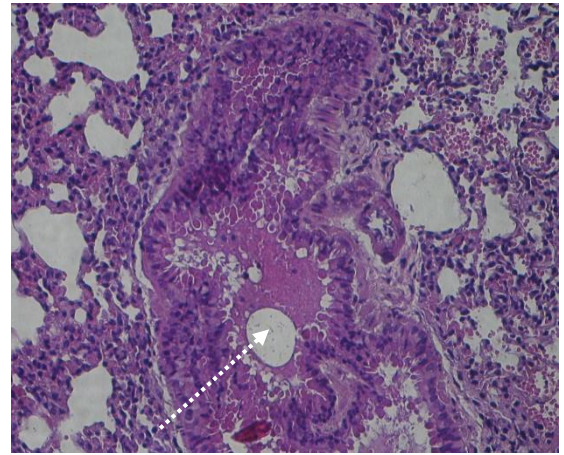


Рисунок 5.10

Рисунок 5.9. – Модель 5266, терминальная стадия сепсиса. Мелкие внутрилегочные бронхи: деструкция эпителия слизистой оболочки, клазматоз эпителиоцитов (стрелки), признаки нарушения транспорта слизи и клеточного детрита, сужение просветов бронхов. Окрашивание: по Маллори. Увеличение: – $\times 400$.

Рисунок 5.10 – Модель 1623, терминальная стадия сепсиса. Пояснение в тексте. Окрашивание:– гематоксилин и эозин. Увеличение: – $\times 200$.

Сосуды легочного интерстиция у септических животных обеих моделей были кровенаполнены, стенки отдельных артерий гиалинизированы. При электронной микроскопии в просветах мелких бронхов, в сосудах и в полости ацинусов часто находились неизменные формы *P. aeruginosa*.

Комплекс зарегистрированных гистологических изменений легких указывает на развитие острого воспалительного процесса у септических животных обеих моделей.

3.3.1.2 Анализ показателей высевов из гомогенатов легких и крови

Показатели роста колоний *P. aeruginosa* 1623 из гомогенатов легких были сопоставимы с высеvom возбудителей из периферической крови в первые 15 мин сепсиса (Рисунок 6.1) и далее в разной степени превышали показатели высевов из

крови (Таблица 7), характеризуюсь незначительными колебаниями с первого часа после заражения и вплоть до терминальной стадии сепсиса.

Таблица 7 - Результаты микробиологического посева Ра 1623 и Ра 5266 из гомогенатов легких и крови

Время после заражения	Модель 1623	Модель 5266
	Легкие/Кровь $M \pm m; \lg$	Легкие/Кровь $M \pm m; \lg$
15 '	$5,04 \times 10^3 \pm 3,04 \times 10^2; \lg(3,70 \pm 2,48) /$ $2,01 \times 10^4 \pm 7,19 \times 10^2; \lg(4,30 \pm 2,86)^*$	$5,84 \times 10^3 \pm 1,53 \times 10^2; \lg(3,76 \pm 2,18) /$ $3,90 \times 10^4 \pm 9,38 \times 10^2; \lg(4,59 \pm 2,97)^*$
30 '	$4,24 \times 10^5 \pm 1,32 \times 10^5; \lg(5,63 \pm 5,12) /$ $3,6 \times 10^4 \pm 9,70 \times 10^2; \lg(4,56 \pm 2,99)^*$	$4,70 \times 10^4 \pm 8,47 \times 10^2; \lg(4,67 \pm 2,93) /$ $2,10 \times 10^6 \pm 3,7 \times 10^4; \lg(6,32 \pm 4,57)^*$
60 '	$4,3 \times 10^4 \pm 8,37 \times 10^2; \lg(4,63 \pm 2,92) /$ $2,33 \times 10^4 \pm 8,92 \times 10^2; \lg(4,37 \pm 2,95)^*$	$4,90 \times 10^5 \pm 2,6 \times 10^4; \lg(5,69 \pm 4,41) /$ $3,50 \times 10^6 \pm 3,03 \times 10^4; \lg(6,54 \pm 4,48)^*$
120 '	$9 \times 10^4 \pm 2,95 \times 10^2; \lg(4,96 \pm 2,47) /$ $3,80 \times 10^3 \pm 9,4 \times 10^1; \lg(3,58 \pm 1,97)^*$	$9 \times 10^5 \pm 2,9 \times 10^4; \lg(5,95 \pm 4,46) /$ $7,60 \times 10^6 \pm 1,3 \times 10^5; \lg(6,88 \pm 5,11)^*$
180 '	$7,53 \times 10^5 \pm 1,8 \times 10^3; \lg(5,88 \pm 3,26) /$ $1,3 \times 10^3 \pm 2,9 \times 10^1; \lg(3,11 \pm 1,46)^*$	$1,23 \times 10^5 \pm 1,2 \times 10^3; \lg(5,09 \pm 3,08) /$ $3,96 \times 10^4 \pm 6,39 \times 10^2; \lg(4,60 \pm 2,81)^*$
240 '	$4,2 \times 10^5 \pm 2,4 \times 10^3; \lg(5,62 \pm 3,38) /$ $7,5 \times 10^5 \pm 3,3 \times 10^4; \lg(5,88 \pm 4,52)^*$	$2,40 \times 10^5 \pm 3,8 \times 10^3; \lg(5,38 \pm 3,58) /$ $4 \times 10^4 \pm 2,3 \times 10^3; \lg(4,60 \pm 3,36)^*$
480 '	$2,9 \times 10^5 \pm 2,46 \times 10^3; \lg(5,46 \pm 3,39) /$ $2,4 \times 10^4 \pm 2,34 \times 10^2; \lg(4,38 \pm 2,37)^*$	$9 \times 10^4 \pm 7,58 \times 10^2; \lg(4,95 \pm 2,88) /$ $2,06 \times 10^4 \pm 3,15 \times 10^2; \lg(4,31 \pm 2,49)^*$
1440 '	$6,1 \times 10^5 \pm 5,6 \times 10^4; \lg(5,79 \pm 4,75) /$ $2,5 \times 10^5 \pm 8,2 \times 10^3; \lg(5,40 \pm 3,91)^*$	$5,90 \times 10^6 \pm 5,7 \times 10^5; \lg(6,77 \pm 5,75) /$ $1,50 \times 10^6 \pm 1,7 \times 10^5; \lg(6,17 \pm 5,23)^*$

Данные представлены $M \pm m$ – среднеарифметическое значение $\pm$ стандартная ошибка

* различия между значениями посева из крови и гомогенатов легких статистически достоверны (при $p < 0,001$)

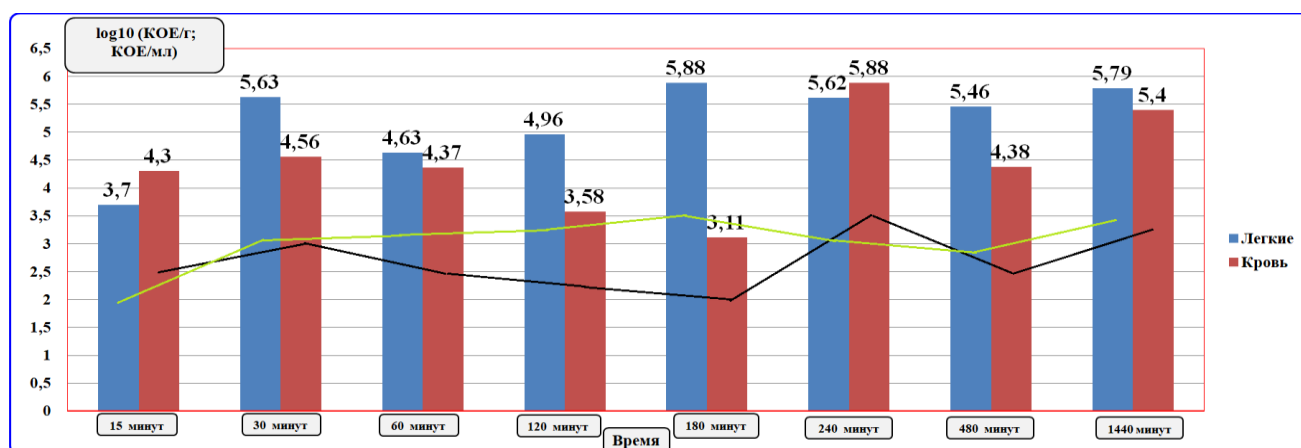


Рисунок 6.1 - Динамика показателей микробиологического посева Pa 1623 из крови и гомогенатов легких

Результаты исследования высевок из гомогенатов легких в модели 5266 отличались от модели 1623: в первые 3 часа после заражения результаты высевок из легких уступали таковым из крови (Рисунок 6.2), а далее, вплоть до терминальной стадии, превосходили результативность высевок из крови.

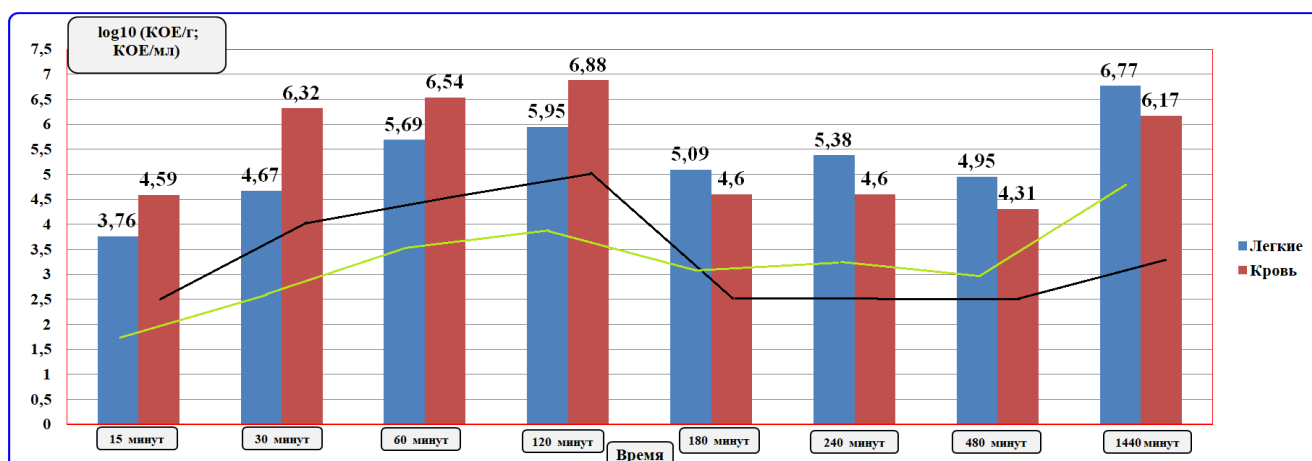


Рисунок 6.2 - Динамика показателей микробиологического посева *P. aeruginosa* 5266 из крови и гомогенатов легких

3.3.2 Гистологическая характеристика надпочечников

В срезах надпочечников контрольных мышей (Рисунок 7.1) четко отграничены корковое и мозговое вещество; клубочковая зона состоит из мелких компактно лежащих кортикостероцитов, имеющих относительно крупные ядра, ярко окрашенные гематоксилином.

Периферическая достаточно широкая часть пучковой зоны образована крупными кортикостероцитами со светлой вакуолизированной цитоплазмой (свидетельство стероидпродуцирующей активности), расположенными в виде столбцов, перпендикулярных капсуле. Более глубокая часть пучковой зоны (обозначаемая как «неструктурированная», часть этой зоны) состоит из кортикостероцитов, расположенных компактно без оформления в столбцы. Яркая эозинофильная окраска цитоплазмы этих клеток без признаков вакуолизации косвенно свидетельствует об отсутствии стероидной активности. (*Примечание: сетчатой зоны, производящей андрогены, в составе коркового вещества надпочечников мышей нет. «Неструктурированная» часть пучковой зоны не является аналогом сетчатой зоны коры и пока еще мало изучена*). Мозговое вещество надпочечников состоит из кластеров хромаффиноцитов со светлыми ядрами и мелкозернистой слегка базофильной цитоплазмой. Кластеры разделены капиллярами и более крупными сосудистыми каналами.

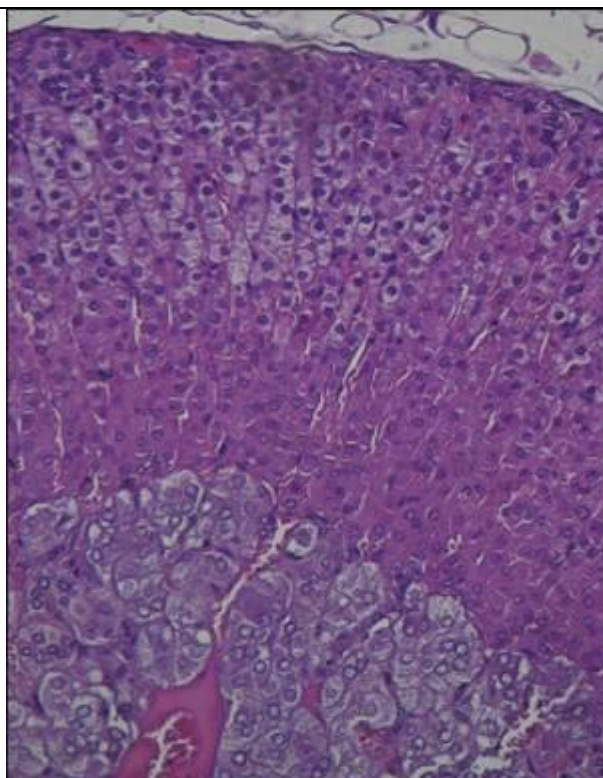


Рисунок 7.1 – Контрольное животное. Фрагмент надпочечника: четкое подразделение коры на зоны, группы хромаффиноцитов в мозговом веществе.
Окрашивание: гематоксилин и эозин.
Увеличение: $\times 100$

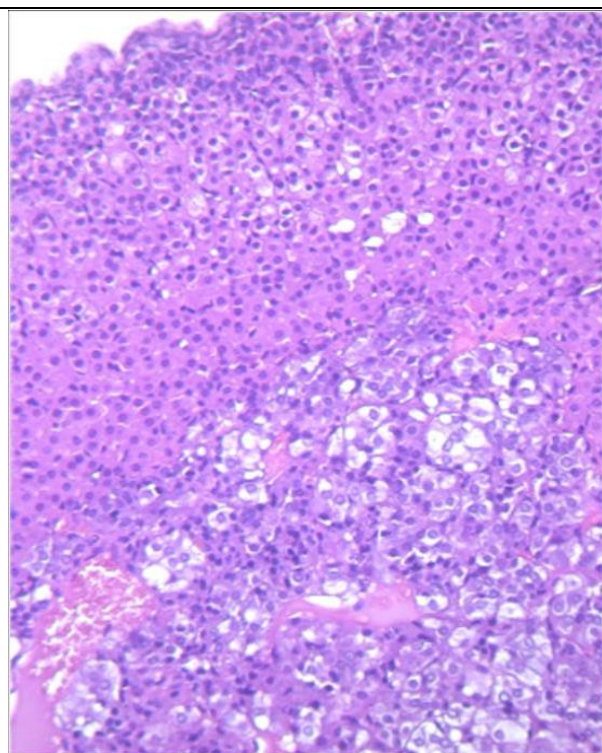


Рисунок 7.2 - Модель 1623, терминальная стадия сепсиса. Фрагмент надпочечника животного. Дезорганизация цитоархитектоники коркового и мозгового вещества, разрушение хромаффиноцитов, венозное полнокровие.
Окрашивание: гематоксилин и эозин. Увеличение: $\times 100$

На терминальной стадии сепсиса в надпочечниках животных (модели 1623 и 5266) были выявлены однотипные морфологические изменения: уменьшение абсолютной площади столбчатой части пучковой зоны (Таблица 8), с относительным доминированием неструктурированной (по светооптическим признакам функционально неактивной) части, дезинтеграция цитоархитектоники коркового и мозгового вещества, разрушение клеток коры и мозгового вещества надпочечников (Рисунок 7.2), тенденция к снижению абсолютной площади клубочковой зоны (Таблица 9), венозное полнокровие (особенно выраженное, с картинами стаза – в мозговом веществе). Площадь коркового вещества, занятая неструктурированной частью пучковой зоны, превышала контрольные значения.

Показатели абсолютной площади мозгового вещества на срединных срезах надпочечников у разных животных варьировали, что было связано с различиями в степени венозного полнокровия.

Таблица 8 - Показатели абсолютной площади (усл.ед.) столбчатой части пучковой зоны надпочечников в динамике сепсиса

Модель; время после заражения	Столбчатая часть пучковой зоны М ± m
Модель 1623; 1 - 1,5 часа	23488,65±2451,07*
Модель 1623; 3,5 - 4 часа	13956,84±950,82*
Модель 1623; 24 часа	12086,29±1397,77*
Модель 5266; 1 - 1,5 часа	29166,18±494,58*
Модель 5266; 3,5 - 4 часа	19558,87±600,87*
Модель 5266; 24 часа	16533,17±2652,3*
Контроль	28970,22±383,03 [#]

Данные представлены М ± m – среднеарифметическое значение ± стандартная ошибка

[#] различия опытной группы с контрольной статистически достоверны (при $p \leq 0,05$)

Таблица 9 - Показатели абсолютной площади (усл.ед.) клубочковой зоны надпочечников в динамике сепсиса

Модель; время после заражения	Клубочковая зона; М ± m
Модель 1623; 1-1,5 часа	10452,57±1026,3 ^{2,*}
Модель 1623; 3,5 - 4 часа	7677,47±314,04 ^{3,***}
Модель 1623; 24 часа	7938,95±1228,2 ^{4,#}
Модель 5266; 1 -1,5 часа	10997,7±566,96 ^{5,*}
Модель 5266; 3,5 - 4 часа	14541,13±566,96 ^{6,***}

Продолжение Таблицы 9

Модель 5266; 24 часа	8456,23±849,37 ^{7,#}
Контроль	10123,94±145,6 ¹

Данные представлены $M \pm m$ – среднеарифметическое значение $\pm$ стандартная ошибка

[#] различия опытной группы с контрольной статистически достоверны: $p^{1-3} \leq 0,05$; p^{1-6} ; $*** \leq 0,001$.

* не установлено значимых различий между опытной и контрольной группой: $p^{1-2}, ^{1-4}, ^{1-5}, ^{1-7}, *, ^{\#} \geq 0,05$

3.3.2.1 Результаты электронной микроскопии надпочечников

К терминальной стадии сепсиса на ультраструктурном уровне в кортикостероцитах клубочковой зоны и столбчатой части пучковой зоны зарегистрированы: резкое просветление цитозоля, хроматинолиз, разрушение органелл мембранного типа (более всего, – митохондрий) с выходом в вакуолярную дегенерацию, фигуры апоптоза (Рисунок 7.3), (Рисунок 7.4), Рисунок 7.5), отсутствие липидных включений – субстрата для биосинтеза стероидов.

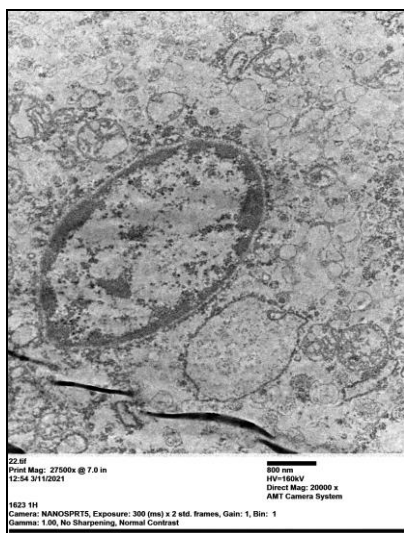


Рисунок 7.3

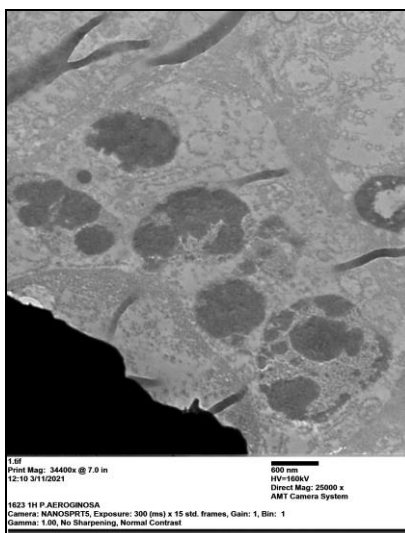


Рисунок 7.4

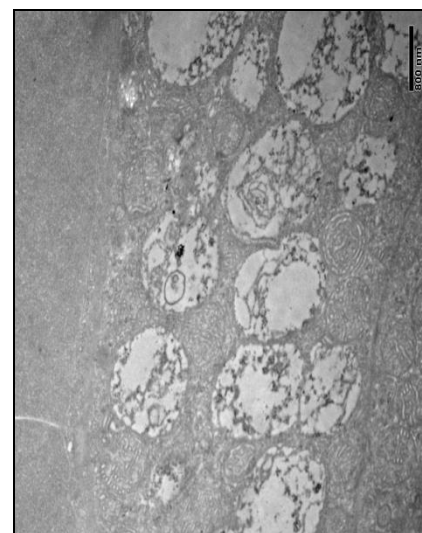


Рисунок 7.5

Рисунок 7.3 – Рисунок 7.5 – Модель 1623, терминальная стадия сепсиса. Ультраструктурные признаки дегенерации кортикостероцитов:

Рисунок 7.3 - Хроматинолиз ядра и разрушение мембранных органелл. Электроннограмма. Увеличение: – $\times 7000$

Рисунок 7.4 – Апоптоз, Электроннограмма. Увеличение: – $\times 20000$,

Рисунок 7.5 - Разрушение органелл с выходом в вакуолярную дегенерацию. Электроннограмма. Увеличение: – $\times 20000$.

Несмотря на то, что площадь неструктурированной части пучковой зоны в надпочечниках септических мышей к терминальной стадии была увеличена, на ультраструктурном уровне ее клетки (как и в контроле) не проявляли признаков стероидной активности - имели мелкие митохондрии с тонкими трубчатыми кристами, неразвитую агранулярную эндоплазматическую сеть и были лишены липидных включений.

В хромаффиноцитах присутствовали: деструкция митохондрий и гранулярной эндоплазматической сети, разрушение и уменьшение численности секреторных гранул (Рисунок 7.6) (Рисунок 7.8).

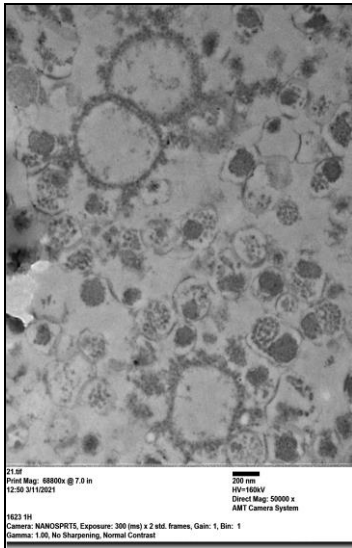


Рисунок 7.6

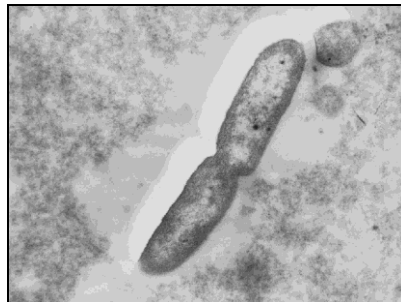


Рисунок 7.7

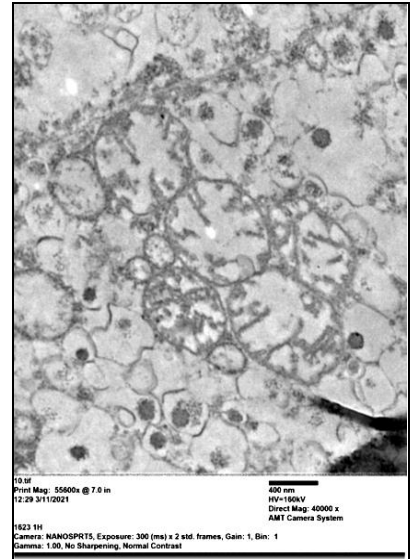


Рисунок 7.8

Рисунок 7.6. – Модель 5266, терминальная стадия сепсиса. Разрушение ультраструктуры хромаффиноцита мозгового вещества. Электроннограмма. Увеличение: – $\times 20000$

Рисунок 7.7. – Модель 1623, терминальная стадия сепсиса. Формирование перетяжки *Pseudomonas aeruginosa* в сосуде надпочечника. Электроннограмма. Увеличение:– $\times 30000$

Рисунок 7.8. – Модель 1623, терминальная стадия сепсиса. Дегрануляция и разрушение митохондрий хромаффиноцита. Электроннограмма. Увеличение:– $\times 20000$

Очагов лейкоцитарной инфильтрации и макрофагальной реакции в тканях надпочечников септических животных зарегистрировано не было за исключением мелких скоплений лимфоцитов в мозговом веществе и на границе мозгового и коркового вещества. При электронной микроскопии в микроциркуляторных сосудах, в клетках и межклеточных промежутках коры и мозгового вещества надпочечников на разных стадиях сепсиса присутствовали морфологически неизменные бактериальные клетки *P. aeruginosa* (Рисунок 7.7).

3.3.2.2 Анализ показателей высевов из гомогенатов надпочечников и крови

Данные бактериологического анализа подтвердили обсеменение надпочечников *P. aeruginosa*, однако количественные характеристики микробиологических высевов возбудителей из гомогенатов надпочечников по сравнению с показателями высевов из крови, хотя и варьировали, но в меньшей степени и в отдельных временных точках были сопоставимы с посевами из крови (120, 480 мин - в модели 1623 и 180, 480 – в модели 5266), или уступали таковым (Рисунок 8.1), (Рисунок 8.2), (Таблица 10).

Таблица 10 – Результаты показателей микробиологического посева Ра 1623 и Ра 5266 из гомогенатов надпочечников

Время после заражения	Модель 1623	Модель 5266
	Надпочечники/Кровь $M \pm m$; $\log_{10}(\text{КОЕ/г; КОЕ/мл})$	Надпочечники/Кровь $M \pm m$; $\log_{10}(\text{КОЕ/г; КОЕ/мл})$
90 '	$1,53 \times 10^2 \pm 1,6 \times 10^1$; $2,18 \pm 1,2$ / $4,7 \times 10^4 \pm 3,53 \times 10^2$; $4,67 \pm 2,55^*$	$4,2 \times 10^3 \pm 4,08 \times 10^2$; $3,62 \pm 2,6$ / $3,4 \times 10^6 \pm 3,4 \times 10^3$; $6,53 \pm 3,53^{**}$
120 '	$6,9 \times 10^3 \pm 7,33 \times 10^2$; $3,84 \pm 2,87$ / $3,80 \times 10^3 \pm 9,4 \times 10^1$; $3,58 \pm 1,97^*$	$1,8 \times 10^4 \pm 6,7 \times 10^2$; $4,26 \pm 2,83$ / $7,60 \times 10^6 \pm 1,3 \times 10^5$; $6,88 \pm 5,11^{**}$
180 '	$5,4 \times 10^4 \pm 4,6 \times 10^3$; $4,73 \pm 3,66$ / $1,3 \times 10^3 \pm 28,98$; $3,11 \pm 1,46^*$	$8,4 \times 10^4 \pm 1,4 \times 10^3$; $4,92 \pm 3,15$ / $3,96 \times 10^4 \pm 6,39 \times 10^2$; $4,60 \pm 2,81^{**}$
240 '	$5,3 \times 10^4 \pm 5,3 \times 10^3$; $4,72 \pm 3,72$ / $7,5 \times 10^5 \pm 3,3 \times 10^4$; $5,88 \pm 4,52^*$	$6,9 \times 10^4 \pm 8,8 \times 10^3$; $4,84 \pm 3,94$ / $4 \times 10^4 \pm 2,3 \times 10^3$; $4,60 \pm 3,36^{**}$
480 '	$1,8 \times 10^4 \pm 1,4 \times 10^3$; $4,26 \pm 3,15$ / $2,4 \times 10^4 \pm 2,34 \times 10^2$; $4,38 \pm 2,37^{**}$	$9,5 \times 10^4 \pm 4,3 \times 10^3$; $4,98 \pm 3,63$ / $2,06 \times 10^4 \pm 3,15 \times 10^2$; $4,31 \pm 2,49^{**}$
1440 '	$1,83 \times 10^5 \pm 1,3 \times 10^4$; $5,26 \pm 4,11$ / $2,5 \times 10^5 \pm 8,2 \times 10^3$; $5,40 \pm 3,91^*$	$3,5 \times 10^5 \pm 2,2 \times 10^4$; $5,54 \pm 4,34$ / $1,50 \times 10^6 \pm 1,7 \times 10^5$; $6,17 \pm 5,23^{**}$

Данные представлены $M \pm m$ – среднеарифметическое значение $\pm$ стандартная ошибка

*различия опытной группы с контрольной статистически достоверны:
* $p < 0,001$; ** $p < 0,01$.

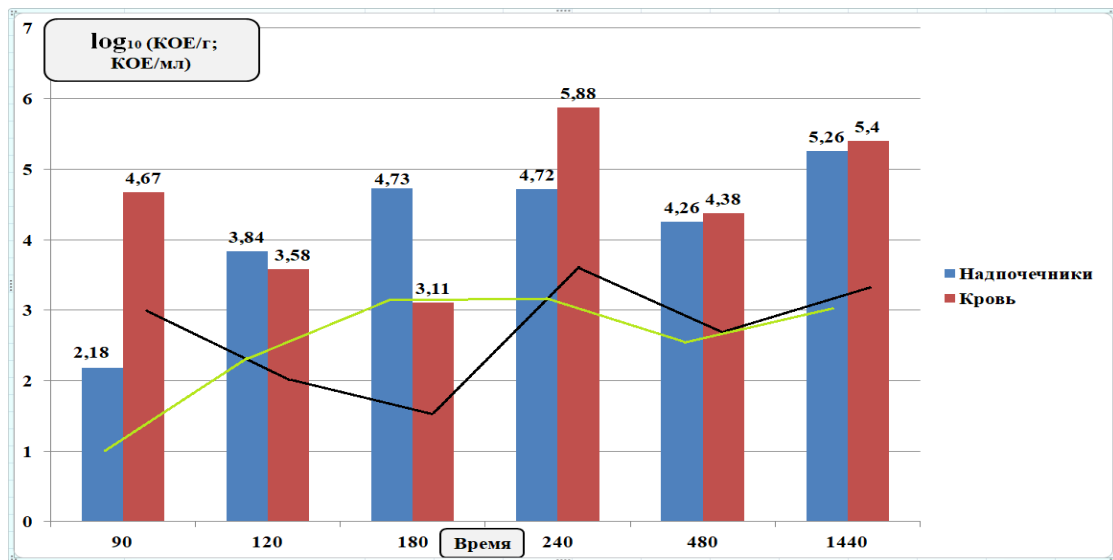


Рисунок 8. 1 - Динамика показателей микробиологического высева Ра 1623 из крови и гомогенатов надпочечников

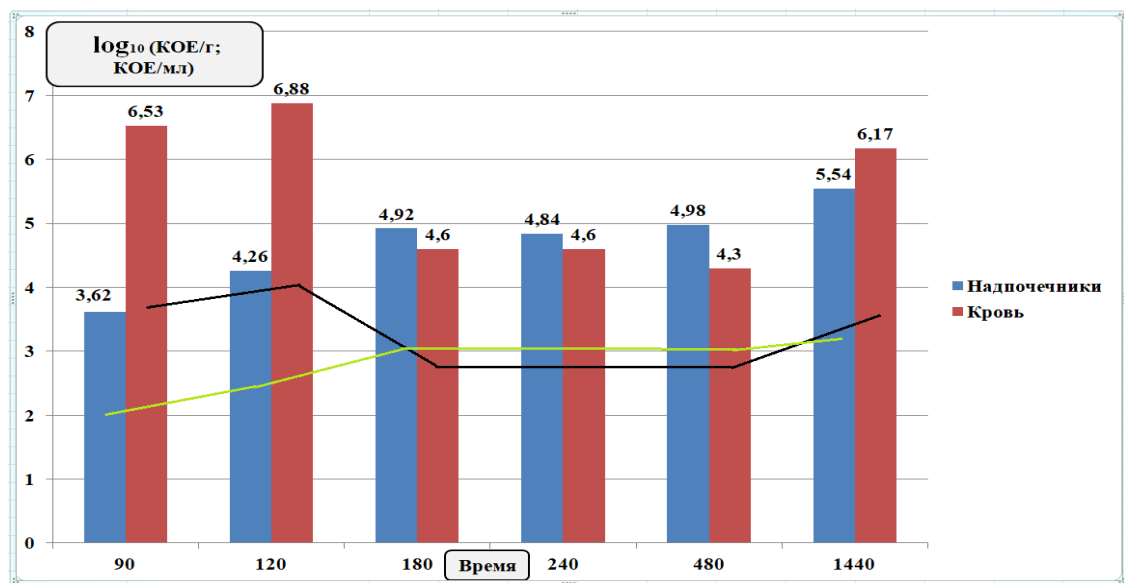


Рисунок 8.2 - Динамика показателей микробиологического высева Ра 5266 из крови и гомогенатов надпочечников

3.3.2.3 Анализ мРНК провоспалительных цитокинов в тканях надпочечников в динамике экспериментального септического процесса

По результатам ПЦР-диагностики в тканях надпочечников в динамике сепсиса зафиксированы уровни мРНК провоспалительных цитокинов

(Таблица 11), существенно превышающие аналогичные показатели в контрольных препаратах (Таблица 11).

Таблица 11 - Уровень мРНК провоспалительных цитокинов (ед. оптической плотности – ОП) в тканях надпочечников мышей в динамике сепсиса

Условия опыта		мРНК ИЛ - 1бета (ОП)	мРНК ИЛ-6 (ОП)	мРНК ФНОальфа (ОП)
		$M \pm m$	$M \pm m$	$M \pm m$
Ра 1623	1 час	16,24±1,20 ^{2, #}	13,14±2,33 ^{9, #}	7,6±1,76 ^{16, #}
	4 часа	15,24±2,80 ^{3, #}	12,7±2,03 ^{10, #}	3,04±0,33 ^{17, #}
	24 часа	17,25±0,67 ^{4, #}	13,95±1,33 ^{11, #}	8,53±0,58 ^{18, #}
Ра 5266	1 час	14,53±0,88 ^{5, #}	14,33±0,88 ^{12, #}	9,49±1,53 ^{19, #}
	4 часа	16,58±1,53 ^{6, #}	11,7±0,33 ^{13, #}	9,72±0,64 ^{20, #}
	24 часа	16,49±0,12 ^{7, #}	14,69±1,76 ^{14, #}	8,27±0,02 ^{21, #}
Контроль		1,27±0,05 ^{1*}	1,48±0,17 ^{8*}	2,45±0,01 ^{15*}

Данные представлены $M \pm m$ – среднеарифметическое значение $\pm$ стандартная ошибка.

* различия опытной группы с контрольной статистически достоверны: $p^{1-(2-7)} \leq 0,05$; $p^{8-(9-14)} \leq 0,05$; $p^{15-(16-21)} \leq 0,05$.

3.3.2.4 Результаты иммуногистохимического окрашивания тканей надпочечников на провоспалительные ИЛ-1бета и противовоспалительный ИЛ-10

Специфическое иммуногистохимическое окрашивание надпочечников на провоспалительный ИЛ-1бета у животных моделей 1623 и 5266 (Рисунок 9.1) присутствовало преимущественно в эндотелии сосудов мозгового вещества и менее выраженное - в клетках коры; при этом интенсивность реакции на противовоспалительный цитокин - ИЛ-10, который, как известно, способен

подавлять провоспалительный эффект интерлейкина ИЛ-1бета, у животных обеих моделей находилась на уровне детекции.

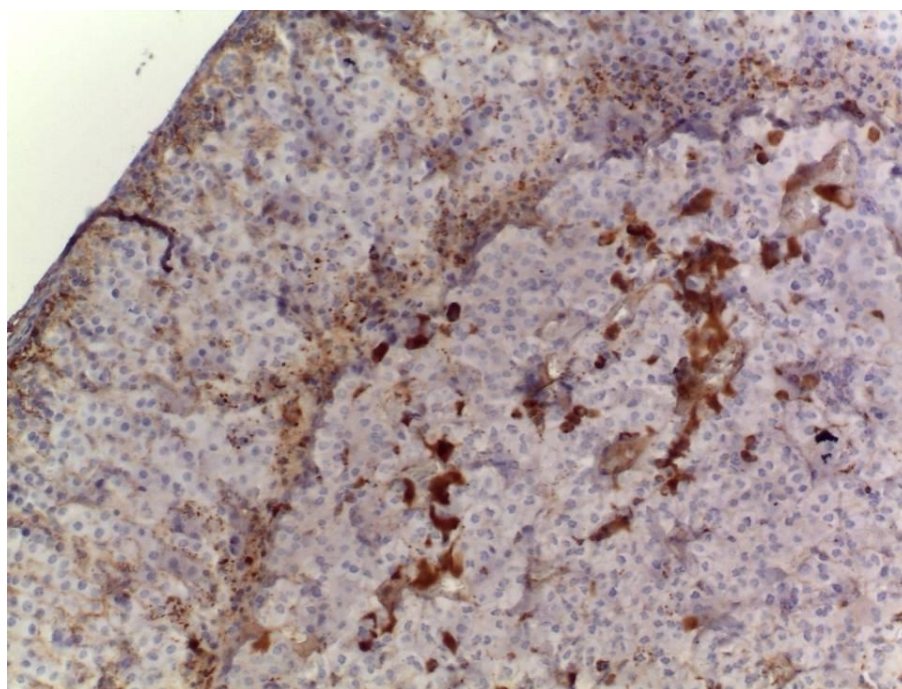


Рисунок 9.1

Рисунок 9.1 - Модель 1623, терминальная стадия сепсиса. Фрагмент надпочечника. Иммуногистохимическая реакция на ИЛ-1бета в клетках клубочковой зоны, глубоких слоев пучковой зоны и эндотелии сосудов. Увеличение: $\times 200$

3.3.3 Гистологическая характеристика селезенки

Гистологические признаки селезенки мышей двух исследованных моделей (5266, 1623) на терминальной стадии сепсиса значительно отличались от контрольных показателей. В препаратах селезенки контрольных животных белая пульпа оформлена в виде лимфоидных узелков с реактивными центрами и единичными апоптотическими клетками (Рисунок 10.1). В красной пульпе

присутствуют диффузно расположенные клетки лимфоидного ряда, умеренное количество эритроцитов, лейкоцитов, отдельные моноциты и мегакариоциты.

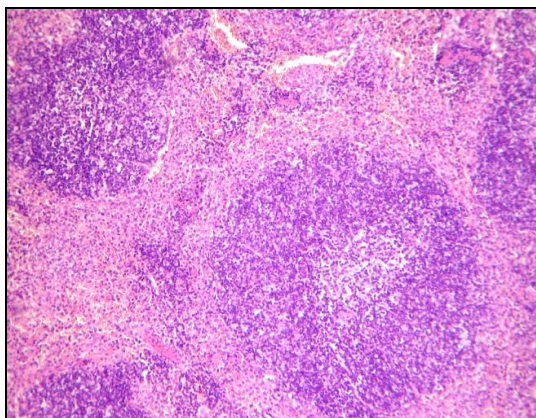


Рисунок 10.1

Рисунок 10.1 – Контрольное животное. Фрагмент среза селезенки: лимфоидные узелки округлой формы со светлыми реактивными центрами. Окрашивание: гематоксилин и эозин. Увеличение: $\times 100$.

Структура селезенки у мышей, зараженных Ра 1623 и достигших терминального состояния через 24 часа, характеризовалась достоверным увеличением средней абсолютной площади белой пульпы на срединных срезах органа (признак гиперплазии белой пульпы) до $59266,14 \pm 1750,25 \text{ мкм}^2$ (46%) по сравнению с контролем - $38463,815 \pm 1599,893 \text{ мкм}^2$ (30%); $p < 0,01$ (Таблица 12).

Таблица 12 - Показатели абсолютной площади (усл.ед.) белой и красной пульпы селезенки на терминальной стадии сепсиса

Модели сепсиса, терминальная стадия	Белая пульпа $M \pm m$	Красная пульпа $M \pm m$
Модель 1623	$59266,14 \pm 1750,25^2$	$47921,44 \pm 2031,69^5$
Модель 5266	$30585,71 \pm 3039,52^3$	$70043,41 \pm 2474,31^6$
Контроль	$38463,815 \pm 1599,89^1$ *	$59275,48 \pm 2166,28^4$ *

Данные представлены $M \pm m$ – среднееарифметическое значение $\pm$ стандартная ошибка

*различия опытной группы с контрольной статистически достоверны (цифрами указаны контроль и опытные группы): $p_{1-2, 3} < 0,05$; $p_{1-2} < 0,01$; $p_{4-9,10} < 0,05$

Скопления лимфоцитов имели как округлую, так и неправильную форму (Рисунок 10.2) с обширными участками апоптоза клеток.

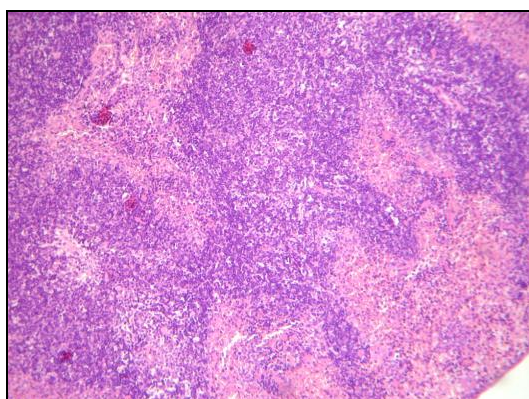


Рисунок 10.2

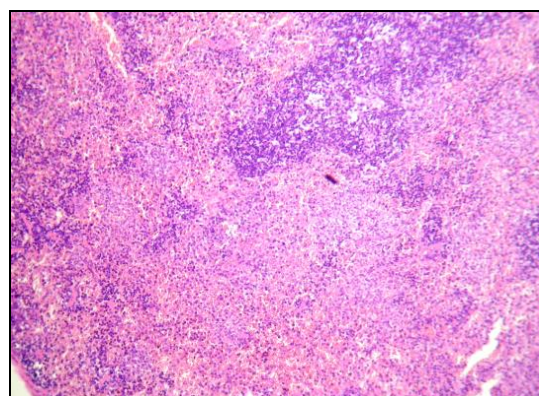


Рисунок 10.3

Рисунок 10.2 - Модель 1623, терминальная стадия сепсиса. Фрагмент среза селезенки, гиперплазия белой пульпы. Окрашивание: – гематоксилин и эозин. Увеличение: - $\times 100$.

Рисунок 10.3 - Модель 5266, терминальная стадия сепсиса. Фрагмент среза селезенки, гипоплазия белой пульпы. Окрашивание: – гематоксилин и эозин. Увеличение: - $\times 100$

В модели 5266 реактивные изменения белой пульпы характеризовались гипоплазией (Таблица 12) (Рисунок 10.3).

Общими морфологическими признаками селезенки у животных обеих моделей были: резкая гиперемия красной пульпы с признаками венозного тромбоза и обильного кровенаполнения стромы органа, а также признаками апоптоза клеток белой пульпы (Рисунок 10.4, Рисунок 10.5, Рисунок 10.6)

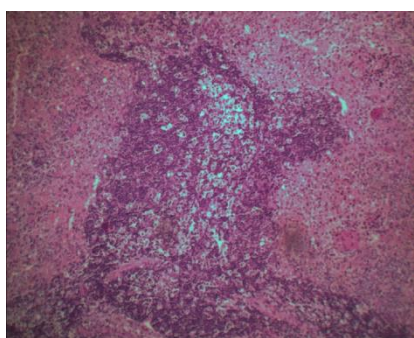


Рисунок 10.4

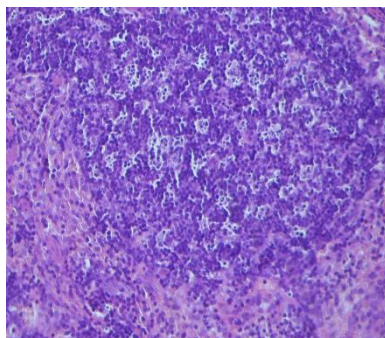


Рисунок 10.5

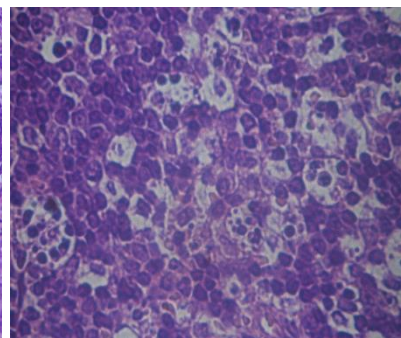


Рисунок 10.6

Рисунки 10.4 – 10.6 – Модели 1623 и 5266. Картины апоптоза лимфоцитов белой пульпы при разных увеличениях. Окрашивание: гематоксилин и эозин. Увеличение: Рисунок 10.4 – $\times 100$, Рисунок 10.5 – $\times 200$; Рисунок 10.6 – $\times 400$.

3.3.3.1 Анализ показателей высева *P. aeruginosa* из гомогенатов селезенки и крови

Анализ динамики показателей микробиологического высева *P. aeruginosa* в модели 1623 выявил превышение образования колоний из гомогенатов селезенки по сравнению с посевами из крови практически на всем протяжении сепсиса (Таблица 13), (Рисунок 11.1), а в модели 5266 – преимущественно на финальных стадиях сепсиса (Таблица 13), (Рисунок 11.2).

Таблица 13 - Результаты показателей микробиологического высева Ра 1623 и Ра 5266 из гомогенатов селезенки и крови

Время после заражения	Модель 1623	Модель 5266
	Селезенка/Кровь $M \pm m; \log_{10}(\text{КОЕ/г; КОЕ/мл})$	Селезенка/Кровь $M \pm m; \log_{10}(\text{КОЕ/г; КОЕ/мл})$
15 '	$1,10 \times 10^4 \pm 8,04 \times 10^2; \lg(4,04 \pm 2,91) /$ $2,01 \times 10^4 \pm 7,2 \times 10^2; \lg(4,30 \pm 2,86)^*$	$2,40 \times 10^4 \pm 6,24 \times 10^2; \lg(4,38 \pm 2,80) /$ $3,90 \times 10^4 \pm 9,38 \times 10^2; \lg(4,59 \pm 2,97)^*$
30 '	$8,30 \times 10^5 \pm 3,2 \times 10^4; \lg(5,92 \pm 4,51) /$ $3,6 \times 10^4 \pm 9,70 \times 10^2; \lg(4,56 \pm 2,99)^*$	$7,80 \times 10^5 \pm 3,03 \times 10^4; \lg(5,89 \pm 4,48) /$ $2,10 \times 10^6 \pm 3,7 \times 10^4; \lg(6,32 \pm 4,57)^*$
60 '	$3,27 \times 10^5 \pm 6,4 \times 10^3; \lg(5,51 \pm 3,81) /$ $2,33 \times 10^4 \pm 8,92 \times 10^2; \lg(4,37 \pm 2,95)^*$	$5,40 \times 10^6 \pm 4,06 \times 10^4; \lg(6,73 \pm 4,61) /$ $3,50 \times 10^6 \pm 3,03 \times 10^4; \lg(6,54 \pm 4,48)^*$

Продолжение Таблицы 13

120 '	$1,11 \times 10^6 \pm 1,7 \times 10^3$; lg (6,05 $\pm$ 3,23) / $3,80 \times 10^3 \pm 9,4 \times 10^1$; lg (3,58 $\pm$ 1,97)*	$4,80 \times 10^6 \pm 3,6 \times 10^4$; lg (6,68 $\pm$ 4,56) / $7,60 \times 10^6 \pm 1,3 \times 10^5$; lg(6,88 $\pm$ 5,11)*
180 '	$2,30 \times 10^6 \pm 2,12 \times 10^4$; lg (6,36 $\pm$ 4,33) / $1,3 \times 10^3 \pm 2,9 \times 10^1$; lg (3,11 $\pm$ 1,46)*	$9,54 \times 10^5 \pm 1,8 \times 10^4$; lg(5,98 $\pm$ 4,25) / $3,96 \times 10^4 \pm 6,39 \times 10^2$; lg(4,60 $\pm$ 2,81)*
240 '	$2,70 \times 10^5 \pm 3,6 \times 10^4$; lg (5,43 $\pm$ 4,56) / $7,5 \times 10^5 \pm 3,3 \times 10^4$; lg (5,88 $\pm$ 4,52)*	$8,50 \times 10^6 \pm 4,9 \times 10^4$; lg(6,93 $\pm$ 4,69) / $4 \times 10^4 \pm 2,3 \times 10^3$; lg(4,60 $\pm$ 3,36)*
480 '	$2,82 \times 10^6 \pm 1,06 \times 10^4$; lg(6,45 $\pm$ 4,03)/ $2,4 \times 10^4 \pm 2,34 \times 10^2$; lg (4,38 $\pm$ 2,37)*	$1,52 \times 10^6 \pm 1,5 \times 10^4$; lg(6,18 $\pm$ 4,18) / $2,06 \times 10^4 \pm 3,15 \times 10^2$; lg(4,31 $\pm$ 2,49)*
1440 '	$5 \times 10^5 \pm 3,2 \times 10^4$; lg (5,70 $\pm$ 4,51)/ $2,5 \times 10^5 \pm 8,2 \times 10^3$; lg (5,40 $\pm$ 3,91)*	$7,10 \times 10^6 \pm 6,4 \times 10^5$; lg(6,85 $\pm$ 5,81)/ $1,50 \times 10^6 \pm 1,7 \times 10^5$; lg(6,17 $\pm$ 5,23)*
p	*p < 0,01	

Данные представлены $M \pm m$ – среднеарифметическое значение $\pm$ стандартная ошибка

* различия статистически достоверны.

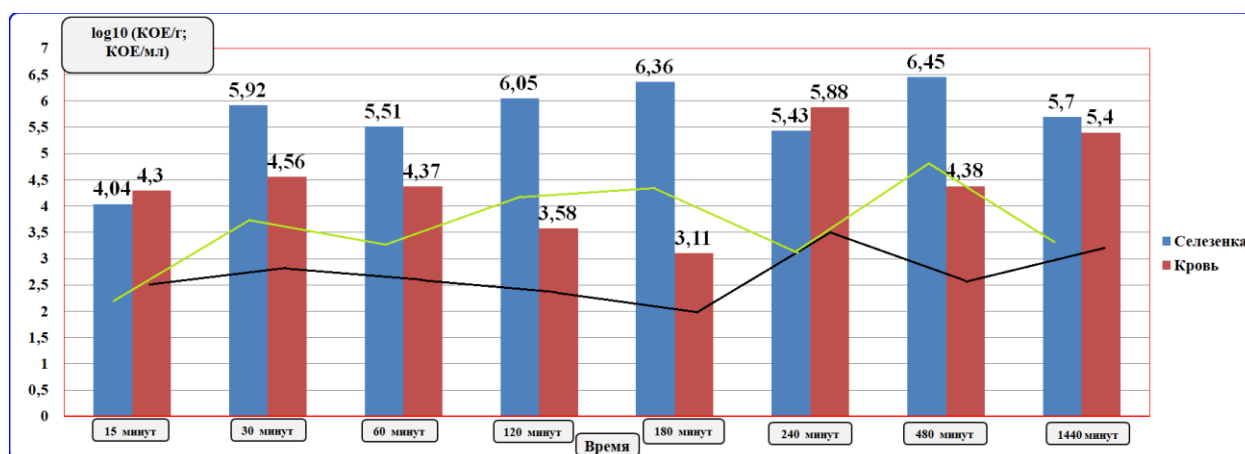


Рисунок 11.1 - Динамика показателей микробиологического посева Ра 1623 из крови и гомогенатов селезенки

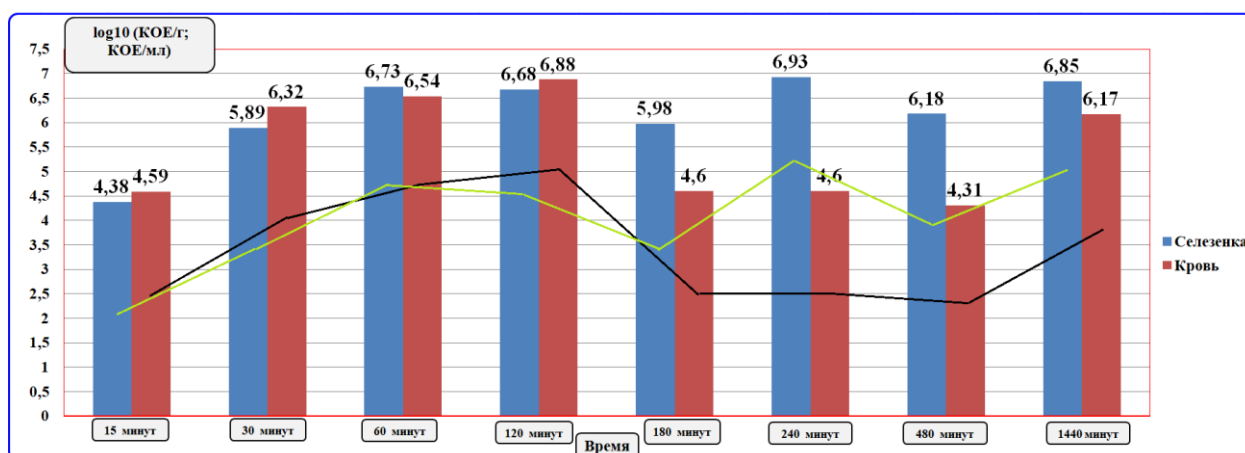


Рисунок 11.2 - Динамика показателей микробиологического высева Ра 5266 из крови и гомогенатов селезенки

3.3.4 Гистологическая характеристика печени

Физиологическую структуру печени характеризует дольковая архитектура и расположение гепатоцитов в виде пластин, или балок, радиально идущих к центральным венам долек и «сопровождаемых» печеночными синусоидными капиллярами (Рисунок 12.1).

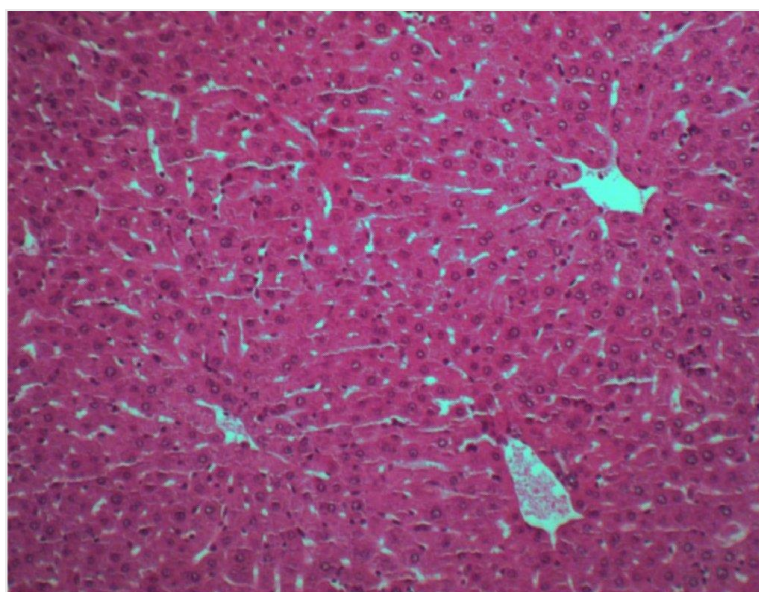


Рисунок 12.1

Рисунок 12.1 – Контрольное животное. Фрагмент печени (общий вид, описание в тексте). Окрашивание: гематоксилин и эозин. Увеличение: ×200

Гистологические изменения печени в модели 1623 на терминальной стадии сепсиса в подавляющем большинстве случаев были менее выраженными, чем в модели 5266, и характеризовались нарушением дольковой структуры, вакуолярной дегенерацией части гепатоцитов (Рисунок 12.2), снижением содержания общего белка в гепатоцитах, стазом крови в печеночных синусоидных капиллярах (Рисунок 12.3).

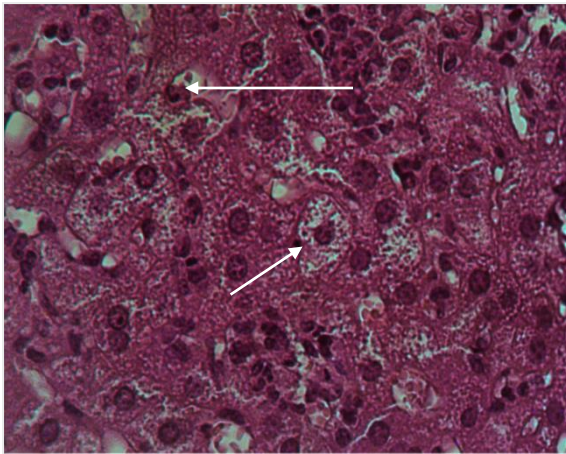


Рисунок 12.2

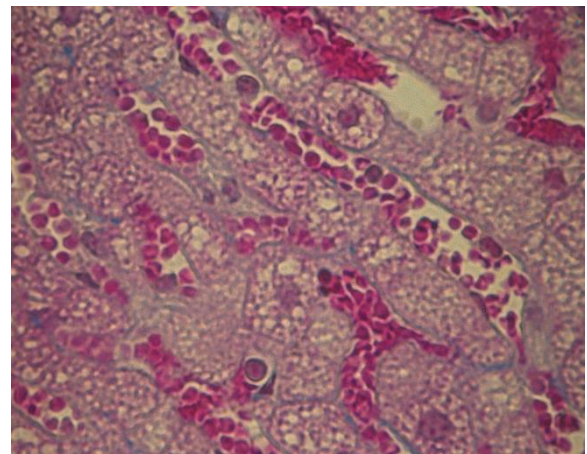


Рисунок 12.3

Рисунок 12.2. Модель 1623, терминальная стадия сепсиса. Фрагмент паренхимы печени, вакуолярная дегенерация части гепатоцитов (стрелки). Окрашивание: - гематоксилин и эозин. Увеличение: – $\times 400$;

Рисунок 12.3 - Модель 1623, терминальная стадия сепсиса. Фрагмент паренхимы печени, стаз крови в печеночных синусоидах. Окрашивание – по методу Маллори. Увеличение: – $\times 900$.

На субмикроскопическом уровне в составе многих гепатоцитов животных этой модели присутствовали признаки разрушения гранулярной эндоплазматической сети – основного источника белков “на экспорт” (в первую очередь – альбумина и белковых факторов свертывания и противосвертывания), митохондрий (с выходом в вакуолярную дегенерацию) (Рисунок 12.4), (Рисунок 12.5), (Рисунок 12.6), (Рисунок 12.7). В цитоплазме гепатоцитов (как и в периферической крови) часто находились структурно неизмененные *P. aeruginosa*.

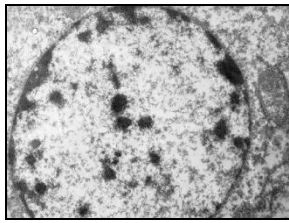


Рисунок 12.4

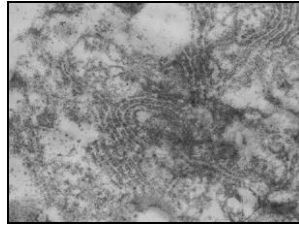


Рисунок 12.5

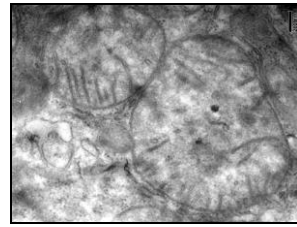


Рисунок 12.6

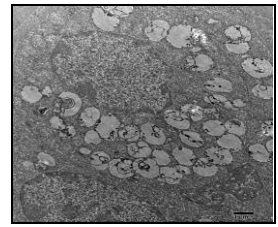


Рисунок 12.7

Рисунки 12.4 - Рисунок 12.7 Модель 1623, терминальная стадия сепсиса. Серия электроннограмм, демонстрирующих деструктивные изменения гепатоцитов. Слева направо: хроматинолиз, редукция гранулярной эндоплазматической сети, деструкция митохондрий, вакуолярная дегенерация гепатоцитов. Увеличение: Рисунок 12.4 - $\times 20000$, Рисунок 12.5 - $\times 15000$, Рисунок 12.6 - $\times 20000$, Рисунок 12.7 - $\times 10000$.

В печени животных в модели 5266, в дополнение к изменениям, обнаруженным в модели 1623, присутствовали: нарушение балочной организации гепатоцитов, скопления эозинофильных белковых масс в расширенных перисинусоидных пространствах, очаги лейкоцитарной инфильтрации и некроза, тромбы в центральных венах (Рисунок 12.8), (Рисунок 12.9).

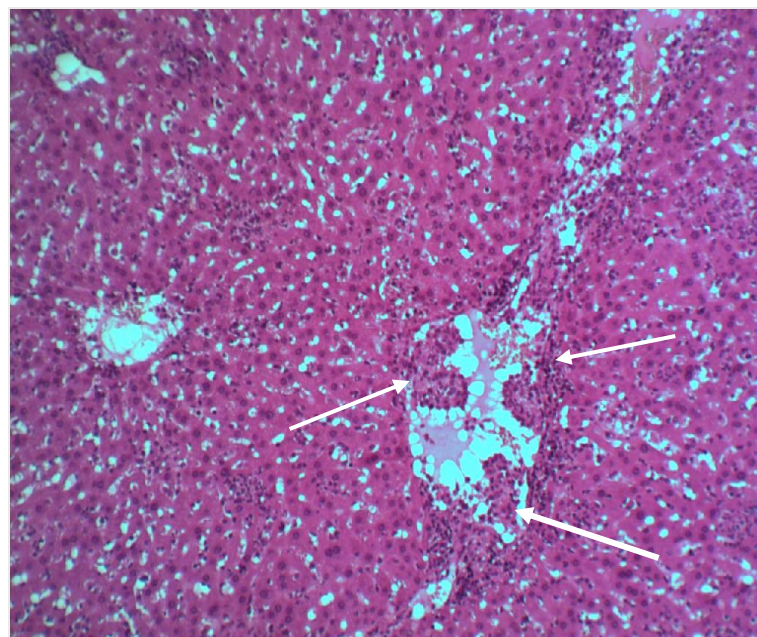


Рисунок 12.8

Рисунок 12.8 – Модель 5266, терминальная стадия сепсиса. Фрагмент печени: нарушение дольковой структуры и балочной организации гепатоцитов. Лейкоцитарная инфильтрация паренхимы, множественные тромбы (стрелки). Окрашивание: гематоксилин и эозин. Увеличение: - $\times 100$.

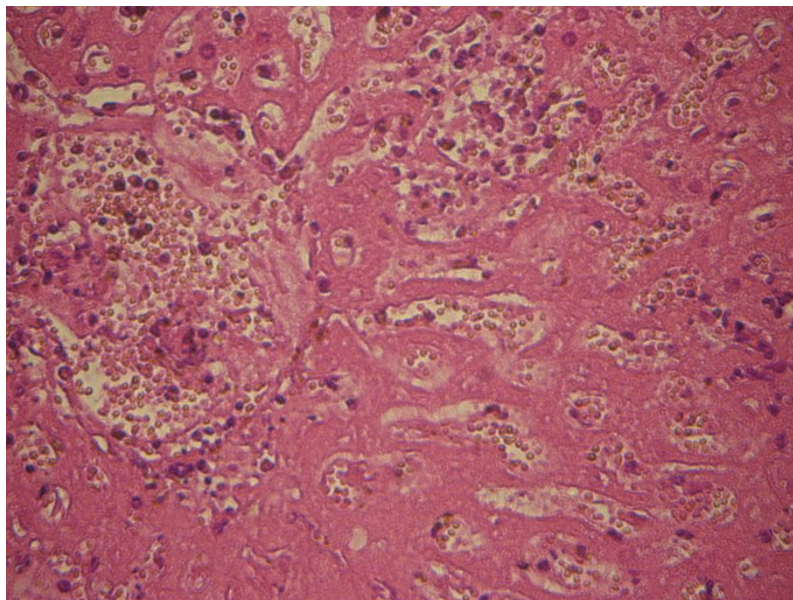


Рисунок 12.9

Рисунок 12.9 - Модель 5266, терминальная стадия сепсиса. Участок некроза паренхимы печени. Окрашивание: – гематоксилин и эозин. Увеличение: $\times 400$.

3.3.4.1 Результаты гистохимической реакции печени на содержание внутриядерного и общего белка

Результаты проведенной гистохимической реакции на содержание внутриядерного и общего белка указали на снижение белоксинтезирующей функции гепатоцитов при сепсисе в моделях 1623 и 5266.

3.3.4.2 Анализ показателей высева из гомогенатов печени и крови

Проведенное исследование показателей микробиологического высева Ра в динамике сепсиса (модель 1623) выявило достоверное повышение высева из гомогенатов печени по сравнению с высева из крови практически на всех сроках сепсиса, что можно связывать с застойным характером кровотока в печени и

предположительной его разницей с кровотоком в периферических сосудах, из которых забиралась кровь для посева. На более поздних стадиях (от 240 до 1440 мин) эти показатели были практически равными, очевидно, из-за более выраженных деструктивных изменений гепатоцитов и связанного с этим более массовым выбросом Ра из гепатоцитов в кровь (Таблица 14), (Рисунок 13.1).

Таблица 14 - Результаты микробиологического посева Ра 1623 и Ра 5266 из гомогенатов печени и крови

Время после заражения	Модель 1623	Модель 5266
	Печень/Кровь $M \pm m; \log_{10}(\text{КОЕ/г; КОЕ/мл})$	Печень/Кровь $M \pm m; \log_{10}(\text{КОЕ/г; КОЕ/мл})$
15 '	$5,40 \times 10^3 \pm 7,43 \times 10^2; \lg(3,73 \pm 2,87) /$ $2,01 \times 10^4 \pm 7,19 \times 10^2; \lg(4,30 \pm 2,86)^*$	$2,6 \times 10^3 \pm 1,25 \times 10^2; \lg(3,41 \pm 2,09) /$ $3,90 \times 10^4 \pm 9,38 \times 10^2; \lg(4,59 \pm 2,97)^*$
30 '	$2,80 \times 10^6 \pm 4,44 \times 10^3; \lg(6,45 \pm 3,67) /$ $3,6 \times 10^4 \pm 9,70 \times 10^2; \lg(4,56 \pm 2,99)^*$	$8,6 \times 10^4 \pm 2,12 \times 10^3; \lg(4,93 \pm 3,33) /$ $2,10 \times 10^6 \pm 3,7 \times 10^4; \lg(6,32 \pm 4,57)^*$
60 '	$8,63 \times 10^5 \pm 3,52 \times 10^3; \lg(5,94 \pm 3,55) /$ $2,33 \times 10^4 \pm 8,92 \times 10^2; \lg(4,37 \pm 2,95)^*$	$2,9 \times 10^5 \pm 2,2 \times 10^3; \lg(5,46 \pm 3,35) /$ $3,50 \times 10^6 \pm 3,03 \times 10^4; \lg(6,54 \pm 4,48)^*$
120 '	$4 \times 10^5 \pm 3,54 \times 10^3; \lg(5,60 \pm 3,55) /$ $3,80 \times 10^3 \pm 9,4 \times 10^1; \lg(3,58 \pm 1,97)^*$	$4,3 \times 10^5 \pm 2,5 \times 10^3; \lg(5,63 \pm 3,39) /$ $7,60 \times 10^6 \pm 1,3 \times 10^5; \lg(6,88 \pm 5,11)^*$
180 '	$4,41 \times 10^5 \pm 8,02 \times 10^3; \lg(5,64 \pm 3,90) /$ $1,3 \times 10^3 \pm 2,9 \times 10^1; \lg(3,11 \pm 1,46)^*$	$1,85 \times 10^5 \pm 4 \times 10^2; \lg(5,2 \pm 2,60) /$ $3,96 \times 10^4 \pm 6,39 \times 10^2; \lg(4,60 \pm 2,81)^*$
240 '	$3,80 \times 10^5 \pm 1,4 \times 10^4; \lg(5,58 \pm 4,15) /$ $7,5 \times 10^5 \pm 3,3 \times 10^4; \lg(5,88 \pm 4,52)^*$	$1,4 \times 10^5 \pm 9,5 \times 10^3; \lg(5,15 \pm 3,98) /$ $4 \times 10^4 \pm 2,3 \times 10^3; \lg(4,60 \pm 3,36)^*$
480 '	$7,40 \times 10^5 \pm 1,3 \times 10^3; \lg(5,87 \pm 3,10) /$ $2,4 \times 10^4 \pm 2,34 \times 10^2; \lg(4,38 \pm 2,37)^*$	$2,10 \times 10^5 \pm 3,75 \times 10^3; \lg(5,3 \pm 3,57) /$ $2,06 \times 10^4 \pm 3,15 \times 10^2; \lg(4,31 \pm 2,49)^*$
1440 '	$1,50 \times 10^5 \pm 2,9 \times 10^3; \lg(5,18 \pm 3,46) /$ $2,5 \times 10^5 \pm 8,2 \times 10^3; \lg(5,40 \pm 3,91)^*$	$1,40 \times 10^6 \pm 4,4 \times 10^4; \lg(6,15 \pm 4,64) /$ $1,50 \times 10^6 \pm 1,7 \times 10^5; \lg(6,17 \pm 5,23)^{**}$

Данные представлены $M \pm m$ – среднеарифметическое значение $\pm$ стандартная ошибка

* различия между группами (печень и кровь) статистически достоверны: $p < 0,01$.

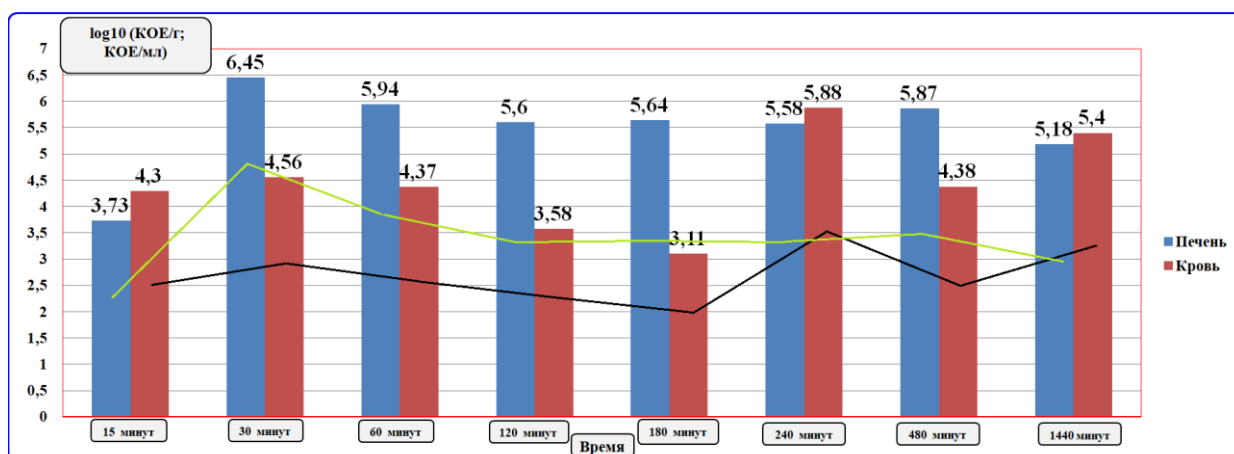


Рисунок 13.1 - Динамика показателей микробиологического высева Ра 1623 из крови и гомогенатов печени

В модели 5266 (в отличие от модели 1623) показатели высева Ра из гомогенатов печени уступали показателям в модели 1623, что трактовать сложно, поскольку поражение печени в модели 5266 было более глубоким, чем в модели 1623 (Таблица 14), (Рисунок 13.2).

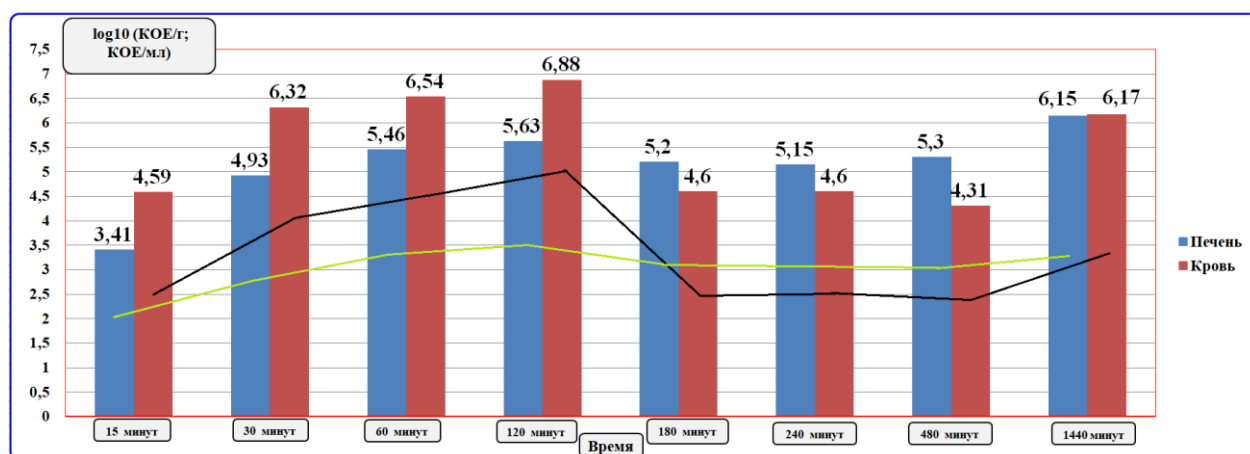


Рисунок 13.2 - Динамика показателей микробиологического высева Ра 5266 из крови и гомогенатов печени

На ультраструктурном уровне в крови и гепатоцитах разрушенной части паренхимы печени присутствовали *Pseudomonas aeruginosa*.

3.3.5 Гистологическая характеристика почек

Морфологические изменения почек у животных в модели 5266 были значительно менее выраженными, чем изменения печени, и менее глубокими по сравнению с изменениями почек у животных в модели 1623. В модели 5266 присутствовали: деструкция эпителия в небольшой части проксимальных канальцев, расположенных на периферии коркового вещества, и сохранная структура подавляющего большинства других проксимальных канальцев. Дистальные канальцы и собирательные трубочки практически не были изменены. Почечные тельца характеризовались снижением кровенаполнения капиллярных клубочков.

Реактивные изменения почечных телец и канальцев нефронов у животных в модели 1623 были выраженными. По сравнению с тельцами фильтрующих нефронов контрольных животных (Рисунок 14.1), тельца корковых и промежуточных нефронов в модели 1623 на терминальной стадии были мелкими и деформированными, присутствовал пикноз клеточных ядер, кровенаполнение капилляров клубочков было резко сниженным (Рисунок 14.2). На месте многих почечных телец оставались лишь небольшие скопления мелких клеток с пикнотическими ядрами, просветы капилляров и полости капсул Шумлянского не были различимы.

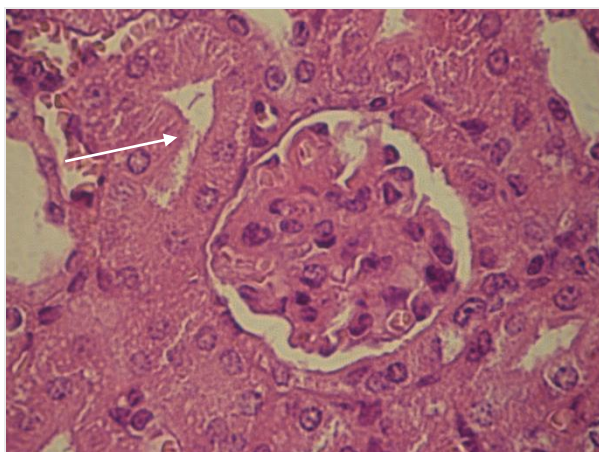


Рисунок 14.1

Рисунок 14.1 – Контрольное животное. Фрагмент почки с тельцем фильтрующего нефрона. Сохранная структура тельца и проксимального канальца (стрелка) фильтрующего нефрона. Окрашивание: – гематоксилин и эозин. Увеличение: $\times 400$

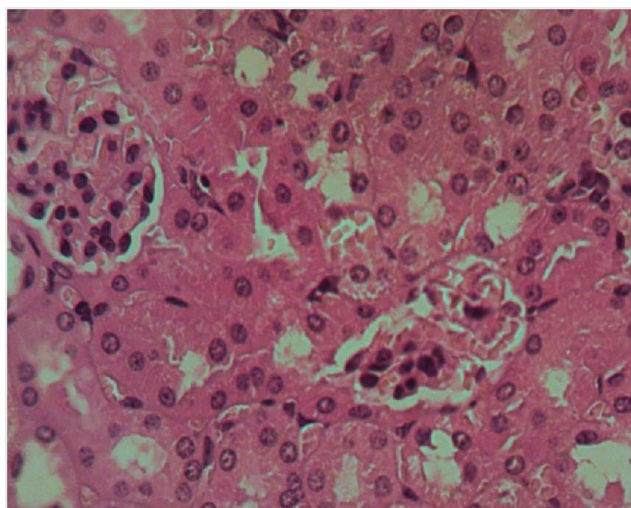


Рисунок 14.2

Рисунок 14.2 - Модель 1623, терминальная стадия сепсиса. Фрагмент почки: деформация телец корковых нефронов, пикноз клеточных ядер, отсутствие кровенаполнения капиллярных клубочков. Окрашивание: – гематоксилин и эозин. Увеличение: – $\times 400$.

В почечных тельцах, лежащих в глубоких слоях коры, (в юкстамедуллярных нефронах) ядра клеток имели светлую структуру эухроматина, капилляры были расширены и заполнены кровью (Рисунок 14.3).

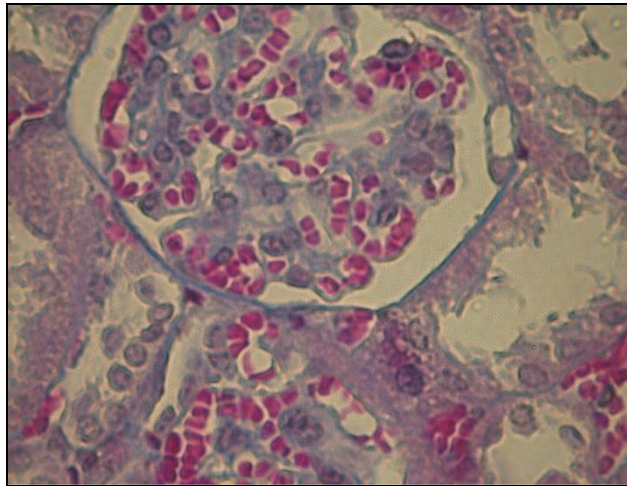


Рисунок 14.3

Рисунок 14.3 – Модель 1623, терминальная стадия сепсиса. Почечное тельце юкстамедуллярного нефрона: выраженное кровенаполнение капиллярного клубочка. Окрашивание: по Маллори, Увеличение: $\times 400$.

Стенки проксимальных канальцев, расположенных субкапсулярно и принадлежащих предположительно корковым нефронам, в модели 1623 были разрушены (Рисунок 14.4), что в литературе обозначается термином «канальцевый некроз», а при субмикроскопическом анализе в них регистрировалась разная степень повреждения эпителиоцитов (от деструктивных изменений щеточной каемки до полного разрушения клеток). Очаги лейкоцитарной инфильтрации в препаратах септических почек рассматриваемой модели обнаруживались редко и не у всех животных. В просветах более глубоко лежащих в корковом веществе и на светооптическом уровне практически не измененных проксимальных канальцев (принадлежащих промежуточным нефронам) находились окрашенные эозином массы белка, которые частично или полностью перекрывали просветы (Рисунок 14.5, стрелки). В цитоплазме эпителиоцитов канальцев обнаруживались неизменные формы Ра, а при электронной микроскопии регистрировались деструктивные изменения микроворсинок щеточной каемки.

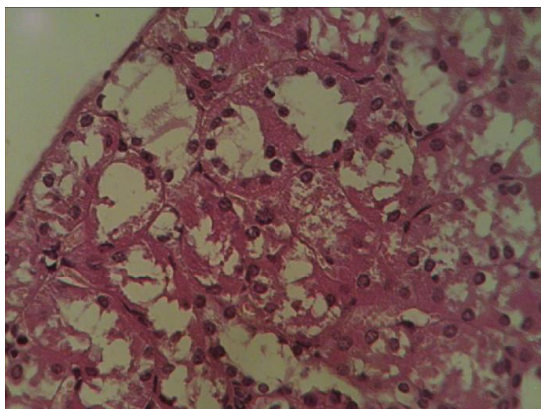


Рисунок 14.4

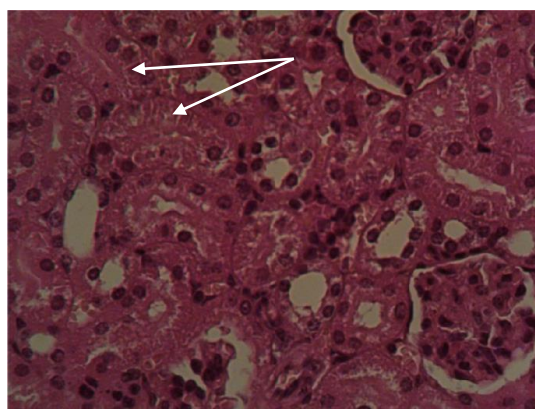


Рисунок 14.5

Рисунок 14.4. – Модель 1623, терминальная стадия сепсиса. Разрушение субкапсулярно расположенных проксимальных канальцев нефронов (корковых нефронов). Окрашивание: - гематоксилин и эозин. Увеличение: - $\times 200$.

Рисунок 14.5 - Модель 1623, терминальная стадия сепсиса. Сохранность более глубоко расположенных проксимальных канальцев (канальцев промежуточных нефронов) с признаками нарушения реабсорбции белка (стрелки). Окрашивание: - гематоксилин и эозин. Увеличение: - $\times 200$.

Кроме деструктивных изменений проксимальных канальцев, у животных в модели 1623 на терминальной стадии отмечалась деструкция дистальных канальцев, петель Генле и собирательных трубочек.

Вены и артерии мозгового вещества почек септических животных выглядели расширенными и кровенаполненными, а в перикапиллярных пространствах интерстиция определялось присутствие белковых масс.

Показатели микробиологического высева Ра из гомогенатов почек в динамике сепсиса в модели 1623 в основном превосходили аналогичные показатели высевок из крови (Таблица 15), (Рисунок 15.1). В модели 5266 показатели высевок Ра из гомогенатов почек были ниже высевок из крови, вплоть до 6 часов после заражения (Рисунок 15.2).

3.3.5.1 Анализ показателей высевов из почек и крови

Таблица 15 - Результаты микробиологического посева Ра 1623 и Ра 5266 из гомогенатов почек и крови.

Время после заражения	Модель 1623	Модель 5266
	Почки/Кровь $M \pm m$; $\log_{10}(\text{КОЕ/г; КОЕ/мл})$	Почки/Кровь $M \pm m$; $\log_{10}(\text{КОЕ/г; КОЕ/мл})$
15 '	$8,20 \times 10^3 \pm 5,85 \times 10^2$; $\lg(3,91 \pm 2,77)$ / $2,01 \times 10^4 \pm 7,19 \times 10^2$; $\lg(4,30 \pm 2,86)^*$	$5,30 \times 10^3 \pm 1,73 \times 10^2$; $\lg(3,72 \pm 2,23)$ / $3,90 \times 10^4 \pm 9,38 \times 10^2$; $\lg(4,59 \pm 2,97)^*$
30 '	$2,04 \times 10^6 \pm 4,6 \times 10^4$; $\lg(6,31 \pm 4,66)$ / $3,6 \times 10^4 \pm 9,70 \times 10^2$; $\lg(4,56 \pm 2,99)^*$	$2,90 \times 10^5 \pm 2,70 \times 10^4$; $\lg(5,46 \pm 4,43)$ / $2,10 \times 10^6 \pm 3,7 \times 10^4$; $\lg(6,32 \pm 4,57)^*$
60 '	$9,30 \times 10^4 \pm 2,3 \times 10^3$; $\lg(4,97 \pm 3,36)$ / $2,33 \times 10^4 \pm 8,92 \times 10^2$; $\lg(4,37 \pm 2,95)^*$	$2,90 \times 10^4 \pm 3,65 \times 10^2$; $\lg(4,46 \pm 2,56)$ / $3,50 \times 10^6 \pm 3,03 \times 10^4$; $\lg(6,54 \pm 4,48)^*$
120 '	$8,80 \times 10^5 \pm 1,74 \times 10^4$; $\lg(5,94 \pm 3,25)$ / $3,80 \times 10^3 \pm 94 \times 10^1$; $\lg(3,58 \pm 1,97)^*$	$3,03 \times 10^5 \pm 1,09 \times 10^4$; $\lg(5,48 \pm 4,04)$ / $7,60 \times 10^6 \pm 1,3 \times 10^5$; $\lg(6,88 \pm 5,11)^*$
180 '	$3,97 \times 10^5 \pm 5,2 \times 10^3$; $\lg(5,60 \pm 3,72)$ / $1,3 \times 10^3 \pm 2,9 \times 10^1$; $\lg(3,11 \pm 1,46)^*$	$7,70 \times 10^3 \pm 2,20 \times 10^3$; $\lg(3,89 \pm 2,34)$ / $3,96 \times 10^4 \pm 6,39 \times 10^2$; $\lg(4,60 \pm 2,81)^*$
240 '	$5,03 \times 10^5 \pm 5,4 \times 10^4$; $\lg(5,7 \pm 4,73)$ / $7,5 \times 10^5 \pm 3,3 \times 10^4$; $\lg(5,88 \pm 4,52)^{**}$	$5,10 \times 10^5 \pm 3,5 \times 10^4$; $\lg(5,71 \pm 4,54)$ / $4 \times 10^4 \pm 2,3 \times 10^3$; $\lg(4,60 \pm 3,36)^*$
480 '	$5,80 \times 10^6 \pm 1,9 \times 10^4$; $\lg(6,76 \pm 4,28)$ / $2,4 \times 10^4 \pm 2,34 \times 10^2$; $\lg(4,38 \pm 2,37)^*$	$1,13 \times 10^5 \pm 3,36 \times 10^2$; $\lg(5,05 \pm 2,53)$ / $2,06 \times 10^4 \pm 3,15 \times 10^2$; $\lg(4,31 \pm 2,49)^*$
1440 '	$5,40 \times 10^5 \pm 3,1 \times 10^4$; $\lg(5,73 \pm 4,49)$ / $2,5 \times 10^5 \pm 8,2 \times 10^3$; $\lg(5,40 \pm 3,91)^{**}$	$5,40 \times 10^6 \pm 5,6 \times 10^5$; $\lg(6,73 \pm 5,75)$ / $1,50 \times 10^6 \pm 1,7 \times 10^5$; $\lg(6,17 \pm 5,23)^*$

Данные представлены $M \pm m$ – среднеарифметическое значение $\pm$ стандартная ошибка.

* различия между группами высевов (почки и кровь) статистически достоверны: $p < 0,01$.

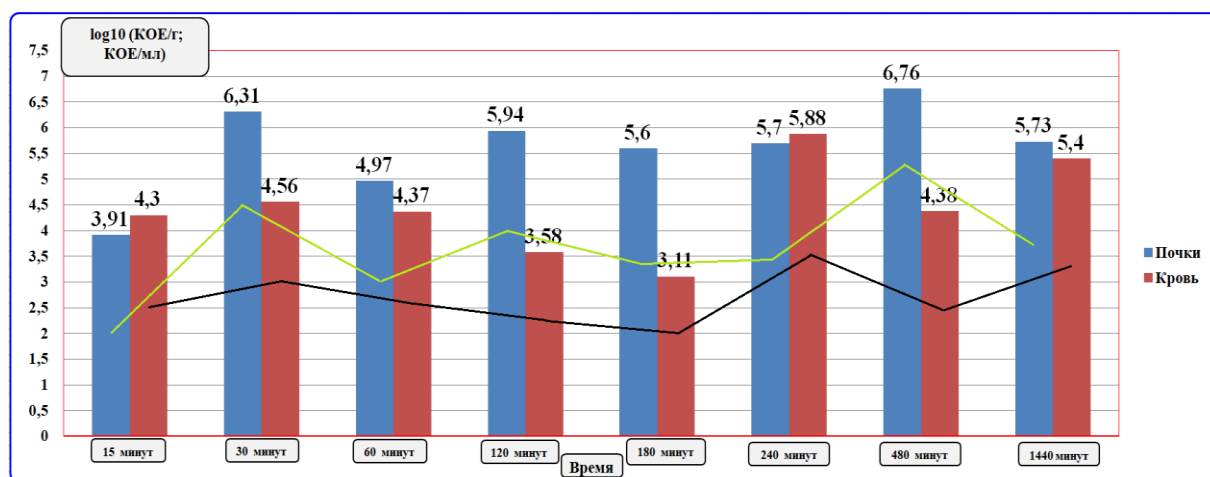


Рисунок 15.1 - Динамика показателей микробиологического высева Ра 1623 из крови и гомогенатов почек

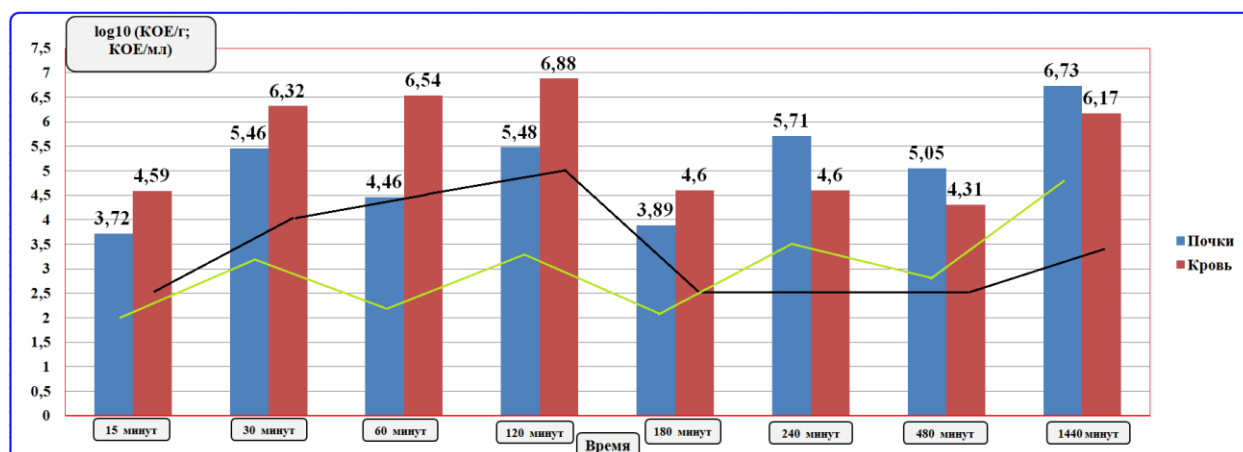


Рисунок 15.2 - Динамика показателей микробиологического высева Ра 5266 из крови и гомогенатов почек

3.3.6 Бактериологический анализ высеваемости *P. aeruginosa* из крови, перитонеальной жидкости и гомогенатов органов

Результативность высева *P. aeruginosa* из крови животных в обеих моделях оказалась высокой уже в первые 15 мин после введения Ра в брюшную полость и составила: в модели 1623 – $2,01 \times 10^4 \pm 7,2 \times 10^2$, в модели 5266 – $3,90 \times 10^4 \pm 9,38 \times 10^2$.

Высокому уровню высевок Ра 1623 и Ра 5266 в первые 15 мин соответствовало зеркальное падение высевок из перитонеальной жидкости (в модели 1623 – до $1,34 \times 10^5 \pm 6,22 \times 10^3$, в модели 5266 – до $4,03 \times 10^6 \pm 3,7 \times 10^4$). К терминальной стадии сепсиса происходило еще большее сближение показателей высевок из крови (в модели 1623 – $2,5 \times 10^5 \pm 8,2 \times 10^3$, в модели 5266 – $1,50 \times 10^6 \pm 1,7 \times 10^5$) и перитонеальной жидкости (в модели 1623 – $7,29 \times 10^5 \pm 6,32 \times 10^2$, в модели 5266 – $1,90 \times 10^5 \pm 4 \times 10^2$).

Из гомогенатов органов максимум высевок достигался в первый час после заражения в модели 1623 и через 1 час – в модели 5266. К терминальной стадии показатели высевок из органов приближались к единой высокой отметке в обеих моделях (Рисунок 16.1), (Рисунок 16.2), (Таблица 16), (Таблица 17).

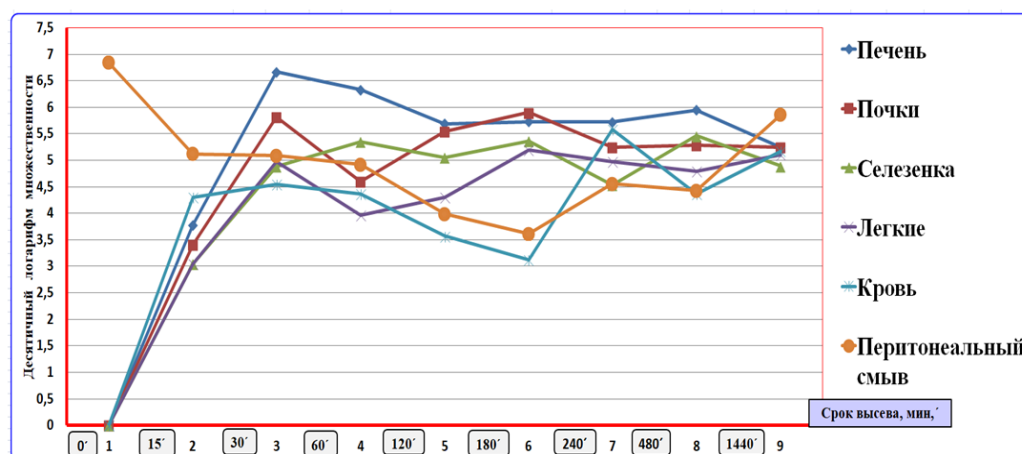


Рисунок 16.1 - Высеваемость *P. aeruginosa* 1623 из перитонеальной жидкости, крови и гомогенатов органов в динамике сепсиса (по оси ординат – десятичный логарифм множественности, по оси абсцисс – время заражения в минутах: от 0 до 1440 мин [24 часа])

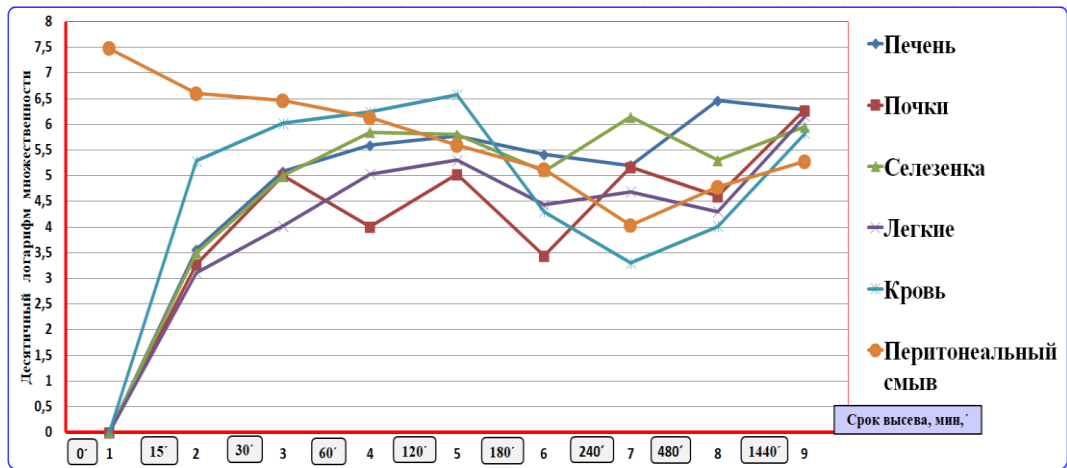


Рисунок 16.2 - Высеваемость *P. aeruginosa* 5266 из перитонеальной жидкости, крови и гомогенатов органов в динамике сепсиса (по оси ординат – десятичный логарифм множественности, по оси абсцисс – время заражения в минутах: от 0 до 1440 мин [24 часа])

Таблица 16 - Показатели высеваемости Ра 1623 из перитонеальной жидкости, крови и гомогенатов органов

Время	Печень	Почки	Селезенка	Легкие	Кровь	Перитон. смыв
15'	$5,40 \times 10^3 \pm 7,43 \times 10^2$; lg(3,73 $\pm$ 2,87)	$8,20 \times 10^3 \pm 5,85 \times 10^2$; lg(3,91 $\pm$ 2,77)	$1,10 \times 10^4 \pm 8,04 \times 10^2$; lg (4,04 $\pm$ 2,91)	$5,04 \times 10^3 \pm 3,04 \times 10^2$; lg (3,70 $\pm$ 2,48)	$2,01 \times 10^4 \pm 7,2 \times 10^2$; lg(4,30 $\pm$ 2,86)	$1,34 \times 10^5 \pm 6,22 \times 10^3$; lg(5,13 $\pm$ 3,79)
30'	$2,80 \times 10^6 \pm 4,44 \times 10^3$; lg (6,45 $\pm$ 3,67)	$2,04 \times 10^6 \pm 4,6 \times 10^4$; lg(6,31 $\pm$ 4,66)	$8,30 \times 10^5 \pm 3,2 \times 10^4$; lg (5,92 $\pm$ 4,51)	$4,24 \times 10^5 \pm 1,32 \times 10^5$; lg(5,63 $\pm$ 5,12)	$3,6 \times 10^4 \pm 9,70 \times 10^2$; lg(4,56 $\pm$ 2,99)	$1,23 \times 10^5 \pm 4,34 \times 10^3$; lg(5,09 $\pm$ 3,67)
60'	$8,63 \times 10^5 \pm 3,52 \times 10^3$; lg (5,94 $\pm$ 3,55)	$9,30 \times 10^4 \pm 2,3 \times 10^3$; lg (4,97 $\pm$ 3,36)	$3,27 \times 10^5 \pm 6,4 \times 10^3$; lg (5,51 $\pm$ 3,81)	$4,3 \times 10^4 \pm 8,37 \times 10^2$; lg(4,63 $\pm$ 2,92)	$2,33 \times 10^4 \pm 8,9 \times 10^2$; lg(4,37 $\pm$ 2,95)	$8,30 \times 10^4 \pm 7,30 \times 10^2$; lg (4,92 $\pm$ 2,86)
120'	$4 \times 10^5 \pm 3,54 \times 10^3$; lg (5,60 $\pm$ 3,55)	$8,80 \times 10^5 \pm 1,74 \times 10^4$; lg (5,94 $\pm$ 3,25)	$1,11 \times 10^6 \pm 1,7 \times 10^3$; lg (6,05 $\pm$ 3,23)	$9 \times 10^4 \pm 2,95 \times 10^2$; lg (4,96 $\pm$ 2,47)	$3,80 \times 10^3 \pm 9,4 \times 10^1$; lg (3,58 $\pm$ 1,97)	$9,8 \times 10^3 \pm 4 \times 10^1$; lg (3,99 $\pm$ 1,6)
180'	$4,41 \times 10^5 \pm 8,02 \times 10^3$; lg(5,64 $\pm$ 3,90)	$3,97 \times 10^5 \pm 5,2 \times 10^3$; lg (5,60 $\pm$ 3,72)	$2,30 \times 10^6 \pm 2,12 \times 10^4$; lg (6,36 $\pm$ 4,33)	$7,53 \times 10^5 \pm 1,8 \times 10^3$; lg(5,88 $\pm$ 3,26)	$1,3 \times 10^3 \pm 2,9 \times 10^1$; lg (3,11 $\pm$ 1,46)	$4,1 \times 10^3 \pm 2,3 \times 10^1$; lg(3,61 $\pm$ 1,36)
240'	$3,80 \times 10^5 \pm 1,4 \times 10^4$; lg (5,58 $\pm$ 4,15)	$5,03 \times 10^5 \pm 5,4 \times 10^4$; lg(5,7 $\pm$ 4,73)	$2,70 \times 10^5 \pm 3,6 \times 10^4$; lg (5,43 $\pm$ 4,56)	$4,2 \times 10^5 \pm 2,4 \times 10^3$; lg (5,62 $\pm$ 3,38)	$7,5 \times 10^5 \pm 3,3 \times 10^4$; lg (5,88 $\pm$ 4,52)	$3,88 \times 10^4 \pm 1,3 \times 10^3$; lg (4,59 $\pm$ 3,11)
480'	$7,40 \times 10^5 \pm 1,3 \times 10^3$; lg(5,87 $\pm$ 3,10)	$5,80 \times 10^6 \pm 1,9 \times 10^4$; lg(6,76 $\pm$ 4,28)	$2,82 \times 10^6 \pm 1,06 \times 10^4$; lg (6,45 $\pm$ 4,03)	$2,9 \times 10^5 \pm 2,46 \times 10^3$; lg (5,46 $\pm$ 3,39)	$2,4 \times 10^4 \pm 2,34 \times 10^2$; lg (4,38 $\pm$ 2,37)	$2,70 \times 10^4 \pm 9,6 \times 10^2$; lg(4,43 $\pm$ 2,98)
1440'	$1,50 \times 10^5 \pm 2,9 \times 10^3$; lg (5,18 $\pm$ 3,46)	$5,40 \times 10^5 \pm 3,1 \times 10^4$; lg (5,73 $\pm$ 4,49)	$5 \times 10^5 \pm 3,2 \times 10^4$; lg (5,70 $\pm$ 4,51)	$6,1 \times 10^5 \pm 5,6 \times 10^4$; lg (5,79 $\pm$ 4,75)	$2,5 \times 10^5 \pm 8,2 \times 10^3$; lg (5,40 $\pm$ 3,91)	$7,29 \times 10^5 \pm 6,32 \times 10^2$; lg (5,86 $\pm$ 2,80)

*Данные представлены: для гомогенатов органов - КОЕ/г ;

log₁₀(КОЕ/г); для крови и перитонеальной жидкости - КОЕ/мл ; log₁₀(КОЕ/мл)

Таблица 17 - Показатели высеваемости Ра 5266 из перитонеальной жидкости, крови и гомогенатов органов

Время	Печень $\log_{10}(\text{КОЕ/г})$	Почки $\log_{10}(\text{КОЕ/г})$	Селезенка $\log_{10}(\text{КОЕ/г})$	Легкие $\log_{10}(\text{КОЕ/г})$	Кровь $\log_{10}(\text{КОЕ/мл})$	Перит. смыв $\log_{10}(\text{КОЕ/мл})$
15'	$2,6 \times 10^3 \pm 1,25 \times 10^2$; $\lg(3,41 \pm 2,09)$	$5,30 \times 10^3 \pm 1,73 \times 10^2$; $\lg(3,72 \pm 2,23)$	$2,40 \times 10^4 \pm 6,24 \times 10^2$; $\lg(4,38 \pm 2,80)$	$5,84 \times 10^3 \pm 1,53 \times 10^2$; $\lg(3,76 \pm 2,18)$	$3,9 \times 10^4 \pm 9,38 \times 10^2$; $\lg(4,59 \pm 2,97)$	$4,03 \times 10^6 \pm 3,7 \times 10^4$; $\lg(6,61 \pm 4,57)$
30'	$8,6 \times 10^4 \pm 2,12 \times 10^3$; $\lg(4,93 \pm 3,33)$	$2,90 \times 10^5 \pm 2,70 \times 10^4$; $\lg(5,46 \pm 4,43)$	$7,80 \times 10^5 \pm 3,03 \times 10^4$; $\lg(5,89 \pm 4,48)$	$4,70 \times 10^4 \pm 8,47 \times 10^2$; $\lg(4,67 \pm 2,93)$	$2,10 \times 10^6 \pm 3,7 \times 10^4$; $\lg(6,32 \pm 4,57)$	$2,97 \times 10^6 \pm 1,9 \times 10^5$; $\lg(6,47 \pm 5,28)$
60'	$2,9 \times 10^5 \pm 2,2 \times 10^3$; $\lg(5,46 \pm 3,35)$	$2,90 \times 10^4 \pm 3,65 \times 10^2$; $\lg(4,46 \pm 2,56)$	$5,40 \times 10^6 \pm 4,06 \times 10^4$; $\lg(6,73 \pm 4,61)$	$4,90 \times 10^5 \pm 2,6 \times 10^4$; $\lg(5,69 \pm 4,41)$	$3,5 \times 10^6 \pm 3,03 \times 10^4$; $\lg(6,54 \pm 4,48)$	$1,38 \times 10^6 \pm 3,2 \times 10^4$; $\lg(6,14 \pm 4,51)$
120'	$4,3 \times 10^5 \pm 2,5 \times 10^3$; $\lg(5,63 \pm 3,39)$	$3,03 \times 10^5 \pm 1,09 \times 10^4$; $\lg(5,48 \pm 4,04)$	$4,80 \times 10^6 \pm 3,6 \times 10^4$; $\lg(6,68 \pm 4,56)$	$9 \times 10^5 \pm 2,9 \times 10^4$; $\lg(5,95 \pm 4,46)$	$7,60 \times 10^6 \pm 1,3 \times 10^5$; $\lg(6,88 \pm 5,11)$	$3,98 \times 10^5 \pm 5,28 \times 10^3$; $\lg(5,60 \pm 3,72)$
180'	$1,85 \times 10^5 \pm 4 \times 10^2$; $\lg(5,2 \pm 2,60)$	$7,70 \times 10^3 \pm 2,20 \times 10^3$; $\lg(3,89 \pm 2,34)$	$9,54 \times 10^5 \pm 1,8 \times 10^4$; $\lg(5,98 \pm 4,25)$	$1,23 \times 10^5 \pm 1,2 \times 10^3$; $\lg(5,09 \pm 3,08)$	$3,96 \times 10^4 \pm 6,4 \times 10^2$; $\lg(4,60 \pm 2,81)$	$1,33 \times 10^5 \pm 2,4 \times 10^3$; $\lg(5,12 \pm 3,38)$
240'	$1,4 \times 10^5 \pm 9,5 \times 10^3$; $\lg(5,15 \pm 3,98)$	$5,10 \times 10^5 \pm 3,5 \times 10^4$; $\lg(5,71 \pm 4,54)$	$8,50 \times 10^6 \pm 4,9 \times 10^4$; $\lg(6,93 \pm 4,69)$	$2,40 \times 10^5 \pm 3,8 \times 10^3$; $\lg(5,38 \pm 3,58)$	$4 \times 10^4 \pm 2,3 \times 10^3$; $\lg(4,60 \pm 3,36)$	$1,09 \times 10^4 \pm 2,59 \times 10^2$; $\lg(4,04 \pm 2,41)$
480'	$2,10 \times 10^5 \pm 3,75 \times 10^3$; $\lg(5,3 \pm 3,57)$	$1,13 \times 10^5 \pm 3,36 \times 10^2$; $\lg(5,05 \pm 2,53)$	$1,52 \times 10^6 \pm 1,5 \times 10^4$; $\lg(6,18 \pm 4,18)$	$9 \times 10^4 \pm 7,58 \times 10^2$; $\lg(4,95 \pm 2,88)$	$2,1 \times 10^4 \pm 3,15 \times 10^2$; $\lg(4,31 \pm 2,49)$	$6,01 \times 10^4 \pm 5,7 \times 10^1$; $\lg(4,78 \pm 1,76)$
1440'	$1,40 \times 10^6 \pm 4,4 \times 10^4$; $\lg(6,15 \pm 4,64)$	$5,40 \times 10^6 \pm 5,6 \times 10^5$; $\lg(6,73 \pm 5,75)$	$7,10 \times 10^6 \pm 6,4 \times 10^5$; $\lg(6,85 \pm 5,81)$	$5,90 \times 10^6 \pm 5,7 \times 10^5$; $\lg(6,77 \pm 5,75)$	$1,50 \times 10^6 \pm 1,7 \times 10^5$; $\lg(6,17 \pm 5,23)$	$1,90 \times 10^5 \pm 4 \times 10^2$; $\lg(5,28 \pm 1,60)$

*Данные представлены: для гомогенатов органов - КОЕ/г ;
 $\log_{10}(\text{КОЕ/г})$; для крови и перитонеальной жидкости - КОЕ/мл $\log_{10}(\text{КОЕ/мл})$

3.3.7 Признаки взаимодействия *P. aeruginosa* с эритроцитами

В обеих моделях при электронной микроскопии крови вокруг Ра 1623 и Ра 5266, а также в местах их контактов с эритроцитами зарегистрировано исчезновение мелкодисперсной физиологической ультраструктуры плазмы крови. Косвенно это может означать влияние продуктов жизнедеятельности Ра на ультраструктурную текстуру плазмы, создаваемую белковыми молекулами. Зарегистрировано также образование эритроцитами множественных «выростов» в направлении расположения Ра 1623 и Ра 5266 и превращение эритроцитов в стареющие формы – эхиноциты (Рисунок 17.1), (Рисунок 17.2) Направленность таких «выростов» в сторону Ра 1623 и Ра 5266 – указывает на возможную причинно - следственную связь между их формированием и действием факторов патогенности, выделяемых возбудителем. Можно полагать, что скелетная архитектура стареющих форм эритроцитов не обеспечивает необходимые Нб-удерживающие свойства, чем объясняется повышение уровня свободного Нб при сепсисе, отмечаемое в литературе [54].

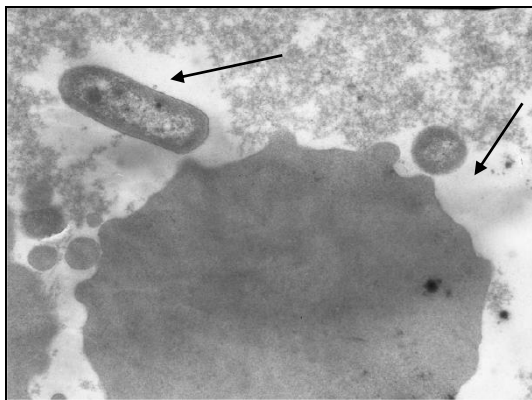


Рисунок 17.1

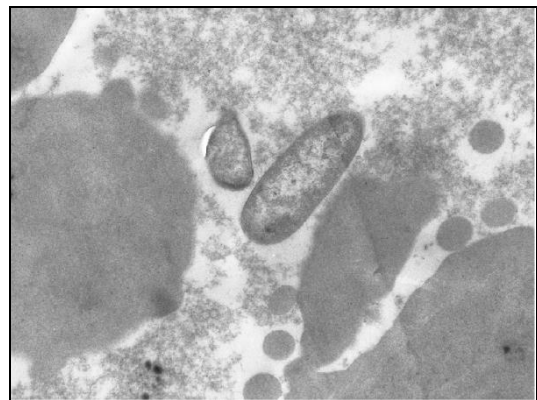


Рисунок 17.2

Рисунок 17.1- Модель 1623, терминальная стадия сепсиса. Исчезновение ультраструктурной текстуры плазмы крови вокруг Ра (стрелки), формирование микровыростов эритроцита. Электроннограмма. Увеличение: $\times 30000$.

Рисунок 17.2 - Модель 5266, терминальная стадия сепсиса. Изменения ультраструктуры плазмы и эритроцитов аналогичны изменениям на рисунке 17.1. Электроннограмма. Увеличение: $\times 30000$.

3.4 Оценка эффективности лекарственного препарата под условным внутрилабораторным названием Астрабионорм

3.4.1 Изучение ингибирующего действия лекарственного препарата под условным внутрилабораторным названием Астрабионорм на ассоциированную со жгутиком *P. aeruginosa* подвижность

Жгутики представляют собой длинные спиралевидные вращающиеся структуры, расположенные на поверхности бактериальной клетки и позволяющие им плавать в жидких и роиться на полутвердых средах [47]. Известно, что жгутики Ра, обеспечивают подвижность, адгезию и инвазию бактерии, а также участвует в формировании биопленок и запуске воспалительной реакции, благодаря распознаванию врожденной иммунной системой человека с Toll - подобным рецептором 5 (TLR5) на клеточной поверхности, либо путем распознавания отдельных субъединиц внутриклеточными цитозольными сенсорами. После адгезии к эпителию Ра может вызывать гибель клеток макроорганизма или проникать в нефагоцитирующие клетки [50, 86, 87]. Интернализация может позволить бактериям проникнуть через слой эпителиальных клеток, достичь кровотока и распространиться в отдаленные участки органов и/или может представлять собой защитный механизм хозяина, который способствует бактериальному клиренсу [50].

Для оценки эффективности действия на подвижность Ра лекарственного средства под условным внутрилабораторным названием Астрабионорм (Астрабионорм, АБ), суточные бульонные культуры штаммов Ра 5266 и Ра 1623 серийными разведениями в стерильном физиологическом растворе довели до количества $\times 10^5$ КОЕ/мл, пересекали на 60 и 120 минутах в LB – бульон с

добавлением и без Астрабионорма. Затем вносили уколом наконечника в объеме 1 мкл в центр чашечной среды BBL™ Motility Test Medium (Рисунок 18)

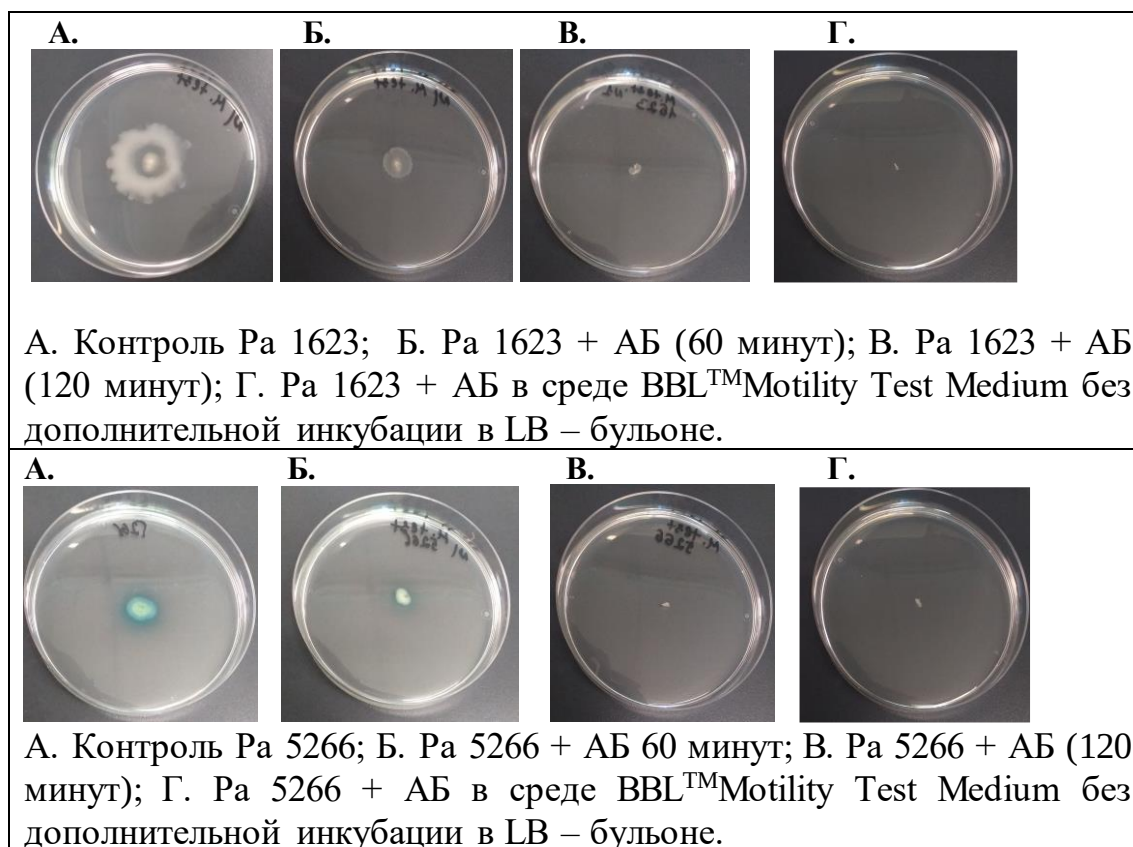


Рисунок 18 - Определение влияния Астрабионорма на подвижность Ра с внесением препарата АБ в среду BBL™ Motility Test Medium

Подвижность и действие Астрабионорма оценивали по диаметру зоны роста через 24 часа. Показатели зон роста двух штаммов в контролях значительно отличались: штамм Ра 1623 был более подвижен, чем штамм Ра 5266.

После обработки препаратом уже на 60' у штамма Ра 1623 отмечалось статистически значимое подавление подвижности в 2,16 раза, в сравнении с контрольной чашкой Петри, а к 120' не было отмечено видимого роста штамма Ра 5266. При этом регистрировался минимальный рост Ра 1623 в месте укола к 120' в среде BBL™ Motility Test Medium, диаметр был в 9,5 раз меньше контрольных значений (Таблица 18).

Таблица 18 - Влияние Астрабионорма на рост Ра на среде Motility Test Medium

Штамм	Диаметр зоны роста Ра (мм, М ± m)		
	До обработки АБ	Через 60 минут	Через 120 минут
Ра 1623	4,47±0,32*	2,07±0,067**	0,47±0,033***
Ра 5266	2,43±0,033♦	0,87±0,088#	Отсутствие роста

Статистически достоверная разница между группой до обработки препаратом АБ (*, ♦) и экспозиции 60 минут (**, #), и экспозиции 120 минут (***); $p \leq 0,01$

3.4.2 Изучение антибактериального действия Астрабионорма

Результаты анализа антимикробного действия Астрабионорма, проведенного после суточной инкубации обоих штаммов Ра на 96-ти луночном планшете, показали достоверное снижение оптической плотности (ОП) культур обоих штаммов (Таблица 19). При контрольном высеве из лунок, содержащих разведение 10^{-1} АБ, регистрировалось полное отсутствие роста. При высеве из лунок, содержащих разведения 10^{-2} АБ и 10^{-3} АБ, был получен рост небольшого числа изолированных колоний – однако, концентрация АБ в разведениях 10^{-2} и 10^{-3} существенно уступает концентрации АБ, применявшейся в рамках разработанной модели сепсиса.

Таблица 19 - Антимикробное действие Астрабионорма. Результаты оптической плотности (ОП) проб после культивирования

Штамм	Разведение		
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
	М ± m	М ± m	М ± m
Ра 1623 + АБ	0,056±0,0028#	0,104±0,0038##	0,483±0,053###
Ра 5266 + АБ	0,088±0,0027•	0,096±0,021••	0,509±0,049•••

Продолжение Таблицы 19

Pa 1623	0,704±0,138*	0,852±0,0054**	0,860±0,032***
Pa 5266	0,712±0,041♦	0,865±0,02♦♦	0,858±0,017♦♦♦
Контроль (АБ в LB – бульоне)	0,058±0,0012	0,047±0,00067	0,054±0,0017

Статистически достоверная разница между группой без препарата Pa 1623 (*, **, ***); Pa 5266 (*♦♦, ♦♦♦) и с препаратом АБ Pa 1623 + АБ (#, ##, ###); Pa 5266 + АБ (♦♦♦, ♦♦♦♦); $p \leq 0,01$.

После суточной инкубации на чашках с заранее внесенным Астрабионормом, роста Pa не было обнаружено ни в одном из образцов. Это свидетельствует как о возможном влиянии на жгутиковый аппарат Pa, так и наличие у Астрабионорма антибактериального эффекта.

3.4.3 Выбор терапевтической схемы введения Астрабионорма для лечения экспериментальных животных

Лекарственное средство вводили внутримышечно в правую лапу в объеме 0,2 мл. Эффективность действия определяли по динамике гибели при заражении штаммами Pa 1623 и Pa 5266 в дозах LD₁₀₀. Эффективную терапевтическую схему препарата АБ (0,073-0,075%) определяли путем введения его мышам по следующим трем схемам (Таблица 20), (Таблица 21). Проверка токсического эффекта Астрабионорма на организм и оценка местной тканевой реакции в зоне внутримышечной инъекции препарата – негативные последствия не выявлены. Эффективность действия оценивали по динамике гибели животных в течение 6 месяцев наблюдений за ними. Эксперимент был проведен в двух повторах.

Таблица 20 - Показатели выживаемости и гибели животных при сепсисе, вызванном Ра 5266 после введения Астрабионорма

Схема №1

Время, часы	Погибшие		Выжившие	
	Количество	%	Количество	%
Лечение по Схеме №1+ <i>P.aeruginosa</i> 5266, 3×10^7 КОЕ/мышь, LD₁₀₀				
24	10	83,3	2	16,7
48	2	16,7	0	0
Всего	по 12 животных			

Схема №2

Время, часы	Погибшие		Выжившие	
	Количество	%	Количество	%
Лечение по Схеме №2 + <i>P.aeruginosa</i> 5266, 3×10^7 КОЕ/мышь, LD₁₀₀				
24	1	8,3	11	91,7
48	4	33,3	7	58,3
72	2	16,7	5	41,7
96	5	41,7	0	-
Всего	по 12 животных			

Схема №3

Время, часы	Погибшие		Выжившие	
	Количество	%	Количество	%
Лечение по Схеме №3 + <i>P.aeruginosa</i> 5266, 3×10^7 КОЕ/мышь, LD₁₀₀				
24	0	-	12	100
48	0	-	12	100
72	0	-	12	100
Всего	по 12 животных			

Таблица 21 - Показатели выживаемости и гибели животных при сепсисе, вызванном Ра 1623 после введения Астрабионорма.

Схема №1

Время, часы	Погибшие		Выжившие	
	Количество	%	Количество	%
Лечение по Схеме №1+ <i>P.aeruginosa</i> 1623, 7×10^6 КОЕ/мышь, LD₁₀₀				
24	6	50	6	50
48	1	8,3	5	41,7
72	1	8,3	4	33,3
Всего	по 12 животных			

Схема №2

Время, часы	Погибшие		Выжившие	
	Количество	%	Количество	%
Лечение по Схеме №2 + <i>P.aeruginosa</i> 1623, 7×10^6 КОЕ/мышь, LD₁₀₀				
24	1	8,3	11	91,7
48	1	8,3	10	83,3
72	3	16,7	7	58,3
Всего	по 12 животных			

Схема №3

Время, часы	Погибшие		Выжившие	
	Количество	%	Количество	%
Лечение по Схеме №3 + <i>P.aeruginosa</i> 1623, 7×10^6 КОЕ/мышь, LD₁₀₀				
24	0	-	12	100
48	0	-	12	100
72	0	-	12	100
Всего	по 12 животных			

После введения LD₁₀₀ Ра 5266 и Ра 1623 после лечения по схеме №1 (препарат введен через 60 минут после заражения, 240 минут и 480 минут) отмечалась 100% гибель экспериментальных животных при LD₁₀₀ Ра 5266, при LD₁₀₀ Ра 1623 продолжительность жизни составляла 33,3 % к 72 часам.

При схеме №2 (лечение проводили через 60 минут, 180 минут и 360 минут) продолжительность жизни при LD₁₀₀ Ра 5266 составила 41,7% к 72 часам, а к 96 часам все животные погибли. При LD₁₀₀ Ра 1623 к 72 часам – 58,3%.

Изучение эффективности применения АБ относительно выживаемости самцов мышей линии C57Bl/6 показало его антибактериальное и протективное действие по **схеме №3**. При LD₁₀₀ Ра 5266 и Ра 1623, при внутримышечном введении: через 60 минут после заражения, 90 минут, 240 минут, 420 минут, 1440 минут, выживаемость животных составила 100%.

Наблюдения за мышами в течение 6 месяцев после завершения терапии показали, что они были здоровыми (Рисунок 19.1, Рисунок 19.2)

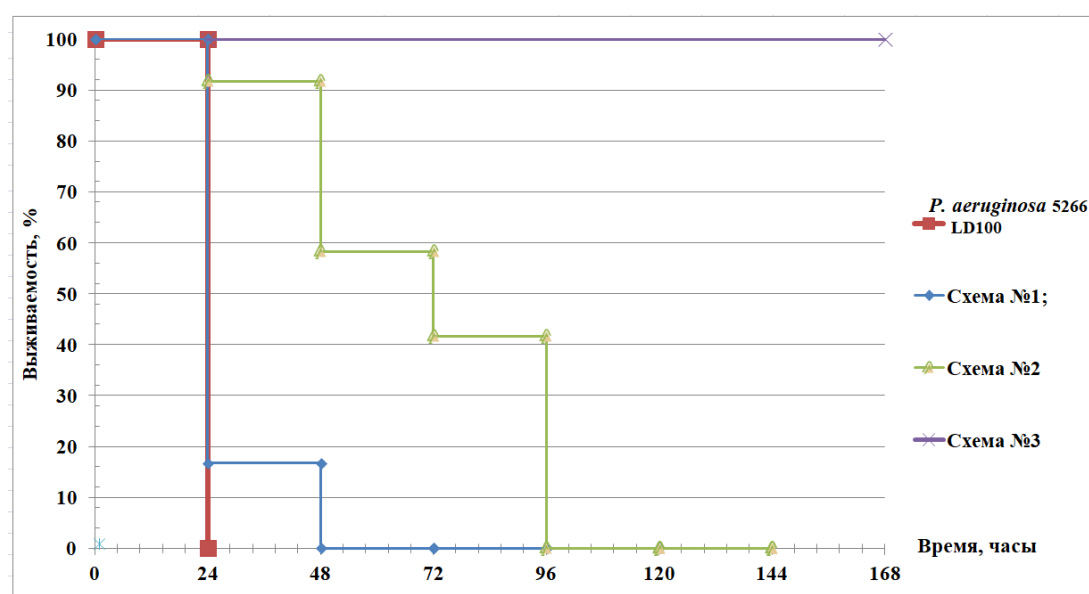


Рисунок 19.1 - Динамика выживаемости мышей от сепсиса, вызванного Ра 5266 (LD₁₀₀) при введении Астрабионорма

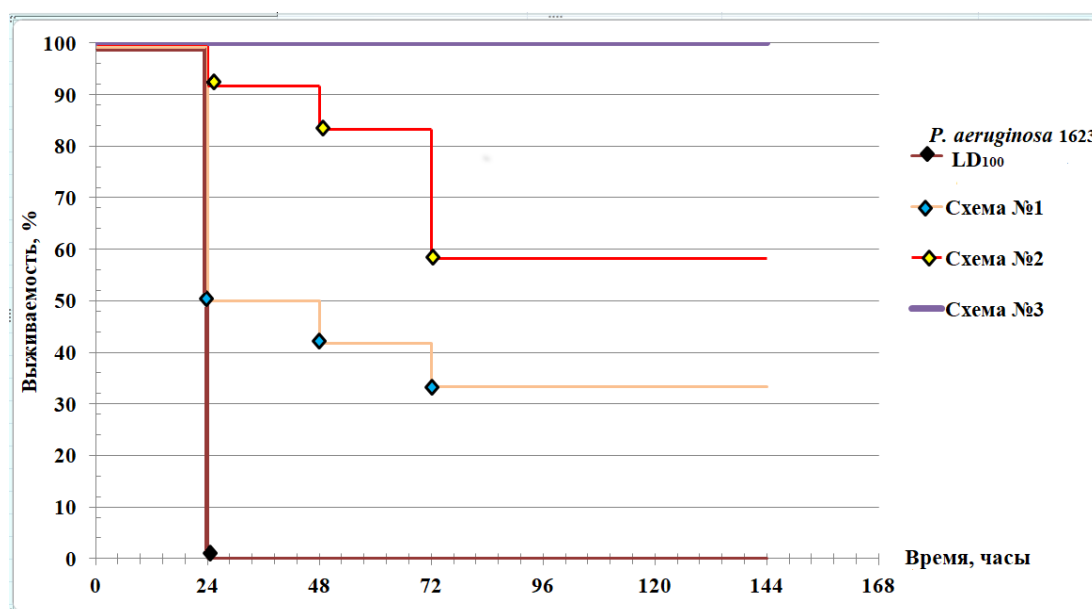


Рисунок 19.2 - Динамика выживаемости мышей от сепсиса, вызванного Ра 1623 (LD₁₀₀) при введении Астрабионорма

3.4.4 Гистологическая характеристика органов, показатели высевов и результаты иммуногистохимического окрашивания срезов органов, после лечения Астрабионормом

У леченых Астрабионормом животных (моделей 1623 и 5266) по сравнению с нелечеными животными зарегистрирован существенно более низкий высеv соответствующих штаммов Ра из крови и гомогенатов органов уже в первые часы после заражения с дальнейшим падением показателей высевов к 24 часам – времени гибели нелеченых животных (Таблица 22), (Таблица 23), (Таблица 24), (Таблица 25), (Таблица 26). На 7-е сутки после инфицирования результаты посевов крови и гомогенатов органов леченых Астрабионормом животных обеих моделей были отрицательны (Таблица 22), (Таблица 23), (Таблица 24), (Таблица 25), (Таблица 26).

Таблица 22 - Показатели микробиологического высева Ра 1623 и Ра 5266 из гомогенатов надпочечников после введения Астрабионорма

Время после заражения		Модель 1623	Модель 5266
		$M \pm m; \log_{10}(\text{КОЕ/г})$	$M \pm m; \log_{10}(\text{КОЕ/г})$
90 '	Сепсис	$1,53 \times 10^2 \pm 1,6 \times 10^1; \lg(2,18 \pm 1,2)^*$	$4,2 \times 10^3 \pm 4,08 \times 10^2; \lg(3,62 \pm 2,6)^{***}$
	Лечение	$2,8 \times 10^3 \pm 4,18 \times 10^2; \lg(3,45 \pm 2,62)^*$	$5,6 \times 10^3 \pm 5,7 \times 10^2; \lg(3,75 \pm 2,76)^{***}$
240 '	Сепсис	$5,3 \times 10^4 \pm 5,3 \times 10^3; \lg(4,72 \pm 3,72)^{**}$	$6,9 \times 10^4 \pm 8,8 \times 10^3; \lg(4,84 \pm 3,94)^{***}$
	Лечение	$1,9 \times 10^4 \pm 2,2 \times 10^3; \lg(4,27 \pm 3,34)^{**}$	$5,7 \times 10^4 \pm 4,0 \times 10^3; \lg(4,76 \pm 3,60)^{***}$
480 '	Сепсис	$1,8 \times 10^4 \pm 1,4 \times 10^3; \lg(4,26 \pm 3,15)^*$	$9,5 \times 10^4 \pm 4,3 \times 10^3; \lg(4,98 \pm 3,63)^*$
	Лечение	$1,6 \times 10^2 \pm 4,5 \times 10^1; \lg(2,20 \pm 1,65)^*$	$3,6 \times 10^2 \pm 1,13 \times 10^2; \lg(2,56 \pm 2,05)^*$
1440 '	Сепсис	$1,8 \times 10^5 \pm 1,3 \times 10^4; \lg(5,26 \pm 4,11)^*$	$3,5 \times 10^5 \pm 2,2 \times 10^4; \lg(5,54 \pm 4,34)^*$
	Лечение	$3,7 \times 10^2 \pm 4,3 \times 10^1; \lg(2,57 \pm 1,63)^*$	$4,6 \times 10^2 \pm 5,7 \times 10^1; \lg(2,66 \pm 1,76)^*$
7 сутки	Сепсис	-	-
	Лечение	0	0

Данные представлены $M \pm m$ – среднеарифметическое значение $\pm$ стандартная ошибка.

*, **, – различия статистически значимы: $p \leq 0,05$ (между группой сепсиса и лечения);

*** – не установлено статистически достоверных значений между группами сепсис и лечение: $p > 0,05$

Таблица 23 - Показатели микробиологического высева Ра 1623 и Ра 5266 из гомогенатов селезенки после введения Астрабионорма

Время после заражения		Модель 1623	Модель 5266
		$M \pm m; \log_{10}(\text{КОЕ/г})$	$M \pm m; \log_{10}(\text{КОЕ/г})$
90 '	Сепсис	$1,2 \times 10^5 \pm 6,32 \times 10^2; \lg(5,08 \pm 2,80)^*$	$2,1 \times 10^5 \pm 1,4 \times 10^3; \lg(5,32 \pm 3,15)^*$
	Лечение	$1,3 \times 10^5 \pm 8,0 \times 10^2; \lg(5,11 \pm 2,90)^*$	$3,2 \times 10^4 \pm 8,0 \times 10^2; \lg(4,51 \pm 2,90)^*$
240 '	Сепсис	$2,70 \times 10^5 \pm 3,6 \times 10^4; \lg(5,43 \pm 4,56)^*$	$8,50 \times 10^6 \pm 4,9 \times 10^4; \lg(6,93 \pm 4,69)^*$
	Лечение	$4,7 \times 10^5 \pm 2,9 \times 10^4; \lg(5,67 \pm 4,46)^*$	$9,2 \times 10^4 \pm 7,5 \times 10^3; \lg(4,96 \pm 3,88)^*$
480 '	Сепсис	$2,82 \times 10^6 \pm 1,06 \times 10^4; \lg(6,45 \pm 4,03)^*$	$1,52 \times 10^6 \pm 1,5 \times 10^4; \lg(6,18 \pm 4,18)^*$
	Лечение	$7,4 \times 10^4 \pm 6,3 \times 10^1; \lg(4,87 \pm 1,81)^*$	$7,0 \times 10^4 \pm 7,48 \times 10^2; \lg(4,85 \pm 2,87)^*$

Продолжение Таблицы 23

1440 '	Сепсис	$5 \times 10^5 \pm 3,2 \times 10^4$; $\lg(5,70 \pm 4,51)^*$	$7,10 \times 10^6 \pm 6,4 \times 10^5$; $\lg(6,85 \pm 5,81)^*$
	Лечение	$8,3 \times 10^2 \pm 4,1 \times 10^1$; $\lg(1,92 \pm 1,61)^*$	$5,8 \times 10^3 \pm 7,1 \times 10^2$; $\lg(3,77 \pm 2,85)^*$
7	Сепсис	-	-
сутки	Лечение	0	0

Данные представлены $M \pm m$ – среднеарифметическое значение $\pm$ стандартная ошибка.

*- различия статистически значимы: $p \leq 0,05$ (между группой сепсиса и лечения).

Показатели высевов Ра 1623 и Ра 5266 из гомогенатов печени у леченых Астрабионормом мышей снижались (Таблица 24) и к 7 суткам высева практически отсутствовали (выросла одна колония на чашке).

Таблица 24 - Показатели микробиологического высева Ра 1623 и Ра 5266 из гомогенатов печени после введения Астрабионорма

Время после заражения		Модель 1623	Модель 5266
		$M \pm m$; $\log_{10}(\text{КОЕ/г})$	$M \pm m$; $\log_{10}(\text{КОЕ/г})$
90 '	Сепсис	$2,6 \times 10^5 \pm 3,07 \times 10^5$; $\lg(5,41 \pm 5,49)^*$	$4,0 \times 10^5 \pm 2,71 \times 10^3$; $\lg(5,60 \pm 3,43)^*$
	Лечение	$2,01 \times 10^4 \pm 1,03 \times 10^4$; $\lg(4,30 \pm 4,01)^*$	$2,5 \times 10^4 \pm 1,02 \times 10^3$; $\lg(4,40 \pm 3,01)^*$
240 '	Сепсис	$3,80 \times 10^5 \pm 1,4 \times 10^4$; $\lg(5,58 \pm 4,15)^*$	$1,4 \times 10^5 \pm 9,5 \times 10^3$; $\lg(5,15 \pm 3,98)^*$
	Лечение	$1,2 \times 10^3 \pm 8,8 \times 10^1$; $\lg(3,08 \pm 1,94)^*$	$2,2 \times 10^4 \pm 1,1 \times 10^3$; $\lg(4,34 \pm 3,04)^*$
480 '	Сепсис	$7,40 \times 10^5 \pm 1,3 \times 10^3$; $\lg(5,87 \pm 3,10)^*$	$2,10 \times 10^5 \pm 3,75 \times 10^3$; $\lg(5,3 \pm 3,57)^*$
	Лечение	$3,1 \times 10^3 \pm 7,3 \times 10^2$; $\lg(3,49 \pm 2,86)^*$	$9,4 \times 10^3 \pm 8 \times 10^1$; $\lg(3,97 \pm 1,90)^*$
1440 '	Сепсис	$1,50 \times 10^5 \pm 2,9 \times 10^3$; $\lg(5,18 \pm 3,46)^*$	$1,40 \times 10^6 \pm 4,4 \times 10^4$; $\lg(6,15 \pm 4,64)^*$
	Лечение	$1,2 \times 10^3 \pm 1,8 \times 10^2$; $\lg(3,08 \pm 2,26)^*$	$3,6 \times 10^2 \pm 4,1 \times 10^1$; $\lg(2,56 \pm 1,61)^*$
7	Сепсис	-	-
сутки	Лечение	1**	0

Данные представлены $M \pm m$ – среднеарифметическое значение $\pm$ стандартная ошибка

*- различия статистически значимы: $p \leq 0,05$ (между группой сепсиса и лечения)

Аналогичные результаты снижения эффективности высева Ра 1623 и Ра 5266 под действием Астрабионорма были получены и при посевах гомогенатов (Таблица 25), (Таблица 26) почек и легких.

Таблица 25 - Показатели микробиологического высева Ра 1623 и Ра 5266 из гомогенатов почек после введения Астрабионорма

Время после заражения		Модель 1623	Модель 5266
		$M \pm m; \log_{10}(\text{КОЕ/г})$	$M \pm m; \log_{10}(\text{КОЕ/г})$
90 '	Сепсис	$2,3 \times 10^5 \pm 1,06 \times 10^3; \lg(5,36 \pm 3,03)^*$	$3,18 \times 10^5 \pm 4,0 \times 10^2; \lg(5,50 \pm 2,60)^*$
	Лечение	$2,1 \times 10^5 \pm 3,2 \times 10^3; \lg(5,32 \pm 3,51)^*$	$1,8 \times 10^4 \pm 4,0 \times 10^1; \lg(4,26 \pm 1,60)^*$
240 '	Сепсис	$5,03 \times 10^5 \pm 5,4 \times 10^4; \lg(5,7 \pm 4,73)^*$	$5,10 \times 10^5 \pm 3,5 \times 10^4; \lg(5,71 \pm 4,54)$
	Лечение	$1,0 \times 10^5 \pm 1,3 \times 10^4; \lg(5,0 \pm 4,11)^*$	$9,7 \times 10^4 \pm 7,5 \times 10^3; \lg(4,99 \pm 3,88)^*$
480 '	Сепсис	$5,80 \times 10^6 \pm 1,9 \times 10^4; \lg(6,78 \pm 4,28)^*$	$1,13 \times 10^5 \pm 3,36 \times 10^2; \lg(5,05 \pm 2,53)^*$
	Лечение	$8,4 \times 10^3 \pm 4,6 \times 10^1; \lg(3,92 \pm 1,67)^*$	$5,1 \times 10^3 \pm 8,4 \times 10^1; \lg(3,71 \pm 1,9)^*$
1440 '	Сепсис	$5,40 \times 10^5 \pm 3,1 \times 10^4; \lg(5,73 \pm 4,49)^*$	$5,40 \times 10^6 \pm 5,6 \times 10^5; \lg(6,73 \pm 5,75)$
	Лечение	$1,9 \times 10^3 \pm 2,2 \times 10^2; \lg(3,28 \pm 2,34)^*$	$2,2 \times 10^3 \pm 1,5 \times 10^2; \lg(3,34 \pm 2,18)$
7 сутки	Сепсис	-	-
	Лечение	3**	0

Данные представлены $M \pm m$ – среднеарифметическое значение $\pm$ стандартная ошибка

*- различия статистически значимы: $p < 0,01$ (между группой сепсиса и лечения)

Таблица 26 - Показатели микробиологического высева Ра 1623 и Ра 5266 из гомогенатов легких после введения Астрабионорма

Время после заражения		Модель 1623	Модель 5266
		$M \pm m; \log_{10}(\text{КОЕ/г})$	$M \pm m; \log_{10}(\text{КОЕ/г})$
90 '	Сепсис	$1,52 \times 10^4 \pm 2,0 \times 10^2; \lg(4,18 \pm 1,3)^*$	$3,5 \times 10^4 \pm 5,79 \times 10^2; \lg(4,54 \pm 2,76)^*$
	Лечение	$1,3 \times 10^4 \pm 3,81 \times 10^2; \lg(4,11 \pm 2,58)^*$	$6,7 \times 10^3 \pm 9,2 \times 10^1; \lg(3,83 \pm 1,96)^*$
240 '	Сепсис	$4,2 \times 10^5 \pm 2,4 \times 10^3; \lg(5,62 \pm 3,38)^*$	$2,40 \times 10^5 \pm 3,8 \times 10^3; \lg(5,38 \pm 3,58)^*$
	Лечение	$2,6 \times 10^4 \pm 1,6 \times 10^3; \lg(4,41 \pm 3,20)^*$	$3,3 \times 10^4 \pm 3,0 \times 10^3; \lg(4,52 \pm 3,48)^*$
480 '	Сепсис	$2,9 \times 10^5 \pm 2,46 \times 10^3; \lg(5,46 \pm 3,39)^*$	$9 \times 10^4 \pm 7,58 \times 10^2; \lg(4,95 \pm 2,88)^*$
	Лечение	$4,1 \times 10^3 \pm 1,6 \times 10^2; \lg(3,61 \pm 2,20)^*$	$2,1 \times 10^4 \pm 1,06 \times 10^3; \lg(4,32 \pm 3,03)^*$
1440 '	Сепсис	$6,1 \times 10^5 \pm 5,6 \times 10^4; \lg(5,79 \pm 4,75)^*$	$5,90 \times 10^6 \pm 5,7 \times 10^5; \lg(6,77 \pm 5,75)^*$
	Лечение	$8,3 \times 10^2 \pm 2,9 \times 10^1; \lg(2,92 \pm 1,46)^*$	$1,4 \times 10^3 \pm 2,7 \times 10^2; \lg(3,15 \pm 2,43)^*$
7 сутки	Сепсис	-	-
	Лечение	10**	5**

Данные представлены $M \pm m$ – среднеарифметическое значение $\pm$ стандартная ошибка.

*- различия статистически значимы: $p < 0,01$ (между группой сепсиса и лечения)

В структуре легких мышей, получивших лечение АБ, выраженных деструктивных изменений легочных ацинусов и малых бронхов отмечено не было, хотя сохранялись небольшие участки пониженного аэрирования легочной паренхимы (Рисунок 20.1). Гистологическая структура печени, почек и селезенки леченых животных (Рисунок 20.2), (Рисунок 20.3), (Рисунок 20.4) соответствовала контролю.

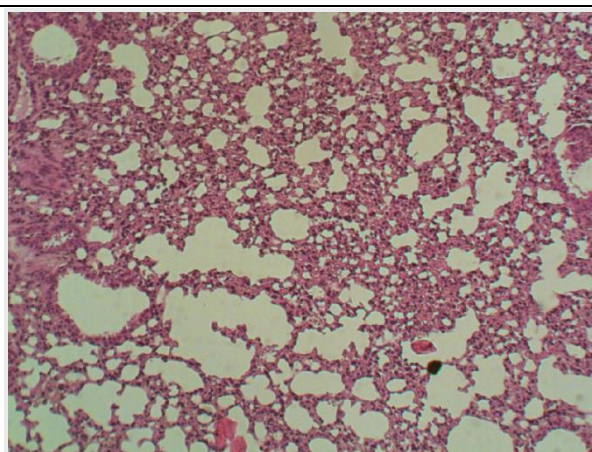


Рисунок 20.1

Рисунок 20.1 – Модель 1623, фрагмент легкого леченого животного (пояснение в тексте). Окрашивание: гематоксилин и эозин. Увеличение: $\times 100$

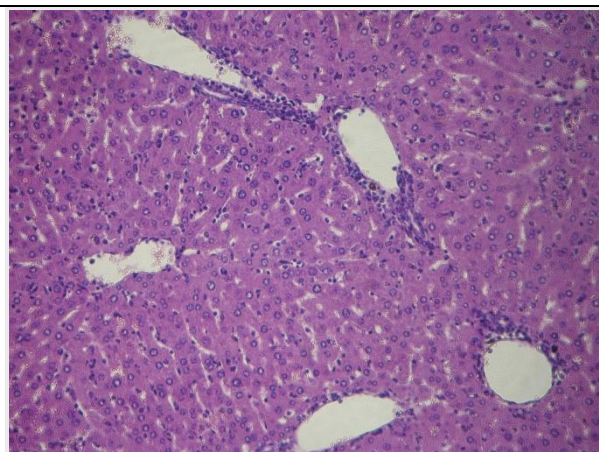


Рисунок 20.2

Рисунок 20.2 – Модель 5266, фрагмент печени леченого животного. Гистоструктура паренхимы печени соответствует контролю (рисунок 12.1). Окрашивание: гематоксилин и эозин. Увеличение: $\times 200$

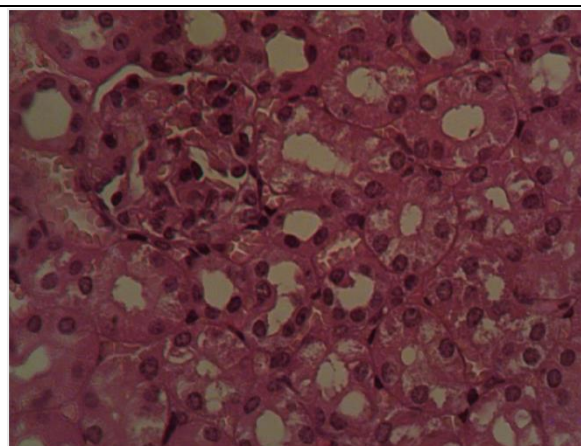


Рисунок 20.3а

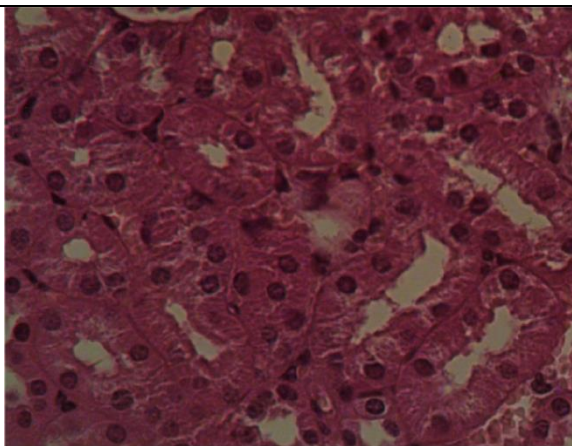


Рисунок 20.3б

Рисунок 20.3

Рисунки 20.3 а,б – Модель 1623, фрагменты почки леченого животного. Сохранная структура тельца нефрона (Рисунок 20.3а) и проксимальных канальцев (Рисунок 20.3б). Окрашивание рисунки 20.3 а,б: гематоксилин и эозин. Увеличение Рисунки 20.3 а,б: $\times 400$

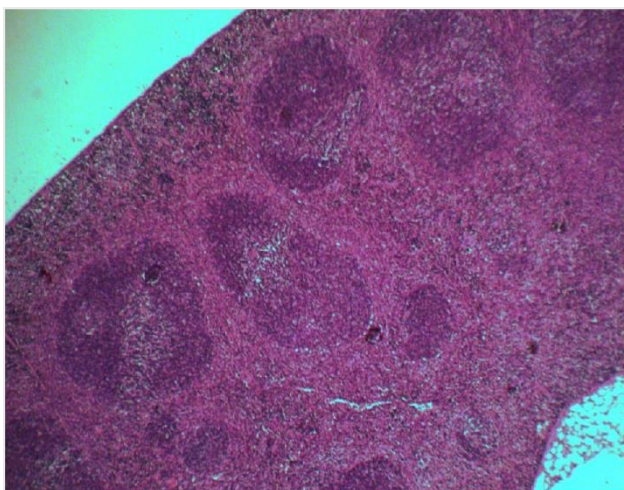


Рисунок 20.4

Рисунок 20.4 – Модель 5266, фрагмент селезенки леченого животного. Структура органа аналогична контролю. Окрашивание: гематоксилин и эозин. Увеличение: $\times 100$

Надпочечники большинства животных обеих моделей леченых Астрабионормом к 24 часам после инфицирования имели важные особенности, отличающие их от контрольных показателей. Практически все кортикостероциты коры имели светлую окраску цитоплазмы; в особенности кортикостероциты столбчатой части пучковой зоны, цитоплазма которых выглядела светооптически «пустой», что указывало на возможный голокриновый вариант секреции на терминальной стадии сепсиса (Рисунок 20.5). Эти особенности предположительно могут расцениваться как напряженное функциональное состояние коркового вещества надпочечников. На 7-е сутки цитоархитектоника коры и мозгового вещества, физиологическая зональность коры и светооптические свойства кортикостероцитов и хромаффиноцитов в надпочечниках септических животных, получивших лечение Астрабионормом, восстанавливались и соответствовали контрольным критериям (Рисунок 20.6.).

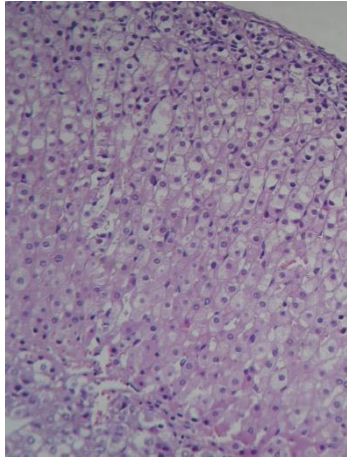


Рисунок 20.5

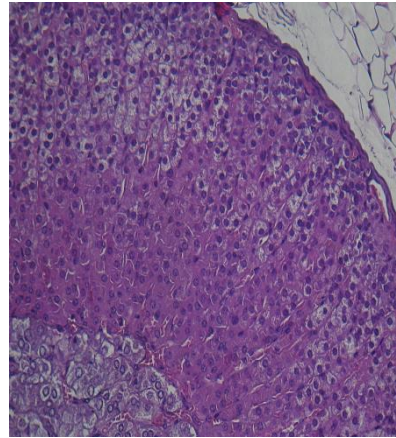


Рисунок 20.6

Рисунок 20.5 – Модель 1623, фрагмент надпочечника леченого животного. Описание в тексте. Окрашивание: гематоксилин и эозин. Увеличение: $\times 200$

Рисунок 20.6 - Модель 1623, фрагмент надпочечника леченого животного, 7 суток после инфицирования. Описание в тексте. Окрашивание: гематоксилин и эозин. Увеличение: $\times 200$

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Моделирование занимает одно из первых мест в экспериментальном изучении сепсиса и включает разные варианты [15], которые по – возможности, приближены к имитации этиопатогенеза этого состояния у человека. Нами разработана модель сепсиса способом внутрибрюшинного заражения мышей Ра. Созданная модель (как и другие варианты аналогичных моделей), конечно же, не полностью соответствует хирургическому сепсису у человека (более приемлемой в этом плане является лигирование/перфорирование купола слепой кишки, когда «набор возбудителей» представлен всей кишечной флорой), однако моделирование способом внутрибрюшинного введения двух разных штаммов Ра мы сочли целесообразным, т.к. синегнойный сепсис является очень частым осложнением у пациентов ожоговых отделений и отделений интенсивной терапии. Помимо работы по созданию модели, в перечень задач исследования входило выявление особенностей течения синегнойного сепсиса, специфики его мультиорганного поражения, возможной зависимости характера поражения органов от штамма Ра, выяснение пригодности созданной модели/моделей для апробирования эффективности препарата Астрабионорм.

Для моделирования сепсиса самцов мышей линии C57Bl/6 заражали штаммами Ра, которые отобраны из рабочей коллекции лаборатории индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи. LD определяли согласно стандартной методике расчета LD₅₀ и LD₁₀₀ [14]. Взятые в исследование штаммы различались по наличию генов *exoU* и *exoS*, а также по подвижности, гемолитической и фосфолипазной активности, чувствительности к действию антибактериальных препаратов, что в свою очередь имело свою специфику при поражении органов животных. В нашем исследовании из двух используемых штаммов – Ра 1623 и Ра 5266, более высокая фосфолипазная активность присутствовала у штамма Ра 1623, что в сочетании с высокой подвижностью этого штамма, объясняет 100% - е фатальное действие более низких его концентраций (7×10^6 КОЕ/мышь) по сравнению со штаммом Ра 5266

(3×10^7 КОЕ/мышь), однако через, примерно, равный в обеих моделях промежуток времени после заражения.

Сравнительная оценка патогенных эффектов использованных в исследовании штаммов Ра, в значительной степени была затруднена из-за множества факторов патогенности, которыми наделен каждый из штаммов, а также из-за различия мишеней эукариотических клеток органов к этим патогенам. Говоря о штамме Ра 5266, обладающего в отличие от штамма Ра 1623, геном *exoU*, и, соответственно, - опасным для клеток мембранолитическим эффектом, можно было полагать, что штамм Ра 5266 вызовет более быстрое септическое поражение органов и гибель животных. Однако в модели 5266 была получена такая же продолжительность сепсиса, как и в модели 1623, хотя штамм Ра не имеет гена *exoU*. Совершенно очевидно, что возникающие при сепсисе поражения гистоструктуры органов и нарушения гомеостаза организма в целом, как и исходы септического процесса, определяются и зависят от всего комплекса факторов патогенности, которым наделены возбудители.

Создавая модели интраперитонеального сепсиса способом введения живых микроорганизмов, важно учитывать не только свойства возбудителя, но и реакцию брюшины, наличие перитонеальных макрофагов и, соответственно, - высокую степень ее защитных свойств.

Перитонеальные макрофаги (ПМ) активно участвуют в фагоцитозе патогенов, благодаря экспрессии молекул МНС-II [171].

Существуют два фенотипа ПМ: классически активированные макрофаги (M1) и альтернативно активированные макрофаги (M2), которые после стимуляции [172] играют важную роль в защите макроорганизма, M1 – поляризованные макрофаги экспрессируют провоспалительные цитокины, включая ФНО, ИЛ-2, ИФН-гамма. M2-поляризованные ПМ преимущественно экспрессируют большое количество (по Th2 - пути) противовоспалительных цитокинов, включая ИЛ-4, ИЛ-13, ИЛ-10 и TGF- β , тем самым подавляя воспалительные процессы [197]. Секреция макрофагами про- и противовоспалительных цитокинов приводит к дифференцировке CD4 + Т-клеток

в Th1, Th2, Th17 и регуляторные Т-клетки (Treg), таким образом, способствуя иммунному ответу [101, 152]. Во время внутрибрюшинной бактериальной инфекции высвобождение провоспалительных медиаторов вызывает подавляющую воспалительную реакцию, способную к поражению брюшины [258]. *Pseudomonas aeruginosa*, обладающая арсеналом как клеточно-ассоциированных (жгутики, пили, лектины, альгинат/био пленка, липополисахарид), так и внеклеточных (протеазы, гемолизины, цитотоксин, пиоцианин, сидерофоры, экзотоксин А, эффекторные белки системы секреции 3 типа – *exoU*, *exoS*, и др.) факторов вирулентности, способна избегать фагоцитоза перитонеальными макрофагами [173, 241]. При введении мышам сублетальных доз штаммов Ра, фагоциты, как правило, их быстро уничтожают, тогда, как увеличение доз вводимых бактерий приводит к бактериальному сепсису, цитокиновому шторму и высокому риску развития летального исхода, [150, 204, 240, 256], что было зарегистрировано у подопытных животных в нашем эксперименте.

Существуют исследования [27, 112], в которых *in vivo*, была проведена количественная оценка фагоцитоза. Результаты опытов по однократному внутрибрюшинному заражению мышей разными дозами *B. burgdorferi* и *P. aeruginosa* указали на специфический для каждого типа бактерий путь поглощения фагоцитами.

Инфекционный процесс, вызванный Ра, состоит из следующих стадий: 1. Бактериальная адгезия и колонизация, 2. Локальная инвазия 3. Генерализация процесса.

Инициацией инфекционного процесса служит нарушение функций тканевых барьеров, в нашем случае – барьерного свойства брюшины.

Повреждению барьерных свойств брюшины в наших моделях способствовало наличие у Ра пилей IV типа - важных факторов патогенности, обеспечивающих поддерживающую подвижность, и участвующих во взаимодействии бактерий с клетками брюшины; жгутиков, ответственных за плавательную подвижность, и участвующих в адгезии к эукариотическим клеткам

и колонизации. Известно, что два белка – лектины - LecA и LecB (ранее называвшихся соответственно PA-II и PA-III) синтезируемые Pa, связывают сахара и гликопротеины, расположенные на поверхности клеток макроорганизма, т.е. в составе гликокаликса эукариотических клеток. Можно предполагать, что лектины Pa, действуя как адгезины и цитотоксины, способствуют не только прикреплению Pa [241] к брюшине, но и вызывают ее деструктивные изменения, увеличивая проницаемость микрососудов и скорость поступления Pa в кровоток. Способность Pa разрушать эластин, благодаря эластазе LasA, эластазе LasB и щелочной протеазе, является одним из основных показателей вирулентности при инфекционном процессе, поскольку предрасполагает к возникновению кровотечений, разрушая эластин - важную структурную составляющую стенок кровеносных сосудов и рыхлой соединительной ткани. LasB эластаза представляет собой нейтральную протеазу, содержащую цинк, чувствительную к хелаторам металлов и действует, помимо эластина, на ряд других белков - фибрин, фибронектин, коллаген. Эластаза LasA - сериновая протеаза, усиливающая активность LasB путем расщепления связей глицин-глицин в эластине, делает его чувствительным к деградации другими протеазами, такими как эластаза LasB, щелочная протеаза и нейтрофильная эластаза. Эластаза LasB может инактивировать, например, компоненты комплимента, разрушая элементы тканей, а также нарушая защитные механизмы макроорганизма. Следующими факторами патогенности, с которым может быть связано «вторжение» Pa в кровоток брюшины, являются цитотоксин и два гемолизина - гемолитическая фосфолипаза C (PLC-H) и рамнолипид. Цитотоксин локализуется в периплазме Pa и может ингибировать опосредованный макрофагами фагоцитоз, возможно, путем нарушения градиента транспорта ионов через плазматическую мембрану макрофагов. Гемолитическая фосфолипаза C (PLC-H) и рамнолипид, по-видимому, действуют синергетически, расщепляя липиды и лецитин. Одним из субстратов для PLC-H является фосфатидилхолин, который гидролизует с высвобождением фосфорилхолина и диацилглицерина.

P. aeruginosa также продуцирует негемолитическую фосфолипазу С (PLC-N), которая на 40% идентична PLC-H. Обе фосфолипазы гидролизуют фосфатидилхолин, но каждый фермент имеет различную субстратную специфичность. PLC-H гидролизует сфингомиелин в дополнение к фосфатидилхолину, тогда как PLC-N активен в отношении фосфатидилсерина, а также фосфатидилхолина [241].

Эфektorные белки ССТТ ExoT и ExoS также могут ограничивать поглощение *P. aeruginosa* макрофагами [110]. Массивное кровоснабжение брюшины, благоприятно влияет на инвазию и дальнейшее распространение Ра по кровеносным сосудам [24] в центральный кровоток, опосредуя клеточно-ассоциированными и внеклеточными факторами вирулентности. Следует отметить, что возможная устойчивость и уклонение Ра от фагоцитоза, также способствовали в нашем исследовании быстрому попаданию соответствующих возбудителей в кровь и в органы.

Экзотоксин А (*exoA*), вырабатываемый большинством штаммов Ра, как и исследуемыми нами штаммами, катализирует АДФ-рибозилирование и инактивирует фактор элонгации 2, приводя к ингибированию биосинтеза эукариотических белков, гибели клеток и опосредуя системный воспалительный процесс. Этот экзотоксин обладает некротизирующей активностью, способствует бактериальной колонизации, инвазии, а также и иммуносупрессии организма [110].

Известно, что наиболее цитотоксичным из эфektorных белков ССТТ Ра является ExoU. Он обладает активностью фосфолипазы A2 *in vivo*, [207, 241] вызывая быструю цитолитическую гибель различных типов клеток макроорганизма, включая макрофаги, эпителиальные клетки, клетки СНО и фибробласты [241]. Действие ExoU как сильнодействующего цитотоксина и ExoT способствуют также ингибированию интернализации бактерий [241]. Вероятно, что в патогенезе сепсиса, вызванного Ра, значительную роль играют не только изменения синтеза ИЛ – 4 и ИЛ – 10, но и утечка провоспалительных цитокинов в кровоток, вызванная повреждением разных типов клеток, синтезирующих

ИЛ – 10, а также комбинированное действие EhoU за счет разрушения фосфолипидов плазматических мембран. Смерть клеток при сепсисе может наступить как в результате прямого нарушения целостности плазматической мембраны, как и косвенного нарушения сигнальных каскадов, таких как простагландиновый путь, в котором участвуют фосфолипиды [216, 241]. Обобщая результаты высеваемости обеих культур Ра, следует отметить, что быстрое распространение возбудителей из перитонеальной жидкости в кровь и в первые 30 минут – в органы с последующим массовым высевом из гомогенатов органов, гибель 100% животных в течение суток - все эти данные указывают на высокую степень агрессивности Ра и отмеченную нами специфику течения и исхода синегнойного сепсиса.

Поскольку в рамках одного исследования практически невозможно было проанализировать морфологические изменения всех висцеральных органов, нами была выборочно изучена структура легких, печени, почек, селезенки и надпочечников в созданных моделях сепсиса. Выбор обусловлен, прежде всего, ключевым значением этих органов в обеспечении жизнедеятельности организма, поддержании физиологического гомеостаза, а также уникальными особенностями микроциркуляторного русла каждого из этих органов, т.к. нарушение микроциркуляции, как считают многие исследователи [57, 127, 133], возникает раньше, чем нарушение «глобальной» циркуляции, и рассматривается сегодня как «мотор сепсиса». Как полагают Hua et al. [127], мониторинг микроциркуляции может служить ранней детекции нарушений гемодинамики при сепсисе. Известно, что печень, почки и легкие являются мощными депо крови и в каждом из этих органов микроциркуляторное русло имеет свою специфику, соответствующую назначению функций [11]. В легких гемокапилляры густой тонкостенной сетью оплетают альвеолы для создания беспрепятственных условий для газообмена; синусоидные капилляры печени, несущие смешанную кровь и имеющие многочисленные микропоры, лишены базальной мембраны и обеспечивают прямой контакт плазмы крови с гепатоцитами – «биохимическими лабораториями организма»; в почечных тельцах «чудесная капиллярная сеть»,

расположенная между двумя артериолами, участвует в фильтрации плазмы, а вторичная капиллярная сеть, оплетающая каналы нефронов, осуществляет реабсорбцию компонентов первичной мочи. Что касается селезенки, то ее выбор связан с тем, что это один из главных (помимо региональных лимфоузлов и лимфоидных фолликулов желудочно-кишечного тракта) органов периферического лимфоидного комплекса, где происходит антигензависимая дифференцировка лимфоцитов, осуществляющих защитные иммунные реакции, направленные на нейтрализацию патогенов. Наконец, надпочечники - уникальные представители эндокринной системы, сочетающие в своем составе (помимо, хромаффиноцитов - продуцентов «гормона стресса» адреналина и медиатора симпатической нервной системы - норадреналина), два мощных источника кортикостероидных гормонов, которые противоположно влияют на развитие воспаления: кортикостероциты клубочковой зоны коры, продуцирующие провоспалительные минералокортикоиды, и кортикостероциты столбчатой части коры, синтезирующие глюкокортикоиды с противовоспалительным действием.

Несмотря на доминирование мнения о первичном поражении микроциркуляции при сепсисе [127], в современной литературе практически не рассматривается возможное значение в патогенезе сепсиса особенностей микроциркуляторных систем каждого из вышеназванных органов.

Как показали результаты наших наблюдений, изменение структуры легких однотипны у животных обеих моделей сепсиса. Полагаем, что быстро развивающаяся дыхательная недостаточность при сепсисе обусловлена выраженной воспалительной реакцией легких, которая протекает остро, без признаков некроза и тромбоза, однако с развитием геморрагий (в том числе, - в полость легочных ацинусов), отека и деструкции слизистой оболочки мелких внутрилегочных бронхов с частичной или полной облитерацией их просветов. По нашему мнению, сужение просветов мелких бронхов, продолжающихся в терминальные бронхиолы, от которых практически начинается респираторный отдел, является причиной неравномерного заполнения воздухом паренхимы легкого у септических мышей с разрывами легочных ацинусов в

гипераэрированных участках. К разрывам легочных ацинусов приводит, вероятно, и действие протеолитических ферментов Ра, разрушающих волокна эластина, которые оплетают легочные альвеолы, не давая им (совместно с сурфактантом) полностью спадаться при уменьшении наполнения воздухом и препятствуя перерастяжению при поступлении воздуха. Согласно нашим данным, тромбообразование в отличие от данных литературы [9], не является характерным признаком поражения легких при синегнойном сепсисе. Важным признаком, по нашему мнению, следует считать возникновение клазматоза эпителиоцитов мелких внутрилегочных бронхов. Клазматоз отмечен и другими авторами как структурное изменение при инфекционных состояниях, в частности, вызванных штаммами бактерий *Escherichia coli* и *Providencia rettgeri*, и охарактеризован этими исследователями как структурно - функциональная реорганизация эпителиоцитов воздухоносных путей и респираторных отделов легких, направленная на активизацию защитно - приспособительных реакций и элиминацию антигенов. С нашей точки зрения, подобная «защитно - приспособительная реакция» в модели острого синегнойного сепсиса оборачивается существенным затруднением для поступления воздуха в респираторные участки легкого и вносит существенный вклад, совместно со всеми патогенетическими слагаемыми процесса воспаления в развитие дыхательной недостаточности при сепсисе. Хотя морфологические изменения легких у животных обеих моделей были однотипны и, как мы полагаем, связаны с непосредственным действием возбудителей, высев *P. aeruginosa* из гомогенатов легких, регистрируемый уже в первые минуты сепсиса, в модели 1623 превышал эффективность высева из крови, а в модели 5266 – был ниже этого показателя, что указывает на независимость глубины деструктивных изменений легких от концентрации присутствующих в них возбудителей. В целом, комплекс полученных данных гистологического анализа легких позволяет считать выявленные в них изменения одной из ключевых причин быстрой (практически в течение суток) гибели животных при синегнойном сепсисе в обеих экспериментальных моделях.

Что касается реактивных изменений морфологической структуры надпочечников септических животных, то следует отметить также их однотипность в двух созданных моделях. Зарегистрированное венозное полнокровие септических надпочечников (особенно выраженное, с картинами стаза – в мозговом веществе) соответствует имеющимся в литературе характеристикам [186]. Что касается структурного статуса зон коркового вещества надпочечников, то обнаруженная нами в динамике сепсиса в модели 1623 тенденция к снижению площади клубочковой зоны, производящей провоспалительные минералокортикоиды, представляется парадоксальной, как и флуктуация этого показателя в динамике сепсиса, вызванного штаммом 5266. Снижение к терминальной стадии сепсиса по сравнению с контролем показателей абсолютной площади столбчатой части пучковой зоны, производящей глюкокортикоидные гормоны, отсутствие светооптических признаков активности кортикостероцитов и деструкция кортикостероцитов столбчатой части по типу вакуолярной дегенерации и апоптоза в двух созданных моделях, напротив, вполне закономерны и свидетельствуют о высокой функциональной нагрузке, которую клетки этой части пучковой зоны испытывали в развитии сепсиса и объясняют тот позитивный эффект, который дает введение кортизола септическим больным [49].

Отмеченное увеличение площади «неструктурированной» части пучковой зоны у септических животных клетки, которой, по нашим данным, не проявляют признаков стероидной активности, не несет компенсаторного значения.

Обнаруженные деструкция митохондрий и секреторных гранул в хромаффиноцитах мозгового вещества надпочечников септических животных указывают на несостоятельность синтеза катехоламинов – адреналина и норадреналина, которые могли бы обеспечить несколько лучшую адаптацию организма к инфекционному стрессу, каковым является сепсис. Вторичных септических очагов, как и очагов лейкоцитарной инфильтрации с макрофагальной реакцией, в тканях надпочечников септических животных нами зарегистрировано не было за исключением мелких скоплений лимфоцитов в мозговом веществе и на границе мозгового вещества с корковым, что согласуется с мнением

отечественных ученых [9] о том, что при синегнойном сепсисе вторичные очаги в органах могут отсутствовать, а лейкоцитарная инфильтрация может быть незначительной. Во многом наши данные по реакции надпочечников согласуются с результатами других исследователей сепсиса в опытах на мышах [143]. Однако новым, как полагаем, является обнаружение в тканях надпочечников септических мышей высоких показателей оптической плотности мРНК провоспалительных цитокинов, нарастающих в динамике сепсиса, а также положительные результаты иммуногистохимической реакции на провоспалительный ИЛ - 1 β . Эти факты указывают на возможный синтез данных соединений непосредственно клетками надпочечников, поскольку выраженной макрофагальной (и в целом – лейкоцитарной) реакции, с развитием которой можно было бы связывать полученные показатели, в надпочечниках септических мышей выявлено не было. В данном направлении необходимы дальнейшие разработки, в первую очередь, - для понимания тех малообъяснимых явлений, которые нами зарегистрированы в созданных моделях синегнойного сепсиса. Учитывая важнейшую роль надпочечников в защитно-приспособительных реакциях организма, зарегистрированные нами изменения на тканевом, клеточном и субклеточном уровнях являются свидетельствами выраженной «функциональной недостаточности» надпочечников к терминальной стадии сепсиса. Вместе с тем, следует заметить, что моделирование сепсиса (как и другой патологии) не может в полной мере соответствовать развитию сепсиса у человека, в первую очередь, из-за специфики характеристик тех или иных органов. В нашем материале это касается, в основном, надпочечников, в составе которых у мышей отсутствует сетчатая зона коры и присутствует малопонятная «неструктурированная» часть пучковой зоны. В проведенном исследовании нам не удалось выяснить, какую роль эта часть коры играет при сепсисе, и можно ли связать возникающую к 7 суткам после заражения «структурную реабилитацию» коркового вещества надпочечников животных, леченых Астрабионормом с клетками «неструктурированной» части. Для получения ответов на эти вопросы следует, в первую очередь, выяснить физиологическое предназначение

«неструктурированной» части пучковой зоны и далее исследовать ее возможное значение при экспериментальном повреждении коркового вещества. Однако это представляет большую самостоятельную проблему.

Изменения печени в нашем опыте были более выраженными в модели 5266, и это мы связываем, прежде всего, с присутствием в геноме штамма Ра 5266 гена экзотоксина U (ExoU) со свойственным продукту экспрессии этого гена гепатотропным цитотоксическим эффектом [226]. В образцах печени животных этой модели присутствовали: нарушение дольковой архитектуры паренхимы, очаги некрозов и лейкоцитарной инфильтрации, отдельные тромбы в центральных венах. На субмикроскопическом уровне гепатотропный токсический эффект экзотоксина U проявлялся в виде вакуолярной дистрофии значительной части гепатоцитов. Присутствовали признаки выраженного венозного застоя, что совпадает с мнением о важном значении в патогенезе сепсиса нарушений гемообеспечения органов по типу гипо- или гиперперфузии [227]. Образование сладжей эритроцитов, выявленное в моделях 1623 и 5266 несомненно, нарушает гомеостазис гликокаликса эндотелия, приводит к каскаду его молекулярных изменений, описанного в литературе как патогенетический триггер сепсиса [54, 237]. Возникающие при сепсисе стаз крови и связанный с ним «избыточный выход» плазмы за пределы синусоидных капилляров, о чем свидетельствуют эозинофильные массы белка в перисинусоидных пространствах печени, несомненно, нарушают метаболизм гепатоцитов и их взаимодействие с системой крови, способствуя развитию некроза. В модели 1623 изменения структуры печени были менее выражены, регистрировались в основном на субклеточном уровне в виде редукции эргастоплазмы и повреждения ультраструктуры митохондрий гепатоцитов, хроматинолиза ядер и снижения содержания в гепатоцитах общего белка. Важнейшей причиной деструкции гепатоцитов в этой модели, с нашей точки зрения, следует также считать изменения режима гемодинамики на уровне синусоидных капилляров, хотя внутриклеточное обнаружение Ра в гепатоцитах не исключает того, что поражение ключевых органелл белкового синтеза могло быть вызвано и непосредственным

воздействием патогенетических факторов Ра. Полагаем, что даже в отсутствии развития некроза в модели 1623 выявленные изменения ультраструктуры гепатоцитов способны привести к дефициту синтеза альбумина, факторов свертывания и противосвертывания – тех важнейших молекул, благодаря которым поддерживаются многие физиологические процессы в организме – в их числе влияние альбумина на состояние эндотелиального гликокаликса и факторов системы свертывания, на реологические свойства крови, которые при сепсисе нарушаются. Обнаруженное у септических животных методом гистохимии снижение содержания общего белка (и особенно, - содержания внутриядерного белка, с чем можно связать явление хроматинолиза) объясняется нарушением белоксинтезирующей функции этих клеток при сепсисе. Выявленные нами отличия в реактивных изменениях печени септических животных в исследованных моделях 5266, 1623, несомненно, связаны со штаммовыми особенностями возбудителей (различием факторов патогенности и продуктов метаболизма). Как считают Лазарева и др. [7], разные штаммы Ра обладают разной степенью токсичности, что связано с особенностями их геномов. По нашему мнению, реактивные изменения, обнаруженные в структуре печени в обеих моделях, отягощают течение сепсиса, но не являются главной причиной его летального исхода.

Известно, что 40-50% септических больных имеют острое поражение функции почек. [181]. Согласно результатам исследований Arulkumaran N. et al. [29, 85], характерным для сепсиса нарушением является повреждение проксимальных канальцев (канальцевый некроз), проявления которого в нашем эксперименте были наиболее выражены в модели 1623 по сравнению с моделью 5266. Предположительно это можно связывать с наличием в геноме Ра 1623 гена *EcoS* и потенциально активным его состоянием. По данным литературы [89] *EcoS* воздействует на клетки-мишени через связывание с рецепторами врожденного иммунитета TLR 2 и 4. Этот тип рецепторов присутствует у клеток проксимальных канальцев [84]. Известно, что с TRL - рецепторами проксимальных канальцев нефронов связывается и липополисахарид –

эндотоксин грамотрицательных штаммов бактерий, вызывая деструкцию канальцев [82]. Так как липополисахарид как структурный компонент стенок Ра имеется у обоих использованных нами штаммов Ра, можно полагать, что разрушение проксимальных канальцев нефронов у животных в модели 5266 связано с действием липополисахарида, а более значительное повреждение канальцевой системы нефронов, отмеченное в почках животных в модели 1623, является, вероятнее всего, результатом сочетанного действия на канальцы липополисахарида и ExoS. Если учитывать одно лишь значение TRL - рецепторов в повреждении проксимальных канальцев, непонятно, почему в нашем материале были разрушены только субкапсулярно расположенные проксимальные канальцы, а проксимальные канальцы более глубоко расположенных нефронов выглядели значительно более сохранными. В более глубоких проксимальных канальцах (предположительно принадлежащих промежуточным нефронам) в модели 1623 присутствовали гомогенные эозинофильные массы (по гистологическим критериям – массы белка), заполнявшие просветы, что указывало на затруднение (или блок) реабсорбции молекул белка во вторичную капиллярную сеть, оплетающую эти проксимальные канальцы. На субмикроскопическом уровне в эпителиоцитах таких канальцев отмечалось разрушение ультраструктуры щеточной каемки, осуществляющей процесс реабсорбции, и обнаружены Ра. Эти изменения были ожидаемы и наиболее выражены в модели 1623, поскольку данный штамм имеет ген экзотоксина S, способного разрушать элементы клеточного скелета [149, 161], при участии которого формируется и сохраняет свою морфологическую целостность и физиологические свойства щеточная каемка проксимальных канальцев. Рассмотренные гистологические и ультраструктурные свидетельства нарушения реабсорбции белка в проксимальных канальцах почек совместно с приведенными выше изменениями в структуре печени составляют, по нашему мнению, морфологическую основу возникновения одного из важнейших патогенетических слагаемых сепсиса - гипоальбуминемии. Считается также [263], что повышение проницаемости микрососудов почечного интерстиция приводит к активации

оттока альбумина и жидкой части плазмы в интерстициальные пространства почек, чему способствует эндотелиальная дисфункция, возникающая при сепсисе. С этими данными согласуются результаты наших наблюдений – присутствие белка в перикапиллярных пространствах почечного интерстиция. Следует заметить, что, говоря об эндотелиальной дисфункции, как триггерном патогенетическом факторе разных заболеваний, обоснованной аргументации ее возникновения, в том числе, - при сепсисе, нет. Имеющиеся литературные данные иммуногистохимического анализа указывают на наличие большего количества нейтрофилов и макрофагов в нефронах и большего числа нейтрофилов в околотубулярной интерстициальной ткани у больных сепсисом по сравнению с «нормальной» почкой, хотя в наших моделях в препаратах почек присутствовали лишь небольшие участки лимфоцитарной инфильтрации, причем только у некоторых септических животных и только в модели 1623. Между тем, указанные выше авторы отмечают «обширную неоднородность собственных наблюдений» в образцах почечной биопсии среди пациентов с сепсисом [40].

Несмотря на интенсивную экспериментальную и клиническую разработку проблемы патогенеза сепсиса, многие исследователи сходятся на мнении, что гистопатология острого повреждения почек у пациентов в критическом периоде сепсиса остается малоизученной и достаточно противоречивой по фактическому материалу. В свое время в качестве основной причины острого поражения почек и нарушения процесса фильтрации при сепсисе было предложено возникновение почечной гипоперфузии и ишемии с последующим острым некрозом канальцев [156, 229]. Вместе с тем, клинические и экспериментальные данные [212] указывают на более важную роль воспалительных механизмов в развитии острой патологии почек и микроциркуляторной дисфункции при сепсисе, чем системные изменения почечной перфузии.

Существует мнение [154, 212], что наиболее распространенной ситуацией у септических больных с гипердинамическим кровообращением, является увеличение или, по крайней мере, отсутствие снижения почечного кровотока и вышеприведенная парадигма ишемии не может быть правильной при всех

обстоятельствах. Вместе с тем, мы не встретили в литературе детального описания микроциркуляторного внутривисцерального кровотока в разных зонах коркового вещества и, соответственно, - в микрососудистых руслах корковых, промежуточных и юкстамедуллярных нейронов при сепсисе. В нашем материале, в модели 1623, где изменения структуры почек были наиболее выражены, присутствовали: резкое кровенаполнение вен мозгового вещества и капиллярных клубочков юкстамедуллярных нейронов и были снижены и даже отсутствовали признаки кровенаполнения капиллярных клубочков подавляющего большинства корковых и промежуточных нефронов. Известно, что по сравнению с тельцами фильтрующих нефронов, расположенными преимущественно в верхних и средних слоях коркового вещества почки, тельца (и соответственно, - капиллярные клубочки) юкстамедуллярных нефилтрирующих нефронов лежат значительно ближе к истокам интерлобулярных артерий [11], из которых корковое вещество почки получает кровоснабжение.

Исходя из этих топографических особенностей, можно полагать, что как при гипо-, так и при гиперперфузии почек (что может иметь место в разных ситуациях сепсиса) капиллярные сети юкстамедуллярных нефронов будут более эффективно наполняться кровью по сравнению с капиллярными клубочками фильтрующих нефронов. Известно, что юкстамедуллярные нефроны, приносящие и выносящие артериолы которых имеют равные диаметры, могут работать (как в норме, так и при изменении активности кровенаполнения сосудистой системы почки, что и происходит при сепсисе) по принципу шунтов, сбрасывающих кровь, уменьшая тем самым приток крови к фильтрующим нефронам. Учитывая сказанное, мы полагаем, что обнаруженные гистологические признаки резкого уменьшения кровенаполнения чудесной капиллярной сети фильтрующих нефронов в септических почках связаны с интраорганным перераспределением крови «в пользу» юкстамедуллярных нефронов. Полагаем, что в перспективе механизм этого предположительного факта получит объяснение. Интересными представляются события, обнаруженные Adnan с соавторами. [30] у некоторых пациентов с сепсисом. Авторы описали обильное отложение фибрина в

перитубулярных капиллярах, а также присутствие частичного или полного тромбоза приносящих артериол без признаков отложения фибрина в перитубулярной капиллярной системе. Это еще раз указывает на необходимость дифференцированной оценки состояния микроциркуляторного русла нефронов при сепсисе. Показано, что нормодинамический сепсис связан с 43% редукцией гломерулярной фильтрации [180]. Наши наблюдения говорят о том, что снижение активности гломерулярной фильтрации обусловлено выявленными деструктивными изменениями почечных телец - уменьшение размеров и деформация телец фильтрующих нефронов, пикнотические изменения клеточных ядер. Известно, что пикноз знаменует собой начало некротических событий, либо начало апоптоза [125]. Поскольку более поздних стадий апоптоза в форме апоптозных тел нами обнаружено не было ни на светооптическом, ни на субмикроскопическом уровне, мы склонны расценивать пикнозы ядер как инициальные признаки некроза. Вместе с тем, описанные выше изменения почечных телец, как и капиллярных клубочков фильтрующих нефронов, были наиболее выражены у животных в модели штамма 1623, не имеющего гена *EcoU*, благодаря которому осуществляется мембранолитический (некротический) эффект Ра на клетки, и с этих позиций объяснить реализацию рассматриваемого эффекта на клетки почечных телец весьма затруднительно. Обнаружение единичных очагов лейкоцитарной инфильтрации в паренхиме почек только у отдельных животных в каждой из моделей, не согласуется с обильным высевом Ра из гомогенатов почек на всех исследованных сроках развития сепсиса, хотя соответствует мнению о том, что синегнойный сепсис не сопровождается выраженной лейкоцитарной инфильтрацией органов [9].

Поскольку одним из главных проявлений цитотоксического эффекта *EcoS* на эукариотические клетки-мишени является деструкция цитоскелета [149, 161], выявленное у животных модели 1623 более обширное разрушение проксимальных канальцев может объясняться прямым влиянием *EcoS* на микрофиламенты, составляющие цитоскелет микроворсинок щеточной каемки эпителия этих канальцев. Обнаруженные в почках животных модели 1623

деструктивные изменения дистальных канальцев, петель Генле и собирательных трубочек также можно связывать с влиянием ExoS на цитоскелет. Гистологические изменения почек в модели 5266 не были столь выраженными как в модели 1623. В целом реакцию почек в обеих моделях сепсиса, вероятно, нельзя расценивать как островоспалительную и включать в разряд первопричин гибели септических животных, наступающей в обеих созданных нами моделях в минимально короткий срок – через 24 - 26 часов после внутрибрюшинного инфицирования. Вместе с тем, обнаруженные изменения печени (производящей альбумин) и почек (осуществляющих обратное всасывание мелких молекул альбумина из первичного фильтрата в кровь) в двух моделях сепсиса позволяют говорить о важнейшей роли этого «тандема» в патогенезе сепсиса, в частности – в возникновении характерной для сепсиса гипоальбуминемии. В модели 5266, когда резко поражается структура (а, следовательно, и белоксинтезирующая функция) печени и при этом нарушения почек не столь значительны, причиной гипоальбуминемии служит пораженная функция печени. В модели 1623 гепатоциты - продуценты альбумина страдают менее значительно, чем в модели 5266, и в этом случае потенциальная гипоальбуминемия может быть обусловлена тотальным поражением проксимальных канальцев почек и блоком реабсорбции. Гистологические изменения селезенки мышей, зараженных разными штаммами Ра, были различны в двух созданных моделях. Реакция белой пульпы – той части органа, которая представлена массивом лимфоцитов, выглядела в виде гиперплазии в модели 1623 и гипоплазии - в модели 5266. Независимо от этого, у животных обеих моделей реактивные изменения белой пульпы сопровождались массовым апоптозом лимфоцитов. Апоптоз, в отличие от некроза, принято считать «ненасильственной смертью клетки». Этот вариант самоуничтожения клеток работает как важное слагаемое в поддержании пролиферативно-апоптотического баланса в физиологическом гистогенезе тканей [11], и при разной патологии может выступать либо как позитивный, либо как негативный фактор, приводящий к сдвигу указанного баланса. Столь манифестное проявление апоптоза лимфоцитов в наших моделях (в том числе, - при сопутствующей

апоптозу гиперплазии белой пульпы в модели 1623) объяснить с позиции классических представлений об апоптозе достаточно сложно. В такой «аварийной» для организма ситуации, каким является сепсис, правомерно было бы ожидать обратного – возникновения гиперплазии и экспансии лимфоцитов при отсутствии апоптоза. Несомненную пользу в исследовании септической селезенки оказало бы фенотипирование лимфоцитов контрольных и подопытных животных, осуществить которое в рамках проведенного эксперимента не представлялось возможным. Данные фенотипирования, выполненного другими исследователями [124], указали на то, что при сепсисе особо значима потеря В- и CD4-Т-клеток, а митохондриально-зависимый апоптоз Т-лимфоцитов является потенциальным фактором определения тяжести сепсиса [26, 155, 170, 174]

Хотя предполагается, что потеря лимфоцитов является пагубной для выживания пациентов с сепсисом из-за развития иммуносупрессии, возможно, что именно апоптоз лимфоцитов может привести к снижению продукции провоспалительных цитокинов, которые вызывают или способствуют синдрому системного воспалительного ответа и повреждению органов при сепсисе [187].

Индукторами апоптоза, как считают [124], могут выступать стероиды, фактор некроза опухоли ФНО, высокоподвижный белок группы box-1 (HMGB1), Fas -лиганд (FasL), тепловой шок, свободные радикалы кислорода, оксид азота (NO), глюкокортикоиды, гранзимы и др., иными словами то огромное количество разных биологически активных факторов, которые сегодня, по данным разных авторов, претендуют на «ключевые молекулы» в патогенезе сепсиса. Выяснение механизма, запускающего апоптоз лимфоцитов при столь тяжелой патологии как сепсис, когда необходима их активная функция, направленная на уничтожение патогенов, представляет сложную самостоятельную проблему. Не исключено, что именно самоуничтожение лимфоцитов по неясной причине и составляет основу неэффективности иммунной функции при сепсисе, даже если существенно активируется процесс гиперплазии белой пульпы (в нашем случае – в модели 1623), направленный на поддержание этой функции. Если гипоплазию белой пульпы при введении штамма 5266 можно однозначно трактовать как

неблагоприятный прогностический признак сепсиса, то гиперплазию белой пульпы у животных, получивших штамм 1623, оценивать как позитивный признак, по всей видимости, также нельзя из-за одновременно высокой активности апоптоза лимфоцитов, а также наиболее раннего наступления терминальной стадии у животных этой группы.

Полученные результаты анализа морфологических изменений селезенки свидетельствуют о разном характере ее реактивных изменений в зависимости от штамма *P. aeruginosa* и важной отрицательной роли апоптоза лимфоцитов в патогенезе синегнойного сепсиса.

Обнаруженные нами на субмикроскопическом уровне в кровеносных сосудах (в обеих моделях) признаки «взаимодействия» Ра с плазмой крови и эритроцитами в виде исчезновения физиологической мелкозернистой текстуры плазмы крови вокруг Ра и перехода эритроцитов в эхиноциты —, заслуживают с нашей точки зрения, особого внимания, поскольку допускают возможное влияние патогенов Ра на мембрану и скелет эритроцитов, элементы которого в норме «удерживают» Нб. С этим могут быть связаны потеря эритроцитами Нб-связывающего свойства и повышение уровня свободного Нб при сепсисе [54]. В экспериментальных моделях свободный Нб увеличивает летальность во время эндотоксемии с помощью механизма, который включает сенсibilизацию моноцитов и макрофагов, повышение уровней провоспалительных факторов [231].

В нескольких недавних исследованиях сообщалось о важной роли эритроцитов в модуляции микроциркуляции и по этим причинам эритроциты уже не рассматриваются как «постклеточные структуры» для транспорта O₂ и CO₂, а как живые элементы крови, способные воздействовать на микроциркуляцию в ответ на различные раздражители. Изменение формы эритроцитов при сепсисе, но по типу сфероцитоза, описаны и другими исследователями [183]. Представляется важным продолжение исследований по влиянию Ра на структурно-функциональный статус эритроцитов при сепсисе, поскольку не исключено, что обозначенные выше изменения красных кровяных телец в комплексе с другими

факторами (снижением уровня альбумина в крови и др.) потенцируют изменение гликокаликса микрососудов, приводящее к развитию так называемой капиллярной утечки и мультиорганной дисфункции.

Выявив приведенные выше морфологические детали нарушений исследованных органов у септических животных, мы надеемся, что этим дополнили существующие представления о патогенетических механизмах сепсиса и, вместе с тем, обозначили новые неясные аспекты этой проблемы.

Что касается апробирования в созданных моделях сепсиса действия Астрабионорма, то надо сказать, что эффективные лекарственные средства для лечения сепсиса, к сожалению, в настоящее время отсутствуют и отчасти это объясняется многими до сих пор не понятыми аспектами патогенеза сепсиса. Поскольку даже антибиотики нового поколения в этом плане малоэффективны, необходим поиск других средств. По нашим данным, Астрабионорм, эффективность которого проверена нами в двух моделях сепсиса (1623 и 5266), *in vitro* подавлял рост и подвижность обоих штаммов *Pa*. Создатели Астрабионорма [10] связывают данное, скорее всего, бактерицидное свойство препарата с присутствием в его составе альдегида муравьиной кислоты. В нашем исследовании показано подавление подвижности и роста *P. aeruginosa* 1623 и *P. aeruginosa* 5266 *in vitro*, а также отсутствие высева из органов после лечения мышей. Данные результаты могут указывать на то, что мишенью, возможно, являются жгутики, способствующие повреждению барьерных свойств брюшины в моделях экспериментального сепсиса. Как мы предполагаем, Астрабионорм обеспечивает снижение проникновения *P. aeruginosa* через брюшину, снижает устойчивость *Pa* к поглощению макрофагами и не дает им попасть в кровоток, на что указывает снижение их высеваемости из крови [243]. Известно, что жгутик и Система секреции третьего типа имеют общие черты, обладая способностью реагировать на близость к эукариотическим клеткам. При контакте с эукариотической клеткой, увеличивается нагрузка на «двигатель» жгутика *P. aeruginosa*, приводя к уменьшению экспрессии генов белков, которые необходимы для подвижности. Сходным образом реагирует и ССЗТ, регулируя

экспрессию генов [40, 161, 263]. По всей видимости, препарат способен блокировать функциональную активность жгутиков.

Известно, что *in vivo* альдегид муравьиной кислоты в минимальных количествах образуется в организме человека и в ходе физиологического метаболизма [235], а в очагах воспаления возникают его значительно более высокие концентрации. Учитывая свойство альдегида муравьиной кислоты способствовать коагуляции белков, можно полагать, что при развитии воспаления в организме срабатывает защитная реакция в виде повышения эндогенного уровня альдегида муравьиной кислоты, направленная на уничтожение продуктов распада тканей (преимущественно белкового характера) и, возможно, - на удаление самого патогена, однако без пагубного влияния на белки собственных здоровых тканей. Астрабионорм близок по составу к отечественному препарату «Кальцекс», действующим началом которого является гексаметиленetetрамин. Кальцекс использовался для профилактики и лечения вирусных и бактериальных инфекций в годы Великой Отечественной войны и длительное время - в послевоенные годы.

Лечебное и профилактическое действие гексаметилентетрамина основано на том, что в кислой среде, возникающей в тканях при воспалении, он распадается с образованием альдегида муравьиной кислоты, вызывающей деструкцию патогенов. В рамках разработанных моделей сепсиса апробировано действие Астрабионорма - препарата, содержащего микродозы (0,073-0,075%) альдегида муравьиной кислоты в изотоническом растворе.

К сожалению, мы не располагаем литературной информацией (ввиду ее полного отсутствия) для привлечения к обсуждению полученных нами данных по эффекту Астрабионорма. Будучи двукратно введенным животным после внутрибрюшинной инъекции Ра, когда уже были явными признаки заболевания, он показал замечательный результат – выжили все 100% леченых Астрабионормом мышей. И это мы связываем, прежде всего, с губительным действием Астрабионорма на Ра, поскольку уже на 7-е сутки *P. aeruginosa* практически не высевались ни из крови, ни из гомогенатов органов животных

обеих моделей. Как показали испытания свойств Астрабионорма, в использованных концентрациях он не является токсичным для организма животных, а при повторном введении зараженным животным предотвращает разрушения гистоструктуры пяти исследованных нами органов, вызывая гибель возбудителей. При последующем (в течение полугода) наблюдении над лечеными Астрабионормом мышами не было выявлено каких-либо отклонений в их состоянии. Учитывая сказанное, считаем целесообразным продолжать изучение действия сверхмалых доз альдегида муравьиной кислоты не только на течение сепсиса, но и воспаления как базисного процесса общей патологии. То, что альдегид муравьиной кислоты концентрируется в очагах воспаления, может быть естественным механизмом защиты и наша помощь организму в борьбе с воспалением путем введения дополнительных количеств альдегида муравьиной кислоты, по-видимому, является усилением этого механизма, что и приводит к выживанию септических животных.

Исходя из полученных данных бактериологического анализа и результатов проведенного морфологического исследования, считаем, что ранняя бактериологическая диагностика синегнойного сепсиса возможна уже в 1 - е минуты после заражения и разработка средств лечения синегнойного сепсиса (с учетом быстро наступающего обсеменения всех органов) должна быть, в первую очередь, направлена на уничтожение возбудителя.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного комплексного анализа патогенных свойств штаммов *P. aeruginosa* 1623 и *P. aeruginosa* 5266, бактериологического исследования (высевы штаммов из крови, перитонеальной жидкости и гомогенатов органов), гистологического анализа органов позволяют заключить, что внутрибрюшинное введение *P. aeruginosa* в примененных дозах (для штамма 1623 - 7×10^6 КОЕ/мышь; для штамма 5266 - 3×10^7 КОЕ/мышь), вызывают острый

экспериментальный сепсис, который характеризуется развитием ранней бактериемии, (в течение 15 – 30 минут), быстрым (в пределах первого часа после заражения) обсеменением органов, летальностью 100% животных в течение 24-26 часов. Ведущей причиной летальности предположительно могут быть глубокие нарушения в гистологической структуре легких и надпочечников.

Результаты проведенного комплексного анализа влияния Астрабионорма на свойства штаммов Ра 1623 и Ра 5266, бактериологические показатели высевок, гистологические характеристики исследованных органов, позволяют сделать заключение о его терапевтической эффективности.

ВЫВОДЫ

1. Отобранные штаммы *P. aeruginosa* 1623 и *P. aeruginosa* 5266 отличаются по наличию генов экзотоксинов U, S и степени фосфолипазной и гемолитической активности, а также по степени подвижности.

2. Величина LD₅₀ при внутрибрюшинном заражении мышей, равная для штамма *P. aeruginosa* 1623 $6,2 \times 10^6$ КОЕ/мышь, вызывает гибель животных в течение 72 часов; для штамма *P. aeruginosa* 5266 LD₅₀ составляет $1,3 \times 10^7$ КОЕ/мышь и вызывает гибель животных в течение 48 часов. Дозы LD₁₀₀, приводящие к терминальной стадии для штамма *P. aeruginosa* 1623 составляют 7×10^6 КОЕ/мышь (терминальная стадия достигается в течение 24–26 часов); для штамма *P. aeruginosa* – 5266 3×10^7 КОЕ/мышь (терминальная стадия достигается в течение 20–24 часов).

3. Резкое возрастание показателей высева штамма *P. aeruginosa* 1623 из крови через 15 минут после заражения совпадает со снижением уровня высева из перитонеальной жидкости, что свидетельствует о высокой скорости проникновения *P. aeruginosa* 1623 в кровоток. Дальнейшее (вплоть до 180 минут после заражения) плавное снижение уровней высева из крови и перитонеальной жидкости, сопровождающееся высоким уровнем высеваемости из гомогенатов органов, объясняется интернализацией *P. aeruginosa* в паренхиматозные органы. Последующее возрастание уровней высевок из крови и перитонеальной жидкости на терминальной стадии сепсиса обусловлены деструкцией клеток органов и выходом значительной части бактериальных клеток обратно в кровоток и перитонеальную жидкость.

4. Выявленные отличия морфологических изменений печени, селезенки и почек в созданных моделях указывают на существование зависимости между степенью их структурных изменений и биологическими свойствами конкретного штамма *Pseudomonas aeruginosa*:

– некротические изменения печени в модели 5266 сопровождаются тромбообразованием, венозным застоем, гемокапиллярным стазом. В модели 1623

деструкция гепатоцитов проявляется на субклеточном уровне без признаков тромбоза и лейкоцитарной инфильтрации;

- реактивные изменения селезенки в модели 1623 заключаются в гиперплазии, в модели 5266 – в гипоплазии белой пульпы; облигатным для обеих моделей является апоптоз лимфоцитов;

- септическое поражение почек более выражено в рамках модели 1623 и заключается в деформации телец фильтрующих нефронов и гибели их клеток; в деструкции субкапсулярно расположенных проксимальных канальцев корковых нефронов, признаках нарушения реабсорбции белка в проксимальных канальцах промежуточных нефронов, выраженном кровенаполнении клубочковой сети юкстамедуллярных нефронов при резком снижении кровенаполнения капиллярных сетей фильтрующих нефронов.

5. Реактивные изменения лёгких в обеих моделях однотипны и заключаются в воспалительной реакции без признаков тромбоза и некроза, деструктивных изменениях с явлениями клазматоза слизистой оболочки мелких бронхов и частичной облитерации их просветов, способствующей неравномерному аэрированию легочной паренхимы и разрывам легочных ацинусов.

6. Структурные изменения надпочечников в обеих моделях представлены венозным полнокровием мозгового вещества, редукцией столбчатой части пучковой зоны коры, деструкцией кортикостероцитов и хромаффиноцитов, что указывает на существенное нарушение структуры надпочечников к терминальной стадии сепсиса. Высокие уровни мРНК провоспалительных цитокинов (ИЛ–1бета, ИЛ–6, ФНО) в тканях надпочечников и положительная реакция иммуномечения на ИЛ–1бета свидетельствуют об участии надпочечников в создании дисбаланса цитокинов при сепсисе.

7. Обнаруженное при электронной микроскопии крови животных отсутствие мелкодисперсной текстуры плазмы крови в окружении *P. aeruginosa* и признаки трансформации эритроцитов в эхиноциты позволяют предполагать прямое действие факторов вирулентности Ра на белки плазмы крови и фосфолипидный состав мембран эритроцитов.

8. Лекарственное средство Астрабионорм подавляет *in vitro* подвижность и размножение штаммов *P. aeruginosa* 1623 и *P. aeruginosa* 5266; при внутримышечном введении мышам не оказывает негативного влияния на состояние их скелетной мышечной ткани и сосудов, а также на общее состояние животных.

9. 100%-ное выживание инфицированных животных, получавших лечение Астрабионормом, соответствие структуры исследованных органов их физиологическому состоянию, снижение уровней высева *P. aeruginosa* из крови и органов в первые часы сепсиса и отсутствие высева на 7 сутки после окончания лечения, позволяют сделать заключение об эффективности Астрабионорма и возможности использования разработанной экспериментальной модели синегнойного сепсиса для оценки эффективности лекарственных средств.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Полученные результаты по разработке экспериментальной модели сепсиса, позволят применять ее для изучения патогенеза сепсиса, а также для апробирования лекарственных препаратов.

Положительные результаты лечения Астрабионормом мышей с экспериментальным сепсисом, позволяют рекомендовать дальнейшее изучение терапевтического эффекта этого препарата на основе сверхмалых доз альдегида муравьиной кислоты, в практическом здравоохранении.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Перспективы дальнейшей разработки темы лежат в продолжении изучения патогенеза септического процесса, в зависимости от патогенетического профиля *P. aeruginosa*. В дальнейшем планируется продолжить исследование

фенотипических и генотипических свойства штаммов на более многочисленной выборке изолятов *P. aeruginosa*.

На разработанной модели сепсиса планируется изучать патоморфологические и молекулярно – биологические процессы в других органах, а также апробировать новые лекарственные средства.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Боровая, Т.Г. Реактивные изменения надпочечников в модели сепсиса / Т.Г. Боровая, **М.Н. Черкасова**, В.Г. Жуховицкий // Вопросы морфологии XXI века. – 2021. – Выпуск 6. – С. 25-28.

2. **Черкасова, М.Н.** К проблеме экспериментального моделирования сепсиса / **М.Н. Черкасова** // Успехи современной биологии. – 2021. – Т. 141, №4. – С. 368–381. DOI: 10.31857/S0042132421030054

3. **Черкасова, М.Н.** Результаты структурного и бактериологического анализа надпочечников мыши в модели сепсиса / **М.Н. Черкасова**, Т.Г. Боровая, В.Г. Жуховицкий, В.Г. Пухальская // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2021. – Т. 173., №1. – С. 80-85. DOI: 10.47056/0365–9615–2022–173–1–80–85

4. **Черкасова, М.Н.** К вопросу о поиске эффективных средств лечения сепсиса / **М.Н. Черкасова**, В.Н. Ласкавый, Т.Г. Боровая, В.Г. Жуховицкий, О.М. Седнев // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2022. – Т. 174, №9. – С. 374-379. DOI: 10.47056/0365–9615–2022–174–9–374–379

5. Боровая, Т.Г. Оценка модулирующего влияния экспериментального препарата «Астрабионорм» на синтез провоспалительного цитокина IL-1 β и противовоспалительного цитокина IL-10 в клетках красной пульпы селезёнки мыши в модели сепсиса / Т.Г. Боровая, **М.Н. Черкасова**, В.Г. Жуховицкий, В.Н. Ласкавый, О.М. Седнев // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2023. – Т. 176. – №12. – С. 757-761. DOI: 10.47056/0365–9615–2023–176–12–757–761

Тезисы:

1. **Черкасова, М.Н.** Экспериментальная модель оценки эффективности средств лечения сепсиса / **М.Н. Черкасова**, Т.Г. Боровая, В.Г. Жуховицкий // Материалы научно-практических конференций в рамках VII Российского конгресса лабораторной медицины (РКЛМ 2021): сборник тезисов. – М.: Издательство: «У Никитских ворот», 2021. – С. 18.

2. Боровая, Т.Г. Морфологические изменения органов в моделях бактериальной и вирусной инфекций / Т.Г. Боровая, Н.В. Шевлягина, В.Г. Жуховицкий, **М.Н. Черкасова** // IX Всероссийский съезд анатомов, гистологов и эмбриологов России с международным участием «Фундаментальная и прикладная морфология в XXI веке». – Оренбургский медицинский вестник. Научно – практический журнал. – 2025. – Т. XIII. – № 2 (50). – С. 86.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белянин, В.Л. Сепсис. Патологическая анатомия: пособие для врачей / В.Л. Белянин, М.Г. Рыбакова; под общ. ред. Г.Б. Ковальского. – Санкт – Петербург: ГПАБ, 2004. – 56 с.
2. Буданцев, А.Ю. Основы гистохимии. Электронный макет учебного пособия / А.Ю. Буданцев. – Пушкино: Электронное издательство «Аналитическая микроскопия», 2008. – 214с.
3. Винокуров, В.Г. Медицинское и фармацевтическое обеспечение тыловых лечебных учреждений в годы Великой Отечественной войны / В.Г.Винокуров, А.В. Белостоцкий, А.М. Алленов, А.С. Винокурова, А. С Алленова // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2015. – № 3. – С. 342 – 348.
4. Гельфанд, Б.Р. Сепсис: классификация, клинико–диагностическая концепция и лечение / под ред. акад. РАН Б.Р. Гельфанда. — 4-е изд., доп. и перераб. — Москва: ООО «Медицинское информационное агентство», 2017. — 408 с.
5. Гоманова, Л.И. Сепсис в XXI веке: этиология, факторы риска, эпидемиологические особенности, осложнения, профилактика / Л.И. Гоманова, А.Ю. Бражников // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2021. — Том 20, № 3. — С.107 – 117
6. Корнеев, К.В. Мышинные модели сепсиса и септического шока / К.В. Корнеев // Молекулярная биология. — 2019. — Том 53, № 5. — С.799–814.
7. Лазарева, А.В. *Pseudomonas aeruginosa*: патогенность, патогенез и патология / А.В Лазарева, И.В. Чеботарь, О.А. Крыжановская, В.И. Чеботарь, Н.А. Маянский // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. — 2015. — Т. 17, № 3. — С.170–186.
8. Малютина, Н.Н. Патофизиологические и клинические аспекты воздействия метанола и формальдегида на организм человека / Н.Н. Малютина, Л.А. Тараненко // Современные проблемы науки и образования. — 2014. — № 2.

— URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=12826> (дата обращения: 13.09.2022).

9. Мишнев, О.Д. Патологоанатомическая диагностика сепсиса: методические рекомендации / О.Д. Мишнев, А.И. Щеголев, О.А. Трусов. — Москва. — 2004. — 19 с.

10. Патент РФ № 2 738 719 С1. Средство для лечения коронавирусных, ретровирусных инфекций и гепатита С / заявители и патентообладатели В.Н. Ласкавый, М.А. Шурдов. — № 2020112322; заявл. 26.03.20; опубл. 15.12.2020, Бюл. №35 — 11с.

11. Руководство по гистологии / Под редакцией Р. К. Данилова. — 2-е изд., испр. и доп. СПб.: СпецЛит, 2011. — 511с.

12. Симбирцев А.С. Цитокины — новая система регуляции защитных реакций организма / А.С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. — 2002. — Т. 1, № 1. — С. 9-16

13. Симбирцев А.С. Цитокины: классификация и биологические функции / А.С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. — 2004. — Т. 3, № 2. — С. 16-22

14. Урбах, В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях / В.Ю. Урбах. — Акад. мед. наук СССР. — Москва : Медицина, 1975. — 295 с.

15. Черкасова, М.Н. К проблеме экспериментального моделирования сепсиса / М.Н. Черкасова // Успехи современной биологии. — 2021. — Т. 141, № 4. — С. 368–381.

16. Черных Е.Р. Цитокиновый баланс в патогенезе системного воспалительного ответа: новая мишень иммунотерапевтических воздействий при лечении сепсиса / Е.Р. Черных, О.Ю. Леплина, М.А. Тихонова // Медицинская иммунология. — 2001. — Т. 3, № 3. — С. 415–429.

17. Чирский, В.С. Морфологические особенности поражения сосудов микроциркуляторного русла при сепсисе / В.С. Чирский, Е.А. Андреева, А.К. Юзвинкевич // Ученые записки СПбГМУ им. И. П. Павлова. — 2020. — Т. 27, № 3. — С. 72–79.

18. Чирский, В.С. Патологоанатомические характеристики при грамположительном и грамотрицательном сепсисе / В.С. Чирский, Е.А. Андреева, А.К. Юзвинкевич, И.В. Гайворонский // Вятский медицинский вестник. — 2020. — Т. 1, № 65. — С. 56–62.
19. Шеремет, А.Б. Третья транспортная система *Pseudomonas aeruginosa* как мишень для разработки антивирулентных препаратов / А.Б. Шеремет, Л.Н. Нестеренко, Н.А. Зигангирова // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. — 2020. — Т. 38, № 1. — С. 3–14.
20. Abdullahi, A. Animal models in burn research / A. Abdullahi, S. Amini-Nik, M.G. Jeschke // Cellular and molecular life sciences: CMLS. — 2014. — Vol. 71, № 17. — P. 3241 — 3255.
21. Adembri, C. Sepsis induces albuminuria and alterations in the glomerular filtration barrier: a morphofunctional study in the rat / C. Adembri, E. Sgambati, L. Vitali, V. Selmi, M. Margheri, A. Tani, L. Bonaccini, D. Nosi, A.L. Caldini, L. Formigli, A.R. De Gaudio // Critical care. — 2011. — Vol. 15, № 6. — P. R277.
22. Ajayi, T. Single-nucleotide-polymorphism mapping of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion toxins for development of a diagnostic multiplex PCR system / T. Ajayi, L.R. Allmond, T. Sawa, J.P. Wiener-Kronish // Journal of clinical microbiology. — 2003. — Vol. 41, № 8. — P. 3526–3531.
23. Aksu, U. The Pathogenesis of Acute Kidney Injury and the Toxic Triangle of Oxygen, Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide / U. Aksu, C. Demirci, C. Ince // Contributions to nephrology. — 2011. — Vol. 174. — P. 119–128.
24. Al Shoyaib, A. Intraperitoneal Route of Drug Administration: Should it Be Used in Experimental Animal Studies? / A. Al Shoyaib, S.R. Archie, V.T. Karamyan // Pharmaceutical research. — 2019. — Vol. 37, № 1. — P. 12.
25. Alhede, M. *Pseudomonas aeruginosa* recognizes and responds aggressively to the presence of polymorphonuclear leukocytes / M. Alhede, T. Bjarnsholt, P.Ø. Jensen, R.K. Phipps, C. Moser, L. Christophersen, L.D. Christensen, M. van Gennip, M. Parsek, N. Høiby, T.B. Rasmussen, M. Givskov // Microbiology. — 2009. — Vol. 155, № 11. — P. 3500–3508.

26. Alves-Filho, F. J. Neutrophil paralysis in sepsis / J.C. Alves-Filho, F. Spiller, F.Q. Cunha // *Shock*. — 2010. — Vol. 34, № 1. — P. 15–21.
27. Amiel, E. *Pseudomonas aeruginosa* evasion of phagocytosis is mediated by loss of swimming motility and is independent of flagellum expression / E. Amiel, R.R. Lovewell, G.A. O'Toole, D.A. Hogan, B. Berwin // *Infection and immunity*. — 2010. — Vol. 78, № 7. — P. 2937–2945.
28. Arafah B.M. Hypothalamic pituitary adrenal function during critical illness: Limitations of current assessment methods / B.M. Arafah // *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. — 2006. — Vol. 91, № 10. — P. 3725–3745.
29. Arulkumaran N. Sequential Analysis of a Panel of Biomarkers and Pathologic Findings in a Resuscitated Rat Model of Sepsis and Recovery / N. Arulkumaran, M.L. Sixma, E. Jentho, E. Ceravola, P.S. Bass, J.A. Kellum, R.J. Unwin, F.W.K. Tam, M. Singer // *Critical care medicine*. — 2017. — Vol. 45, №8 . — P. e821–e830.
30. Aslan, A. Kidney histopathology in lethal human sepsis / A. Aslan, M.C. van den Heuvel, C.A. Stegeman, E.R. Popa, A. Leliveld, G. Molema, J.G. Zijlstra, J. Moser, M. Van Meurs // *Critical care*. — 2018. — Vol. 22, № 1. — P. 359.
31. Ayala, A. Differential induction of apoptosis in lymphoid tissues during sepsis: variation in onset, frequency, and the nature of the mediators / A. Ayala, C.D. Herdon, D.L. Lehman, C.A. Ayala, I.H. Chaudry // *Blood*. — 1996. — Vol. 87, № 10. — P. 4261–4275.
32. Ayala, A. Does Fas ligand or endotoxin contribute to thymic apoptosis during polymicrobial sepsis? / A. Ayala A., Y.X. Xu, C.S. Chung, I.H. Chaudry // *Shock*. — 1999. — Vol. 11, № 3. — P. 211–217.
33. Bachta, K. E. R. Systemic infection facilitates transmission of *Pseudomonas aeruginosa* in mice / Systemic infection facilitates transmission of *Pseudomonas aeruginosa* in mice / K. E. R. Bachta, J. P. Allen, B. H. Cheung, C. H. Chiu, A. R. Hauser // *Nature communications*. — 2020. — Vol. 11, № 1. — P. 543.
34. Bae, J. S. Role of high mobility group box 1 in inflammatory disease: focus on sepsis / J. S. Bae // *Archives of pharmacal research*. — 2012. — Vol. 35, № 9. — P. 1511–1523.

35. Bae, S. Alcohol dehydrogenase 5 Is a source of formate for de novo purine biosynthesis in HepG2 Cells / S. Bae, J. Chon, M.S. Field, P.J. Stover // The Journal of nutrition. — 2017. — Vol. 147, № 4. — P. 499–505.
36. Bakowitz, M. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome in the injured patient / M. Bakowitz, B. Bruns, M. McCunn // Scandinavian journal of trauma, resuscitation and emergency medicine. — 2012. — Vol. 20. — P. 54.
37. Balasubramanian, D. A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence / D. Balasubramanian, L. Schneper, H. Kumari, K. Mathee // Nucleic acids research. — 2013. — Vol. 41, № 1. — P. 1–20.
38. Beckert, U. ExoY from *Pseudomonas aeruginosa* is a nucleotidyl cyclase with preference for cGMP and cUMP formation / U. Beckert, S. Wolter, C. Hartwig, H. Bähre, V. Kaefer, D. Ladant, D. W. Frank, R. Seifert // Biochemical and biophysical research communications. — 2014. — Vol. 450, № 1. — P. 870–874.
39. Belas, R. Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria / R. Belas // Trends in microbiology. — 2014. — Vol. 22, № 9. — P. 517–527.
40. Bellomo, R. Septic acute kidney injury: new concepts / R. Bellomo, L. Wan, C. Langenberg, C. May // Nephron. Experimental nephrology. — 2008. — Vol. 109, № 4. — P. e95–100.
41. Berube B. J. Impact of type III secretion effectors and of phenoxyacetamide inhibitors of type III secretion on abscess formation in a mouse model of *Pseudomonas aeruginosa* infection / B. J. Berube, K. R. Murphy, M. C. Torhan, N. O. Bowlin, J. D. Williams, T. L. Bowlin, D. T. Moir, A. R. Hauser // Antimicrobial agents and chemotherapy. — 2017. — T. 61. — № 11.
42. Bone, R.C. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians. Society of Critical Care Medicine / R. C. Bone, R. A. Balk, F. B. Cerra, R. P. Dellinger, A. M. Fein, W. A. Knaus, R. M. Schein, W. J. Sibbald // Chest. — 1992. — Vol. 101, №6. — P. 1644–1655.

43. Bornstein, S.R. Cytokines and steroidogenesis / S.R. Bornstein, H. Rutkowski, I. Vrezas // *Molecular and cellular endocrinology*. — 2004. — Vol. 215, № 1, № 2. — P. 135–41.
44. Bosmann, M. Regulation of IL-17 family members by adrenal hormones during experimental sepsis in mice / M. Bosmann, F. Meta, R. Ruemmler, M.D. Haggadone, J.V. Sarma, F.S. Zetoune, P.A. Ward // *The American journal of pathology*. — 2013. — Vol. 182, № 4. — P. 1124–1130.
45. Botelho, J. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*—mechanisms, epidemiology and evolution / Botelho, J., Grosso, F. & Peixe, L. // *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*. — 2019. — Vol. 44 — P. 100640.
46. Bouillot, S. *Pseudomonas aeruginosa* Exolysin promotes bacterial growth in lungs, alveolar damage and bacterial dissemination. / S. Bouillot, P. Munro, B. Gallet, E. Reboud, F. Cretin, G. Golovkine, G. Schoehn, I. Attrée, E. Lemichez, P. Huber // *Scientific reports*. — 2017. — Vol. 7, № 1. — P. 2120.
47. Bouteiller, M. *Pseudomonas* Flagella: Generalities and Specificities / M. Bouteiller, C. Dupont, Y. Bourigault, X. Latour, C. Barbey, Y. Konto-Ghiorgi, A. Merieau // *International journal of molecular sciences*. — 2021. — Vol. 22, № 7. — P. 3337.
48. Brenner, B.M. *The Kidney* / B.M. Brenner, F.C. Rector // Philadelphia PA: Saunders Elsevier. — 2008. — Vol. 2. — P. 2241.
49. Briegel, J. Cortisol in critically ill patients with sepsis—physiological functions and therapeutic implications / J. Briegel // *Wien Klin Wochenschr*. — 2002. — Vol. 114, № 1. — P. 9–19.
50. Bucior, I. *Pseudomonas aeruginosa* pili and flagella mediate distinct binding and signaling events at the apical and basolateral surface of airway epithelium / I. Bucior, J.F. Pielage, J.N. Engel // *PLoS pathogens*. — 2012. — Vol. 8, №. 4. — P. e1002616.
51. Burgos-Barragan, G. Mammals divert endogenous genotoxic formaldehyde into one-carbon metabolism / G. Burgos-Barragan, N. Wit, J. Meiser, F.A. Dingler, M.

Pietzke, L. Mulderrig, L.B. Pontel, I.V. Rosado, T.F. Brewer, R.L. Cordell, P.S. Monks, C.J. Chang, A. Vazquez, K.J. Patel // *Nature*. — 2017. — Vol. 548, № 7669. — P. 549–554.

52. Cai, Y. Activity of colistin alone or in combination with rifampicin or meropenem in a carbapenem-resistant bioluminescent *Pseudomonas aeruginosa* intraperitoneal murine infection model / Y. Cai, D. Yang, J. Wang, R. Wang // *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. — 2018. — Vol. 73, № 2. — P. 456–461.

53. Casilag F. LasB elastase of *Pseudomonas aeruginosa* acts in concert with alkaline protease AprA to prevent flagellin-mediated immune recognition / F. Casilag, A. Lorenz, J. Krueger, F. Klawonn, S. Weiss, S. Häussler // *Infection and Immunity*. — 2015. — Vol. 84, № 1 — P.162–171.

54. Chan, C.Y. Erythrocyte degradation, metabolism, secretion, and communication with immune cells in the blood during sepsis: A review / C.Y. Chan, C.F. Cheng, H.A. Shui, H.C. Ku, W.L. Su // *Tzu chi medical journal*. — 2021. — Vol. 34, № 2. — P. 125–133.

55. Chan C.M. Etomidate is associated with mortality and adrenal insufficiency in sepsis: a meta-analysis* / C.M. Chan, A.L. Mitchell, A.F. Shorr // *Critical care medicine*. — 2012. — Vol. 40, №11. — P. 2945–2953.

56. Chappell, D. The impact of the glycocalyx on microcirculatory oxygen distribution in critical illness / D. Chappell, M. Westphal, M. Jacob // *Current opinion in anaesthesiology*. — 2009. — Vol. 22, № 2. — P. 155–162.

57. Charlton, M. The microcirculation and its measurement in sepsis / M. Charlton, M. Sims, T. Coats, J.P. Thompson // *Journal of the Intensive Care Society*. — 2017.— Vol. 18, № 3. — P. 221–227.

58. Chavez, A. New insights into the regulation of vascular permeability / A. Chavez, M. Smith, D. Mehta // *International review of cell and molecular biology*. — 2011. — Vol. 290. — P. 205–248.

59. Chen C.H., Lu T.K. Development and Challenges of Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications / C.H. Chen, T.K.Lu // *Antibiotics (Basel, Switzerland)*. — 2020. — Vol. 9, № 1. — P. 24.

60. Chen, P. Differences Between Murine and Human Sepsis / P. Chen, M. Stanojcic, M. G. Jeschke // *Surgical Clinics of North America*. — 2014. — Vol. 94, № 6. — P.1135–1149.
61. Choi, E.Y. Mechanisms of neutrophil transendothelial migration / E.Y. Choi, S. Santoso, T. Chavakis // *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*. — 2009. — Vol.14, № 5. — P. 1596–1605.
62. Chvojka, J. Renal haemodynamic, microcirculatory, metabolic and histopathological responses to peritonitis-induced septic shock in pigs / J. Chvojka, R. Sykora, A. Krouzecky, J. Radej, V. Varnerova, T. Karvunidis, O. Hes, I. Novak, P. Radermacher, M. Matejovic // *Critical care (London, England)*. — 2008. — Vol. 12, № 6. — P. 149–164.
63. Cirioni, O. Efficacy of colistin/rifampin combination in experimental rat models of sepsis due to a multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strain / O. Cirioni, R. Ghiselli, F. Orlando, C. Silvestri, F. Mocchegiani, M. Rocchi, L. Chiodi, A. Abbruzzetti, V. Saba, G. Scalise, A. Giacometti // *Critical care medicine*. — 2007. — Vol. 35, № 7. — P. 1717–1723
64. Cirioni, O. Protective effects of the combination of alpha-helical antimicrobial peptides and rifampicin in three rat models of *Pseudomonas aeruginosa* infection / O. Cirioni, C. Silvestri, R. Ghiselli, F. Orlando, A. Riva, F. Mocchegiani, L. Chiodi, S. Castelletti, E. Gabrielli, V. Saba, G. Scalise, A. Giacometti // *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. — 2008. — Vol. 62, № 6. — P. 1332–1338.
65. Cornelis, P. Iron Uptake and Metabolism in *Pseudomonads* / P. Cornelis // *Applied microbiology and biotechnology*. — 2010. — Vol. 86, №. 6, — P. 1637–1645.
66. Cornelis, P. *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections / P. Cornelis, J. Dingemans // *Frontiers in cellular and infection microbiology*. — 2013. — Vol. 3, № 7. — P. 75.
67. Cunningham, P.N. Acute renal failure in endotoxemia is caused by TNF acting directly on TNF receptor-1 in kidney / P.N. Cunningham, H.M. Dyanov, P. Park, J. Wang, K.A. Newell, R.J. Quigg // *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* . — 2002. — Vol. 168, № 11. — P. 5817–5823.

68. Cunrath, O. The Pathogen *Pseudomonas aeruginosa* optimizes the production of the siderophore pyochelin upon environmental challenges / O. Cunrath, G. Graulier, A. C. Lopez, J. Perard, P. Fechter // *Metallomics: integrated biometal science*. — 2020. — Vol. 12, №12. — P. 2108–2120.

69. Curley, G.F. Biotrauma and ventilator-induced lung injury: clinical implications / G.F. Curley, J.G. Laffey, H. Zhang, A.S. Slutsky // *Chest*. — 2016. — Vol. 150., № 5— P. 1109–1117

70. Cymeryng, C.B. Effect of nitric oxide on rat adrenal zona fasciculata steroidogenesis / C.B. Cymeryng, L.A. Dada, E.J. Podestá // *The Journal of endocrinology*. — 1998. — Vol. 158, № 2. — P. 197–203.

71. Dacheux, D. Pore-forming activity of type III system-secreted proteins leads to oncosis of *Pseudomonas aeruginosa*-infected macrophages / D. Dacheux, J. Goure, J. Chabert, Y. Usson, I. Attree // *Molecular microbiology*. — 2001. — Vol. 40, № 1. — P. 76–85.

72. Darwin, K.H. The aldehyde hypothesis: metabolic intermediates as antimicrobial effectors / K.H. Darwin, S.A. Stanley // *Open biology*. — 2022. — Vol. 12, № 4. — P. 220010.

73. De Cruz, S.J. Bench-to-bedside review: the role of nitric oxide in sepsis / S.J. De Cruz, N.J. Kenyon, C.E. Sandrock // *Expert review of respiratory medicine*. — 2009. — Vol. 3, № 5. — P. 511–521.

74. Dear, J.W. Sepsis-induced organ failure is mediated by different pathways in the kidney and liver: acute renal failure is dependent on MyD88 but not renal cell apoptosis / J.W. Dear, H. Yasuda, X. Hu, S. Hieny, P.S. Yuen, S.M. Hewitt, A. Sher, R.A. Star // *Kidney international*. — 2006. — Vol. 69, № 5. — P. 832–836.

75. Dehring, D.J. Comparison of live bacteria infusions in a porcine model of acute respiratory failures / D.J. Dehring, S.H. Crocker, B.L. Wismar, S.M. Steinberg, B.D. Lowery, C.T. Cloutier // *The Journal of surgical research*. — 1983. — Vol. 34, № 2. — P. 151–158.

76. Diepold A. Type III secretion systems: the bacterial flagellum and the injectisome / A. Diepold, J. Armitage // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. – 2015. – T. 370. – №. 1679. – C. 20150020.

77. Doi, K. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury / K. Doi, A. Leelahavanichkul, P.S. Yuen, R.A. Star // *The Journal of clinical investigation*. – 2009. – Vol. 119, № 10. — P. 2868–2878.

78. Dolmatova, E.V. The effects of sepsis on endothelium and clinical implications / E.V. Dolmatova, K. Wang, R. Mandavilli, K.K. Griendling // *Cardiovascular research*. — 2021. — Vol. 117, № 1. — P. 60–73.

79. Dorokhov, Y. L. Methanol May Function as a Cross-Kingdom Signal / Y. L. Dorokhov, T. V. Komarova, I. V. Petrunia, V. S. Kosorukov, R. A. Zinovkin, A. V. Shindyapina, O.Y. Frolova, Y.Y. Gleba // *PLoS one*. — 2012. — Vol. 7, № 4. — P. e36122.

80. Dorokhov, Y. L. Human Endogenous Formaldehyde as an Anticancer Metabolite: Its Oxidation Downregulation May Be a Means of Improving Therapy / Y.L. Dorokhov, E.V. Sheshukova, T.E Bialik, T.V. Komarova // *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. — 2018. — Vol. 40, № 12. — P. e1800136.

81. Dorokhov, Y.L. Metabolic methanol: molecular pathways and physiological roles / Y.L. Dorokhov, A.V. Shindyapina, E.V. Sheshukova, T.V. Komarova // *Physiological reviews*. — 2015. — Vol. 95, № 2. — P. 603–44.

82. El – Achkar, T. M. Tubular cross talk in acute kidney injury: a story of sense and sensibility / T. M. El–Achkar, P. C. Dagher // *American journal of physiology. Renal physiology*. — 2015. — Vol. 308, № 12. P. 1317–1323.

83. El – Achkar, T.M. Pathways of renal injury in systemic gram-negative sepsis / T.M. El – Achkar, M. Hosein, P.C. Dagher // *European journal of clinical investigation*. — 2008. — Vol. 38, № 2. — P. 39–44.

84. El – Achkar, T. M. Sepsis induces changes in the expression and distribution of Toll-like receptor 4 in the rat kidney / T. M. El – Achkar, X. Huang, Z. Plotkin, R.

M. Sandoval, G. J. Rhodes, P. C. Dagher // *American journal of physiology. Renal physiology.* — 2006. — Vol. 290, № 5. — P. 1034–1043.

85. Emlet, D.R. Insulin-like growth factor binding protein 7 and tissue inhibitor of metalloproteinases-2: differential expression and secretion in human kidney tubule cells / D.R. Emlet, N. Pastor-Soler, A. Marciszyn, X. Wen, H. Gomez, W.H. 4th Humphries, S. Morrisroe, J.K. Volpe, J.A. Kellum // *American journal of physiology. Renal physiology.* — 2017. — Vol. 312, № 2. — P. F284–F296.

86. Engel, J.N. *Pseudomonas aeruginosa* internalization by non-phagocytic cells / J.N. Engel // In: Ramos J – L, Filloux A, editors. *Pseudomonas: A model system in Biology.* — 2007. — P. 343–368.

87. Engel, J.N. Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease / J.N. Engel, P. Balachandran // *Current opinion in microbiology.* — 2009. — Vol. 12, № 1. — P. 61–66.

88. Englert, J.A. Integrating molecular pathogenesis and clinical translation in sepsis-induced acute respiratory distress syndrome / J.A. Englert, C. Bobba, R.M. Baron // *JCI Insight.* — 2019. — Vol. 4, № 2 — P.e124061.

89. Epelman, S. Different domains of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S activate distinct TLRs / S. Epelman, D. Stack, C. Bell, E. Wong, G. G. Neely, S. Krutzik, K. Miyake, P. Kubes, L. D. Zbytnuik, L. L. Ma, X. Xie, D. E. Woods, C. H. Mody // *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* . — 2004. — Vol. 173, № 3. — P. 2031–2040.

90. European Centre for Disease Prevention and Control publishes Annual epidemiological report 2011 // *Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin.* — 2011. — Vol. 16, № 45. — P. 20012.

91. Fink, M.P. Epithelial barrier dysfunction: a unifying theme to explain the pathogenesis of multiple organ dysfunction at the cellular level / M.P. Fink, R.L. Delude // *Critical care clinics.* — 2005. — Vol. 21, № 2. — P. 177–196.

92. Fink M.P. Strategies to improve drug development for sepsis / M.P. Fink, H.S. Warren // *Nature reviews. Drug discovery*. — 2014. — Vol. 13, № 10. — P.741–58.
93. Flierl, M.A. The complement anaphylatoxin C5a induces apoptosis in adrenomedullary cells during experimental sepsis / M.A. Flierl, D. Rittirsch, A.J. Chen, B.A. Nadeau, D.E. Day, J.V. Sarma, M.S. Huber–Lang, P.A. Ward // *PLoS One*. — 2008. — Vol. 3, № 7. — P. e2560.
94. Galle M. Structure and function of the Type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* / M. Galle, I. Carpentier, R. Beyaert // *Current protein & peptide science*. — 2012. — Vol.13, № 8. — P. 831–842.
95. Garofalo, A.M. Histopathological changes of organ dysfunction in sepsis / A.M. Garofalo, M. Lorente–Ros, G. Goncalvez, D. Carriedo, A. Ballén–Barragán, A. Villar–Fernández, Ó. Peñuelas, R. Herrero, R. Granados–Carreño, J.A. Lorente // *Intensive care medicine experimental*. — 2019. — Vol. 7, № 1. — P. 45.
96. Gary, T. The Evolving Definition of Sepsis / T. Gary, D. Mingle, A. Yenamandra // *International Clinical Pathology Journal*. — 2016. — Vol. 2, № 6. — P. 154–159.
97. GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 // *Lancet* (London, England). — 2018. — Vol. 392, № 10159. — P. 1789–1858.
98. Glatman Zaretsky, A. Infection with *Toxoplasma gondii* alters lymphotoxin expression associated with changes in splenic architecture / A. Glatman Zaretsky, J.S. Silver, M. Siwicki, A. Durham, C.F. Ware, C.A. Hunter // *Infection and immunity*. — 2012. — Vol. 80, № 10. — P. 3602–3610.
99. Gomaa, S.E. Knocking down *Pseudomonas aeruginosa* virulence by oral hypoglycemic metformin nano emulsion / S.E. Gomaa, G.H. Shaker, F.M. Mosallam, H.A. Abbas // *World journal of microbiology & biotechnology*. — 2022. — Vol. 38, № 7. — P. 119.

100. González-Hernández, J.A. IL-1 is expressed in human adrenal gland in vivo. Possible role in a local immune-adrenal axis / J.A. González-Hernández, S.R. Bornstein, M. Ehrhart-Bornstein, J.E. Gschwend, A. Gwosdow, G. Jirikowski, W.A. Scherbaum // *Clinical and experimental immunology*. — 1995. — Vol. 99, № 1. — P. 137–41.
101. Gordon, S. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions / S. Gordon, F.O. Martinez // *Immunity*. — 2010. — Vol. 32, № 5. — P. 593–604.
102. Gotes, J. Benefits of ethyl gallate versus norepinephrine in the treatment of cardiovascular collapse in *Pseudomonas aeruginosa* septic shock in dogs / J. Gotes, K. Kasian, H. Jacobs, Z-Q. Cheng, S.N. Mink // *Critical care medicine*. — 2012. — Vol. 40, № 2. — P. 560–572
103. Goure, J. Protective anti-V antibodies inhibit *Pseudomonas* and *Yersinia* translocon assembly within host membranes / J. Goure, P. Broz, O. Attree, G.R. Cornelis, I. Attree // *The Journal of infectious diseases*. — 2005. — Vol. 192, № 2. — P. 218–225.
104. Goure, J. The V antigen of *Pseudomonas aeruginosa* is required for assembly of the functional PopB/PopD translocation pore in host cell membranes / J. Goure, A. Pastor, E. Faudry, J. Chabert, A. Dessen, I. Attree // *Infection and immunity*. — 2004. — Vol. 72, № 8. — P. 4741–4750.
105. Guarner, J. Adrenal gland hemorrhage in patients with fatal bacterial infections / J. Guarner, C.D. Paddock, J. Bartlett, S.R. Zaki // *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* — 2008. — Vol. 21, № 9. — P. 1113–1120.
106. Gullichsen, E. Renal perfusion and metabolism in experimental endotoxin shock / E. Gullichsen // *Acta chirurgica Scandinavica. Supplementum*. — 1991. — Vol. 560. — P. 7–31
107. Gül, F. Changing Definitions of Sepsis / F. Gül, M. K. Arslantaş, İ. Cinel, A. Kumar // *Turkish journal of anaesthesiology and reanimation*. — 2017. — Vol. 45, № 3. — P. 129–138.

108. Haiko, J. The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence / J. Haiko, B. Westerlund–Wikström // *Biology*. — 2013. — Vol. 2, № 4 — P. 1242–1267.
109. Hall, S. Cellular Effects of Pyocyanin, a Secreted Virulence Factor of *Pseudomonas aeruginosa* / S. Hall, C. McDermott, S. Anoopkumar–Dukie, A. J. McFarland, A. Forbes, A. V. Perkins, A. K. Davey, R. Chess–Williams, M. J. Kiefel, D. Arora, G. D. Grant // *Toxins*. — 2016. — Vol. 8, № 8. — P. 236.
110. Hauser, A.R. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection / A.R. Hauser // *Nature reviews. Microbiology*. — 2009. — Vol. 7, № 9. — P. 654–665.
111. Hawes, A.S. In vivo effects of the antiglucocorticoid RU 486 on glucocorticoid and cytokine responses to *Escherichia coli* endotoxin / A.S. Hawes, C.S. Rock, C.V. Keogh, S.F. Lowry, S.E. Calvano // *Infection and immunity*. — 1992. — Vol. 60, № 7— P. 2641–2647.
112. Hawley, K.L. CD14 cooperates with complement receptor 3 to mediate MyD88-independent phagocytosis of *Borrelia burgdorferi* / K.L. Hawley, C.M. Jr. Olson, J.M. Iglesias–Pedraz, N. Navasa, J.L. Cervantes, M.J. Caimano, H. Izadi, R.R. Ingalls, U. Pal, J.C. Salazar, J.D. Radolf, J. Anguita // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2012. — Vol. 109, № 4. — P. 1228–1232.
113. Hazen, S.L. Human neutrophils employ myeloperoxidase to convert alpha-amino acids to a battery of reactive aldehydes: a pathway for aldehyde generation at sites of inflammation / S.L. Hazen, F.F. Hsu, A. d'Avignon, J.W. Heinecke // *Biochemistry*. — 1998. — Vol. 37, № 19. — P. 6864–6873.
114. Hellman, J. Part III: minimum quality threshold in pre-clinical sepsis studies (MQTiPSS) for fluid resuscitation and antimicrobial therapy endpoints / J. Hellman, S. Bahrami, M. Boros, I. H. Chaudry, G. Fritsch, W. Gozdzik, S. Inoue, P. Radermacher, M. Singer, M.F. Osuchowski, M. Huber–Lang // *Shock (Augusta, Ga.)*. — 2019. — Vol. 51, № 1. — P. 28–38.

115. Herlihey, F.A. Controlling Autolysis During Flagella Insertion in Gram–Negative Bacteria / F.A. Herlihey, A.J. Clarke // *Advances in experimental medicine and biology*. — 2017. — Vol. 925. — P. 41–56.

116. Herrera–Espejo, S. Carbapenem Combinations for Infections Caused by Carbapenemase–Producing *Pseudomonas aeruginosa*: Experimental In Vitro and In Vivo Analysis / S. Herrera–Espejo, E. Del Barrio–Tofiño, T. Cebrero–Cangueiro, C. López–Causapé, R. Álvarez–Marín, J.M. Cisneros, J. Pachón, A. Oliver, M.E. Pachón–Ibáñez // *Antibiotics* (Basel, Switzerland). — 2022. — Vol. 11, № 9. — P. 1212.

117. Hirota K. Involvement of hypoxia–inducible factors in the dysregulation of oxygen homeostasis in sepsis / K. Hirota // *Cardiovascular and hematological disorders drug targets*. — 2015. — Vol. 15, № 1. — P. 29–40.

118. Hopkinson, R.J. Deciphering Functions of Intracellular Formaldehyde: Linking Cancer and Aldehyde Metabolism / R.J. Hopkinson, C.J. Schofield // *Biochemistry*. — 2018. — Vol. 57, № 6. — P. 904–906.

119. Horna, G. Type 3 Secretion System as an Anti–Pseudomonal Target / G. Horna, J. Ruiz // *Microbial Pathogen*. — 2021. — Vol. 155. — P. 104907.

120. Horna, G. Type 3 Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa* / G. Horna, J. Ruiz // *Microbiological research*. — 2021. — Vol. 246. — P. 126719.

121. Hotchkiss, R.S. Apoptosis in lymphoid and parenchymal cells during sepsis: findings in normal and T– and B–cell–deficient mice / R.S. Hotchkiss, P.E. Swanson, J.P. Cobb, A. Jacobson, T.G. Buchman, I.E. Karl // *Critical care medicine*. — 1997. — Vol. 25, № 8. — P. 1298–1307.

122. Hotchkiss, R.S. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction / R.S. Hotchkiss, P.E. Swanson, B.D. Freeman, K.W. Tinsley, J.P. Cobb, G.M. Matuschak, T.G. Buchman, I.E. Karl // *Critical care medicine*. — 1999. — Vol. 27, № 7. — P. 1230–1251.

123. Hotchkiss, R.S. Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice / R.S. Hotchkiss, K.W. Tinsley, P.E. Swanson, K.C. Chang, J.P. Cobb, T.G. Buchman, S.J. Korsmeyer, I.E. Karl // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 1999. — Vol. 96, № 25. — P. 14541–1

124. Hotchkiss, R.S. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4⁺ T lymphocytes in humans / R.S. Hotchkiss, K.W. Tinsley, P.E. Swanson, R.E. Schmieg, J.J. Jr. Hui, K.C. Chang, D.F. Osborne, B.D. Freeman, J.P. Cobb, T.G. Buchman, I.E. Karl // *Journal of immunology (Baltimore, Md.)*. — 2001. — Vol. 166, № 11. — P. 6952–6963.

125. Hou, L. Necrotic pyknosis is a morphologically and biochemically distinct event from apoptotic pyknosis / L. Hou, K. Liu, Y. Li, S. Ma, X. Ji, L. Liu // *Journal of cell science*. — 2016. — Vol. 129, № 16. — P. 3084–3090.

126. Hraiech, S. Animal models of polymicrobial pneumonia / S. Hraiech, L. Papazian, J. M. Rolain, F. Bregeon // *Drug design, development and therapy*. — 2015. — Vol. 9. — P. 3279—3292.

127. Hua, T. Micro – and Macrocirculatory Changes During Sepsis and Septic Shock in a Rat Model / T. Hua, X. Wu, W. Wang, H. Li, J. Bradley, M.A. Peberdy, J.P. Ornato, W. Tang // *Shock*. — 2018. — Vol. 49, № 5. — P. 591–595.

128. Huang, M. The Pathogenesis of Sepsis and Potential Therapeutic Targets / M. Huang, S. Cai, J. Su // *International journal of molecular sciences*. — 2019. — Vol. 20, № 21. — P.5376.

129. Huppert L.A. Alveolar fluid clearance in pathologically relevant conditions: in vitro and in vivo models of acute respiratory distress syndrome / L.A. Huppert, M.A. Matthay // *Frontiers in immunology*. — 2017. — Vol. 8. — P. 371.

130. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Formaldehyde, 2-butoxyethanol and 1-tert-butoxypropan-2-ol // *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. — 2006. — Vol. 88. — P. 1–478.

131. Imberty, A. Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insights into the molecular basis for host glycan recognition / A. Imberty, M. Wimmerova, E.P. Mitchell, N. Gilboa-Garber // *Microbes and infection*. — 2004. — Vol. 6, № 2. — P. 221–228.

132. Ince, C. The microcirculation is the motor of sepsis / C. Ince // *Critical care (London, England)*. — 2005. — Vol. 9, № 4. — P. S13–S19.

133. Ince, C. The endothelium in sepsis / C. Ince, P.R. Mayeux, T. Nguyen, H. Gomez, J.A. Kellum, G.A. Ospina-Tascón, G. Hernandez, P. Murray, D. De Backer, ADQI XIV Workgroup // Shock (Augusta, Ga.). — 2016. — Vol. 45, № 3 — P. 259–270.
134. Ito, S. Formaldehyde–glutaraldehyde fixatives containing trinitro compounds / S. Ito, M. Karnovsky // The Journal of Cell Biology. — 1968. — Vol. 39, № 2. — P. 168a–169a.
135. Jaeger K.E. Determination of lipolytic enzyme activities / K.E. Jaeger, F. Kovacic // Methods in molecular biology. — 2014. — Vol. 1149. — P. 111–34.
136. Jarczak, D. Sepsis–Pathophysiology and Therapeutic Concepts / D. Jarczak, S. Kluge, A. Nierhaus // Frontiers in medicine. — 2021. — Vol. 8. — P. 628302.
137. Jennewein, C. Mortality of Septic Mice Strongly Correlates With Adrenal Gland Inflammation / C. Jennewein, N. Tran, W. Kanczkowski, L. Heerdegen, A. Kantharajah, S. Dröse, S. Bornstein, B. Scheller, K. Zacharowski // Critical care medicine. — 2016. — Vol. 44, № 4. — P. e190–199.
138. Jensen, P.Ø. Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum–sensing–controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* / P.Ø. Jensen, T. Bjarnsholt, R. Phipps, T.B. Rasmussen, H. Calum, L. Christoffersen, C. Moser, P. Williams, T. Pressler, M. Givskov, N. Høiby // Microbiology. — 2007. — Vol. 153, № 5. — P. 1329–1338.
139. Jiang, L.I. Zymosan activates protein kinase A via adenylyl cyclase VII to modulate innate immune responses during inflammation / L.I. Jiang, P.C. Sternweis, J.E. Wang // Molecular immunology. — 2013. — Vol. 54, № 1. — P. 14–22.
140. Jimenez, P.N. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa* / P.N. Jimenez, G. Koch, J.A. Thompson, K.B. Xavier, R.H. Cool, W.J. Quax // Microbiology and molecular biology reviews: MMBR. — 2012. — Vol. 76, № 1. — P. 46–65.
141. Jin, T. A novel mouse model for septic arthritis induced by *Pseudomonas aeruginosa* / T. Jin, M. Mohammad, Z. Hu, Y. Fei, E.R.B. Moore, R. Pullerits, A. Ali // Scientific reports. — 2019. — Vol. 9, № 1. — P. 16868.

142. Judd, A.M. Possible function of IL-6 and TNF as intraadrenal factors in the regulation of adrenal steroid secretion / A.M. Judd, G.B. Call, M. Barney, C.J. McIlmoil, A.G. Balls, A. Adams, G.K. Oliveira // *Annals of the New York Academy of Sciences*. — 2000. — Vol. 917. — P. 628–637.

143. Kanczkowski, W. Characterization of the LPS-induced inflammation of the adrenal gland in mice / W. Kanczkowski, A. Chatzigeorgiou, M. Samus, N. Tran, K. Zacharowski, T. Chavakis, S. R. Bornstein // *Molecular and Cellular Endocrinology*. — 2013. — Vol. 371, № 1–2. — P. 228–235.

144. Kanczkowski, W. The role of adrenal gland microenvironment in the HPA axis function and dysfunction during sepsis / W. Kanczkowski, M. Sue, K. Zacharowski, M. Reincke, S.R. Bornstein // *Molecular and cellular endocrinology*. — 2015. — Vol. 408. — P. 241–248.

145. Kanczkowski, W. Upregulation of TLR2 and TLR4 in the human adrenocortical cells differentially modulates adrenal steroidogenesis / W. Kanczkowski, P. Tymoszek, T. Chavakis, V. Janitzky, T. Weirich, K. Zacharowski, M. Ehrhart–Bornstein, S.R. Bornstein // *Molecular and cellular endocrinology*. — 2011. — Vol. 336, № 1–2. — P. 41–46.

146. Kanczkowski, W. Differential expression and action of Toll-like receptors in human adrenocortical cells / W. Kanczkowski, K. Zacharowski, M.P. Wirth, M. Ehrhart–Bornstein, S.R. Bornstein // *Molecular and cellular endocrinology*. — 2009. — Vol. 300, № 1–2. — P. 57–65.

147. Ke, Y.J. In vitro study on cytotoxicity and intracellular formaldehyde concentration changes after exposure to formaldehyde and its derivatives / Y.J. Ke, X.D. Qin, Y.C. Zhang, H. Li, R. Li, J.L. Yuan, X. Yang, S.M. Ding // *Human and experimental toxicology*. — 2014. — Vol. 33, № 8. — P. 822–830.

148. Khan A.A. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* from clinical and environmental samples by amplification of the exotoxin A gene using PCR / C.E. Cerniglia, A.A. Khan // *Applied and environmental microbiology*. — 1994. — Vol. 60, № 10. — P. 3739–3745.

149. Kipnis, E. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis / E. Kipnis, T. Sawa, J. Wiener–Kronish // *Medecine et maladies infectieuses*. — 2006. — Vol. 36, № 2. — P. 78–91.
150. Koh, A.Y. Inescapable need for neutrophils as mediators of cellular innate immunity to acute *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia / A.Y. Koh, G.P. Priebe, C. Ray, N. Van Rooijen, G.B. Pier // *Infection and immunity*. — 2009. — Vol. 77, № 12. — P. 5300–5310.
151. Kosaka, J. Histopathology of Septic Acute Kidney Injury: A Systematic Review of Experimental Data / J. Kosaka, Y. R. Lankadeva, C. N. May, R. Bellomo // *Critical care medicine*. 2016. — Vol. 44, № 9. — P. e897–903.
152. Kreider, T. Alternatively activated macrophages in helminth infections / T. Kreider, R. M. Anthony, J. F. Jr. Urban, W. C. Gause // *Current opinion in immunology*. — 2007. — Vol. 19, № 4. — P. 448–453.
153. Kung, V.L. The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa* / V. L. Kung, E. A. Ozer, A. R. Hauser // *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR. — 2010. — Vol. 74, № 4 — P. 621–641.
154. Lameire, N. Acute renal failure / N. Lameire, W. Van Biesen, R. Vanholder // *Lancet*. — 2005. — Vol. 365, № 9457 — P. 417–430.
155. Lang, J. D. Lymphocytes, apoptosis and sepsis: making the jump from mice to humans / J. D. Lang, G. Matute–Bello // *Critical care*. — 2009. — Vol. 13, № 1 — P. 109.
156. 112. Langenberg, C. Renal blood flow in sepsis / C. Langenberg, R. Bellomo, C. N. May, L. Wan, M. Egi, S. Morgera // *Critical care*. — 2005. — Vol. 9, № 4. — P. 363–374.
157. Langenberg, C. Renal vascular resistance in sepsis / C. Langenberg, R. Bellomo, C. N. May, M. Egi, L. Wan, S. Morgera // *Nephron. Physiology*. — 2006. — Vol. 104, № 1. — P. 1–11.
158. Langenberg, C. Renal blood flow in experimental septic acute renal failure / C. Langenberg, L. Wan, M. Egi, C.N. May, R. Bellomo // *Kidney international*. — 2006. — Vol. 69, № 11. — P. 1996–2002.

159. Langenberg, C. Renal blood flow and function during recovery from experimental septic acute kidney injury / C. Langenberg, L. Wan, M. Egi, C.N. May, R. Bellomo // *Intensive care medicine*. — 2007. — Vol. 33, № 9. — P. 1614–1618.

160. Le Dorze, M. The role of the microcirculation in acute kidney injury / M. Le Dorze, M. Legrand, D. Payen, C. Ince // *Current opinion in critical care*. — 2009. — Vol. 15, № 6. — P. 503–508.

161. Lee, V.T. Activities of *Pseudomonas aeruginosa* effectors secreted by the Type III secretion system in vitro and during infection / V. T. Lee, R. S. Smith, B. Tümmler, S. Lory // *Infection and immunity*. — 2005. — Vol. 73, № 3. — P. 1695–1705.

162. Lerolle, N. Histopathology of septic shock induced acute kidney injury: apoptosis and leukocytic infiltration / N. Lerolle, D. Nochy, E. Guérot, P. Bruneval, J. Y. Fagon, J. L. Diehl, G. Hill // *Intensive care medicine*. — 2010. — Vol. 36, № 3. — P. 471–478.

163. Levy, M.M. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference / M. M. Levy, M. P. Fink, J. C. Marshall, E. Abraham, D. Angus, D. Cook, J. Cohen, S. M. Opal, J. L. Vincent, G., Ramsay and SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS (2003) // *Critical care medicine*. — 2003. — Vol. 29. — P. 530–538.

164. Lewis, A. J. Current Murine Models of Sepsis / A. J. Lewis, C. W. Seymour, M. R. Rosengart // *Surgical infections*. — 2016. — Vol. 17, № 4. — P. 385–393.

165. Ley, K. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated / K. Ley, C. Laudanna, M. I. Cybulsky, S. Nourshargh // *Nature reviews. Immunology*. — 2007. — Vol. 7, № 9. — P. 678–89.

166. Liao, C. Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* and antivirulence strategies to combat Its drug resistance / C. Liao, X. Huang, Q. Wang, D. Yao, W. Lu // *Frontiers in cellular and infection microbiology*. — 2022. — Vol. 12. — P. 926758.

167. Libert C.: Part II: minimum quality threshold in pre-clinical sepsis studies (MQTiPSS) for types of infections and organ dysfunction endpoints / C. Libert, A. Ayala, M. Bauer, J. M. Cavaillon, C. Deutschman, C. Frostell, S. Knapp, A. V. Kozlov,

P. Wang, M. F. Osuchowski, D. G. Remick // *Shock*. — 2019. — Vol. 51, № 1— P. 18–27.

168. Lindenblatt, N. Sustained hypothermia accelerates microvascular thrombus formation in mice / N. Lindenblatt, M. D. Menger, E. Klar, B. Vollmar // *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. — 2005. — Vol. 289, № 6, P. H2680–2687.

169. Lindenblatt, N. Systemic hypothermia increases PAI–1 expression and accelerates microvascular thrombus formation in endotoxemic mice / N. Lindenblatt, M. D. Menger, E. Klar, B. Vollmar // *Critical care*. — 2006. — Vol. 10, № 5. — P. R148.

170. Liu, D. Sepsis–induced immunosuppression: mechanisms, diagnosis and current treatment options / D. Liu, S.Y. Huang, J.H. Sun, H.C. Zhang, Q.L. Cai, C. Gao, L. Li, J. Cao, F. Xu, Y. Zhou, C.X. Guan, S.W. Jin, J. Deng, X.M. Fang, J.X. Jiang, L. Zeng // *Military Medical Research*. — 2022. — Vol. 9, № 1. — P. 56.

171. Liu, T. The Peritoneal Macrophages in Inflammatory Diseases and Abdominal Cancers / T. Liu, F. Liu, L.W. Peng, L. Chang, Y.M. Jiang // *Oncology research*. — 2018. — Vol. 26, № 5. — P. 817–826.

172. Liu, T. Treatment of dextran sodium sulfate–induced experimental colitis by adoptive transfer of peritoneal cells / T. Liu, J. Ren, W. Wang, X.W. Wei, G.B. Shen, Y.T. Liu, M. Luo, G.C. Xu, B. Shao, S.Y. Deng, Z.Y. He, X. Liang, Y. Liu, Y.Z. Wen, R. Xiang, L. Yang, H.X. Deng, Y.Q. Wei // *Scientific Reports*. — 2015. — Vol. 5. — P. 16760.

173. Lovewell, R.R. Mechanisms of phagocytosis and host clearance of *Pseudomonas aeruginosa* / R. R. Lovewell, Y. R. Patankar, B. Berwin // *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. — 2014. — Vol. 306, № 7. — P. L591– L603.

174. Luan, Y.Y. Insights into the apoptotic death of immune cells in sepsis / Y. Y. Luan, Y. M. Yao, X. Z. Xiao, Z.Y. Sheng // *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. — 2015. — Vol. 35, № 1. — P. 17–22.

175. Lynch, J.P., III. Emergence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa*: implications for therapy / J. P. Lynch III, G. G. Zhanel, N. M. Clark // *Seminars in respiratory and critical care medicine*. — 2017. — Vol. 38, № 3. — P. 326–345.

176. Lysova, N. L. Immunohistochemical characteristics of the liver in patients with peritonitis (early autopsy) / N. L. Lysova, L. E. Gurevich, O. A. Trusov, A. I. Shchegolev, O. D. Mishnev // *Bulletin of experimental biology and medicine*. — 2001. — Vol. 132. — P. 1125–1129.

177. Maneta, E. Endothelial dysfunction and immunothrombosis in sepsis / E. Maneta, E. Aivalioti, S. Tual-Chalot, B. Emini Veseli, A. Gatsiou, K. Stamatelopoulos, K. Stellos // *Frontiers in immunology*. — 2023. — Vol. 14. — P. 1144229.

178. Martinez Calejman, C. Lipopolysaccharide stimulates adrenal steroidogenesis in rodent cells by a NF κ B-dependent mechanism involving COX-2 activation / C. Martinez Calejman, F. Astort, J. M. Di Gruccio, E. M. Repetto, M. Mercau, E. Giordanino, R. Sanchez, O. Pignataro, P. Arias, C. B. Cymeryng // *Molecular and cellular endocrinology*. — 2011. — Vol. 337, № 1-2. — P. 1–6.

179. Matejovic, M. From hemodynamics to proteomics: Unrevealing the complexity of acute kidney injury in sepsis / M. Matejovic, P. Radermacher, V. Thongboonkerd // *Yearbook of Intensive care and emergency medicine*. — Springer, Berlin, Heidelberg, 2008. — Vol. 2008. — P. 568–578.

180. Matejovic, M. Renal Proteomic Responses to Severe Sepsis and Surgical Trauma: Dynamic Analysis of Porcine Tissue Biopsies / M. Matejovic, Z. Tuma, J. Moravec, L. Valesova, R. Sykora, J. Chvojka, J. Benes, J. Mares // *Shock*. — 2016. — Vol. 46, № 4. — P. 453–464.

181. Matejovic, M. Molecular differences in susceptibility of the kidney to sepsis-induced kidney injury / M. Matejovic, L. Valesova, J. Benes, R. Sykora, R. Hrstka, J. Chvojka // *BMC Nephrol*. — 2017. — Vol. 18, № 1. — P. 183.

182. McConnell, K.W. Pathophysiology of septic shock: From bench to bedside / K.W. McConnell, C.M. Coopersmith // *Presse medicale*. — 2016. — Vol. 45, 4, №. 2 — P. e93–e98.

183. McGinnis, E. Clostridium perfringens sepsis with spherocytosis and green neutrophil inclusions / E. McGinnis, T.W. Smith // British journal of haematology. — 2020. — Vol. 190, № 5 — P. 641.
184. Mebius, R.E. Structure and function of the spleen / R.E. Mebius, G. Kraal // Nature reviews. Immunology. — 2005. — Vol. 5, № 8. — P. 606–616.
185. Minasyan, H. Sepsis: mechanisms of bacterial injury to the patient / H. Minasyan // Scandinavian journal of trauma, resuscitation and emergency medicine. — 2019. — Vol. 27, № 1. — P. 19.
186. Moins – Teisserenc H. Severe Altered Immune Status After Burn Injury Is Associated With Bacterial Infection and Septic Shock / H. Moins –Teisserenc, D. J. Cordeiro, V. Audigier, Q. Ressaie, M. Benyamina, J. Lambert, G. Maki, L. Homyrda, A. Toubert, M. Legrand // Frontiers in immunology. — 2021. — Vol. 12. — P. 586195.
187. Moldawer, L.L. Organ apoptosis in the septic patient: a potential therapeutic target? / L.L. Moldawer // Critical care medicine. — 1999. — Vol. 27, № 7. — P. 1381–1382.
188. Morello, E. Pseudomonas aeruginosa Lipxygenase LoxA Contributes to Lung Infection by Altering the Host Immune Lipid Signaling / E. Morello, T. Pérez–Berezo, C. Boisseau, T. Baranek, A. Guillon, D. Bréa, P. Lanotte, X. Carpena, N. Pietrancosta, V. Hervé, R. Ramphal, N. Cenac, M. Si –Tahar // Frontiers in microbiology. — 2019. — Vol. 10. — P. 1826.
189. Morin, C. D. An Organ System–Based Synopsis of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence / C. D. Morin, E. Déziel, J. Gauthier, R. C. Levesque, G. W. Lau // Virulence. — 2021. — Vol. 12, № 1. — P. 1469–1507.
190. Municio, C. The Response of Human Macrophages to β -Glucans Depends on the Inflammatory Milieu / C. Municio, Y. Alvarez, O. Montero, E. Hugo, M. Rodríguez, E. Domingo, S. Alonso, N. Fernández, M. S. Crespo // PloS one. — 2013. — Vol. 8, № 4. — P. e62016.
191. Murando, F. Experimental abdominal sepsis: sticking to an awkward but still useful translational model / F. Murando, A. Peloso, L. Cebianchi // Mediators of inflammation. — 2019. — Vol. 2019. — P. 8971036.

192. Mwangi, J. The antimicrobial peptide ZY4 combats multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infection / J. Mwangi, Y. Yin, G. Wang, M. Yang, Y. Li, Z. Zhang, R. Lai // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 2019. — Vol. 116, № 52. — P. 26516–26522.

193. Müller–Redetzky, H. Experimental models of pneumonia-induced sepsis / H. Müller–Redetzky, N. Suttorp, M. Witzenrath // Drug Discovery Today: Disease Models. — 2012. — Vol. 9, № 1. — P. e23–e32.

194. Nahum, E. Correlation of near infrared spectroscopy with perfusion parameters at the hepatic and systemic levels in an endotoxemic shock model / E. Nahum, P.W. Skippen, R. E. Gagnon, A. J. Macnab, E. D. Skarsgard // Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research. — 2006. — Vol. 12, № 10. — P. BR313–BR317.

195. Nakahira, K. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome / K. Nakahira, J.A. Haspel, V. A. Rathinam, S. J. Lee, T. Dolinay, H. C. Lam, J. A. Englert, M. Rabinovitch, M. Cernadas, H. P. Kim, K. A. Fitzgerald, S. W. Ryter, A. M. Choi // Nature immunology. — 2011. — Vol. 12, № 3. — P. 222–230.

196. Ochs, M. The number of alveoli in the human lung / M. Ochs, J. R. Nyengaard, A. Jung, L. Knudsen, M. Voigt, T. Wahlers, J. Richter, H. J. Gundersen // American journal of respiratory and critical care medicine. — 2004. — Vol. 169, № 1. — P. 120–124.

197. Oishi, S. M2 polarization of murine peritoneal macrophages induces regulatory cytokine production and suppresses T-cell proliferation / S. Oishi, R. Takano, S. Tamura, S. Tani, M. Iwaizumi, Y. Hamaya, K. Takagaki, T. Nagata, S. Seto, T. Horii, S. Osawa, T. Furuta, H. Miyajima, K. Sugimoto // Immunology. — 2016. — Vol. 149, № 3. — P. 320–328.

198. O'Neill, J. Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the Health and Wealth of Nations / J. O'Neill // The Review on Antimicrobial Resistance. London. Grande-Bretagne, 2014. — P. 1–16.

199. Ono, S. Mechanisms of sepsis-induced immunosuppression and immunological modification therapies for sepsis / S. Ono, H. Tsujimoto, S. Hiraki, S. Aosasa // *Annals of gastroenterological surgery*. — 2018. — Vol. 2, № 5. — P. 351–358.

200. Ostroff, R. M. Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa* / R. M. Ostroff, A. I. Vasil, M. L. Vasil // *Journal of bacteriology*. 1990. — Vol. 172, № 10. — P. 5915–5923.

201. Osuchowski, M. F. Minimum Quality Threshold in Pre – Clinical Sepsis Studies (MQTiPSS): An International Expert Consensus Initiative for Improvement of Animal Modeling in Sepsis / M. F. Osuchowski, A. Ayala, S. Bahrami, M. Bauer, M. Boros, J. M. Cavaillon, I. H. Chaudry, C. M. Coopersmith, C. S. Deutschman, S. Drechsler, P. Efron, C. Frostell, G. Fritsch, W. Gozdzik, J. Hellman, M. Huber – Lang, S. Inoue, S. Knapp, A. V. Kozlov, C. Libert, J. C. Marshall, L. L. Moldawer, P. Radermacher, H. Redl, D. G. Remick, M. Singer, C. Thiernemann, P. Wang, W. J. Wiersinga, X. Xiao, B. Zingarelli // *Shock*. — 2018. — Vol. 50, № 4. — P. 377–380.

202. Pang, Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Mechanisms and alternative therapeutic strategies / Z. Pang, R. Raudonis, B. R. Glick, T. J. Lin, Z. Cheng // *Biotechnology advances*. — 2019. — Vol. 37, № 1. — P. 177–192.

203. Parra Millán, R. Efficacy of Lysophosphatidylcholine in Combination with Antimicrobial Agents against *Acinetobacter baumannii* in Experimental Murine Peritoneal Sepsis and Pneumonia Models / R. Parra Millán, M. E. Jiménez Mejías, V. Sánchez Encinales, R. Ayerbe Algaba, A. Gutiérrez Valencia, M. E. Pachón Ibáñez, C. Díaz, J. Pérez Del Palacio, L. F. López Cortés, J. Pachón, Y. Smani // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. — 2016. — Vol. 60, № 8. — P. 4464–4470.

204. Patankar, Y.R. Flagellar motility is a key determinant of the magnitude of the inflammasome response to *Pseudomonas aeruginosa* / Y. R. Patankar, R. R. Lovewell, M. E. Poynter, J. Jyot, B. I. Kazmierczak, B. Berwin // *Infection and immunity*. — 2013. — Vol. 81, № 6. — P. 2043–2052.

205. Pendleton J. N. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens / J. N. Pendleton, S. P. Gorman, B. F. Gilmore // Expert review of anti-infective therapy. — 2013. — Vol. 11, № 3. — P. 297–308.
206. Peschel, A. How do bacteria resist human antimicrobial peptides? / A. Peschel // Trends in microbiology. — 2002. — Vol. 10, № 4. — P. 179–186.
207. Phillips, R. M. In vivo phospholipase activity of the *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU and protection of mammalian cells with phospholipase A2 inhibitors / R. M. Phillips, D. A. Six, E. A. Dennis, P. Ghosh // The Journal of biological chemistry. — 2003. — Vol. 278, № 42. — P. 41326–41332.
208. Pier, G. B. *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide: A Major Virulence Factor, Initiator of Inflammation and Target for Effective Immunity / G. B. Pier // International journal of medical microbiology: IJMM. — 2007. — Vol. 297, № 5. — P. 277–295.
209. Pietzke, M. Formate metabolism in health and disease / M. Pietzke, J. Meiser, A. Vazquez // Molecular metabolism. — 2020. — Vol. 33. — P. 23–37.
210. Poli-de-Figueiredo, L. F. Experimental models of sepsis and their clinical relevance / L. F. Poli-de-Figueiredo, A. G. Garrido, N. Nakagawa, P. Sannomiya // Shock. — 2008. — Vol. 30, № 1. — P. 53–59.
211. Popov, D. Sepsis models in experimental animals / D. Popov, G. Pavlov // Trakia Journal of Sciences. — 2013. — № 1. — P. 13–23.
212. Prowle, J. R. Sepsis-associated acute kidney injury: macrohemodynamic and microhemodynamic alterations in the renal circulation / J. R. Prowle, R. Bellomo // Seminars in nephrology. — 2015. — Vol. 35, № 1. — P. 64–74.
213. Pu, Q. Atg7 Deficiency Intensifies Inflammasome Activation and Pyroptosis in *Pseudomonas* Sepsis / Q. Pu, C. Gan, R. Li, Y. Li, S. Tan, X. Li, Y. Wei, L. Lan, X. Deng, H. Liang, F. Ma, M. Wu // Journal of immunology. — 2017. — Vol. 198, № 8. — P. 3205–3213.
214. Qin, S. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics / S.

Qin, W. Xiao, C. Zhou, Q. Pu, X. Deng, L. Lan, H. Liang, X. Song, M. Wu // Signal transduction and targeted therapy. — 2022. — Vol. 7, № 1. — P. 199.

215. Qu, M. Current experimental models of burns / M. Qu, M. Nourbakhsh // Discovery medicine. — 2017. — Vol. 23, № 125. — P. 95–103.

216. Rabin, S. D. A C-terminal domain targets the *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU to the plasma membrane of host cells / S. D. Rabin, J. L. Veessenmeyer, K.T. Biegging, A. R. Hauser // Infection and immunity. — 2006. — Vol. 74, № 5. — P. 2552–2561.

217. Rajan, G. Lymphocyte counts and the development of nosocomial sepsis / G. Rajan, J. W. Sleight // Intensive care medicine. — 1997. — Vol. 23, № 11. — P. 1187.

218. Raymond, S. L. Microbial recognition and danger signals in sepsis and trauma / S. L. Raymond, D. C. Holden, J. C. Mira, J. A. Stortz, T. J. Loftus, A. M. Mohr, L. L. Moldawer, F. A. Moore, S. D. Larson, P. A. Efron // Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease. — 2017. — Vol. 1863, № 10, Pt B. — P. 2564–2573.

219. Reid, V. L. Role of microparticles in sepsis / V. L. Reid, N. R. Webster // British journal of anaesthesia. — 2012. — Vol. 109, № 4. — P. 503–513.

220. Reynolds, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy / E. S. Reynolds // Journal of Cellular Biology. — 1963. — V. 17, № 1. — P. 208–212.

221. Riedemann, N. C. The enigma of sepsis / N. C. Riedemann, R. F. Guo, P. A. Ward // The Journal of clinical investigation. — 2003. — Vol. 112, № 4. — P. 460–467.

222. Rudd, K. E. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study / K. E. Rudd, S. C. Johnson, K. M. Agesa, K. A. Shackelford, D. Tsoi, D. R. Kievlan, D. V. Colombara, K. S. Ikuta, N. Kissoon, S. Finfer, C. Fleischmann–Struzek, F. R. Machado, K. K. Reinhart, K. Rowan, C. W. Seymour, R. S. Watson, T. E. West, F. Marinho, S. I. Hay, R. Lozano, A. D. Lopez, D. C. Angus, C. J. L. Murray, M. Naghavi // Lancet. — 2020. — Vol. 395, № 10219. — P. 200–211.

223. Salgado, D. R. Adrenal function testing in patients with septic shock / D. R. Salgado, J. C. Verdeal, J. R. Rocco // Critical care. — 2006. — Vol. 10. — P. R149.

224. Salomão, R. Sepsis: evolving concepts and challenges. / R. Salomão, B. L. Ferreira, M. C. Salomão, S. S. Santos, L. C. P. Azevedo, M. K. C. Brunialti // Brazilian journal of medical and biological research. — 2019. — Vol. 52, № 4. — P. e8595.

225. Sánchez M. Permeabilization of biological and artificial membranes by a bacterial dirhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* / M. Sánchez, F. J. Aranda, J. A. Teruel, M. J. Espuny, A. Marqués, A. Manresa, A. Ortiz // Journal of colloid and interface science. — 2010. — Vol. 341, № 2. — P. 240–247.

226. Sato H. The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*–encoded type III cytotoxin, ExoU / H. Sato, D. W. Frank, C. J. Hillard, J. B. Feix, R. R. Pankhaniya, K. Moriyama, V. Finck–Barbançon, A. Buchaklian, M. Lei, R. M. Long, J. Wiener–Kronish, T. Sawa // The EMBO journal. — 2003. — Vol. 22, № 12. — P. 2959–2969.

227. Schimmer, R. C. Inflammatory Kidney and Liver Tissue Response to Different Hydroxyethylstarch (HES) Preparations in a Rat Model of Early Sepsis / R. C. Schimmer, M. Urner, S. Voigtsberger, C. Booy, B. Roth Z'Graggen, B. Beck – Schimmer, M. Schläpfer // PloS one. — 2016. — Vol. 11, № 3. — P. e0151903.

228. Schmidt, E. P. The pulmonary endothelial glycocalyx regulates neutrophil adhesion and lung injury during experimental sepsis / E. P. Schmidt, Y. Yang, W. J. Janssen, A. Gandjeva, M. J. Perez, L. Barthel, R. L. Zemans, J. C. Bowman, D. E. Koyanagi, Z. X. Yunt, L. P. Smith, S. S. Cheng, K. H. Overdier, K. R. Thompson, M. W. Geraci, I. S. Douglas, D. B. Pearce, R. M. Tudor // Nature medicine. — 2012. — Vol. 18, № 8. — P. 1217–1223.

229. Schrier, R. W. Acute renal failure and sepsis / R. W. Schrier, W. Wang // The New England journal of medicine. — 2004. — Vol. 351, № 2. — P. 159–169.

230. Secchi, A. Effect of endotoxemia on hepatic portal and sinusoidal blood flow in rats / A. Secchi, J. M. Ortanderl, W. Schmidt, M. M. Gebhard, E. Martin, H. Schmidt // The Journal of surgical research. — 2000. — Vol. 89, № 1. — P. 26–30.

231. Serroukh, Y. Alterations of the Erythrocyte Membrane during Sepsis / Y. Serroukh, S. Djebara, C. Lelubre, K. Zouaoui Boudjeltia, P. Biston, M. Piagnerelli // Critical care research and practice. — 2012. — Vol. 2012. — P. 702956.

232. Seymour, C. W. Derivation, Validation, and Potential Treatment Implications of Novel Clinical Phenotypes for Sepsis / C. W. Seymour, J. N. Kennedy, S. Wang, C. H. Chang, C. F. Elliott, Z. Xu, S. Berry, G. Clermont, G. Cooper, H. Gomez, D. T. Huang, J. A. Kellum, Q. Mi, S. M. Opal, V. Talisa, T. van der Poll, S. Visweswaran, Y. Vodovotz, J. C. Weiss, D. M. Yealy, S. Yende, D. C. Angus // JAMA. — 2019. — Vol. 321, № 20. — P. 2003–2017.

233. Six, A. Pyocin efficacy in a murine model of *Pseudomonas aeruginosa* sepsis / A. Six, K. Mosbahi, M. Barge, C. Kleanthous, T. Evans, D. Walker // The Journal of antimicrobial chemotherapy. — 2021. — Vol. 76, № 9. — P. 2317–2324.

234. Soeiro, Ade M. Pulmonary histopathological alterations in patients with acute respiratory failure: an autopsy study / M. Soeiro Ade, E. R. Parra, M. Canzian, C. Farhat, V. L. Capelozzi // Jornal brasileiro de pneumologia: publicacao oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. — 2008. — Vol. 34, № 2. — P. 67–73.

235. Song, X. A reversible fluorescent probe based on C[double bond, length as m-dash]N isomerization for the selective detection of formaldehyde in living cells and in vivo / X. Song, X. Han, F. Yu, J. Zhang, L. Chen, C. Lv // The Analyst. — 2018. — Vol. 143, № 2. — P. 429–439.

236. Spapen, H. Liver perfusion in sepsis, septic shock, and multiorgan failure / H. Spapen // Anatomical record. — 2008. — Vol. 291, № 6. — P. 714–720.

237. Spapen, H. D. Honoré P.M. Sepsis-induced multi-organ dysfunction syndrome — a mechanistic approach / H. D. Spapen, R. Jacobs, P. M. Honoré // Journal of Emergency and Critical Care Medicine. — 2017. — Vol.1, № 10. — P. 1–27.

238. Stone, G. G. Detection of Salmonella serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation–PCR procedure / G. G. Stone, R. D. Oberst, M. P. Hays, S. McVey, M. M. Chengappa // Journal of clinical microbiology. — 1994. — Vol. 32, № 7. — P. 1742–1749.

239. Stortz, J. A. Murine Models of Sepsis and Trauma: Can We Bridge the Gap? / J. A. Stortz, S. L. Raymond, J. C. Mira, L. L. Moldawer, A. M. Mohr, P. A. Efron // ILAR journal. — 2017. — Vol. 58, № 1. — P. 90–105.
240. Stotland P. K., Radzioch D., Stevenson M. M. Mouse models of chronic lung infection with *Pseudomonas aeruginosa*: models for the study of cystic fibrosis / P. K. Stotland, D. Radzioch, M. M. Stevenson // Pediatric pulmonology. — 2000. — Vol. 30, № 5. — P. 413–424.
241. Strateva, T. Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections / T. Strateva, I. Mitov // Annals of Microbiology. — 2011. — Vol. 61, 717–732.
242. Studena, S. A rat model of early sepsis: relationships between gentamicin pharmacokinetics and systemic and renal effects of bacterial lipopolysaccharide combined with interleukin-2 / S. Studena, J. Martinkova, D. Slizova, O. Krs, M. Senkerik, D. Springer, J. Chládek // Biological and pharmaceutical bulletin. — 2012. — Vol. 35, № 10. — P. 1703–1710.
243. Sultan, M. R. Arya, and Kim K. K. Roles of Two-Component Systems in *Pseudomonas aeruginosa* Virulence / M. R. Sultan, R. Arya, K. K. Kim // International Journal of Molecular Sciences. — 2021. — Vol. 22, № 22. — P. 12152.
244. Sygitowicz, G. Molecular mechanisms of organ damage in sepsis: an overview / G. Sygitowicz, D. Sitkiewicz // The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases. — 2020. — Vol. 24, № 6. — P. 552–560.
245. Szende, B. Effect of formaldehyde on cell proliferation and death / B. Szende, E. Tyihák // Cell biology international. — 2010. — Vol. 34, № 12. — P. 1273–1282.
246. Takasu, O. Mechanisms of cardiac and renal dysfunction in patients dying of sepsis / O. Takasu, J. P. Gaut, E. Watanabe, K. To, R. E. Fagley, B. Sato, S. Jarman, I. R. Efimov, D. L. Janks, A. Srivastava, S. B. Bhayani, A. Drewry, P. E. Swanson, R. S. Hotchkiss // American journal of respiratory and critical care medicine. — 2013. — Vol. 187, № 5. — P. 509–517.

247. Taylor, F. B. Staging of the pathophysiologic responses of the primate microvasculature to *Escherichia coli* and endotoxin: examination of the elements of the compensated response and their links to the corresponding uncompensated lethal variants / F. B. Taylor // Critical care medicine. — 2001. — Vol. 29, № 7. — P. 78–89.

248. Taylor, R. C. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level / R. C. Taylor, S. P. Cullen, S. J. Martin // Nature reviews. Molecular cell biology. — 2008. — Vol. 9, № 3. — P. 231–241

249. Ten Have, G. A. M. Characteristics of a *Pseudomonas aeruginosa* induced porcine sepsis model for multi-organ metabolic flux measurements / G. A. M. Ten Have, R. C. I. Deutz, M. P. K. J. Engelen, R. R. Wolfe, N. E. P. Deutz // Laboratory animals. — 2018. — Vol. 52, № 2. — P. 163–175.

250. Ten Have, G. A. M. Phenylalanine isotope pulse method to measure effect of sepsis on protein breakdown and membrane transport in the pig / G. A. M. Ten Have, M. P. K. J. Engelen, R. R. Wolfe, N. E. P. Deutz // American journal of physiology. Endocrinology and metabolism. — 2017. — Vol. 312, № 6. — P. E519–E529.

251. Thompson, B. T. Acute respiratory distress syndrome / B. T. Thompson, R. C. Chambers, K. D. Liu // The New England journal of medicine. — 2017. — Vol. 377, № 6. — P. 562–572.

252. Torres Lisa, K. Sepsis-induced immune osuppression / K. Torres Lisa, P. Pickkers, T. van der Poll // Annual review of physiology. — 2022. — Vol. 84. — P. 157–181.

253. Tyihák, E. Formaldehyde promotes and inhibits the proliferation of cultured tumour and endothelial cells / E. Tyihák, J. Bocsi, F. Timár, G. Rácz, B. Szende // Cell proliferation. — 2001. — Vol. 34, № 3. — P. 135–141.

254. Uhlig, C. Anesthesia and Monitoring in Small Laboratory Mammals Used in Anesthesiology, Respiratory and Critical Care Research: A Systematic Review on the Current Reporting in Top-10 Impact Factor Ranked Journals / C. Uhlig, H. Krause, T. Koch, M. Gama de Abreu, P. M. Spieth // PLoS one. — 2015. — Vol. 10, № 8. — P. e0134205.

255. Uotila, L. Formaldehyde dehydrogenase from human liver. Purification, properties, and evidence for the formation of glutathione thiol esters by the enzyme / L. Uotila, M. Koivusalo // The Journal of biological chemistry. — 1974. — Vol. 249, № 23. — P. 7653–7663.

256. van Heeckeren, A. M. Murine models of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection / A. M. van Heeckeren, M. D. Schluchter // Laboratory animals. — 2002. — Vol. 36, № 3. — P. 291–312.

257. Vardon–Bounes, F. Platelets Are Critical Key Players in Sepsis / F. Vardon–Bounes, S. Ruiz, M. P. Gratacap, C. Garcia, B. Payraastre, V. Minville // International journal of molecular sciences. — 2019. — Vol. 20, № 14. — P. 3494.

258. Vega–Pérez, A. Resident macrophage–dependent immune cell scaffolds drive anti–bacterial defense in the peritoneal cavity / A. Vega–Pérez, L. H. Villarrubia, C. Godio, A. Gutiérrez–González, L. Feo–Lucas, M. Ferriz, N. Martínez–Puente, J. Alcaín, A. Mora, G. Sabio, M. López–Bravo, C. Ardavín // Immunity. — 2021. — Vol. 54, № 11. — P. 2578–2594.e5.

259. Volman, T. J. Zymosan–induced generalized inflammation: Experimental studies into mechanisms leading to multiple organ dysfunction syndrome / T. J. Volman, T. Hendriks, R. J. Goris // Shock. — 2005. — Vol. 23, № 4. — P. 291–297.

260. Wagener, B. M. Exoenzyme Y Contributes to End–Organ Dysfunction Caused by *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia in Critically Ill Patients: An Exploratory Study / B. M. Wagener, N. Anjum, S. C. Christiaans, M. E. Banks, J. C. Parker, A. T. Threet, R. R. Walker, K. D. Isbell, S. A. Moser, T. Stevens, M. F. Alexeyev, J. P. Audia, W. Richter, K. S. Hardy, L. A. Saleh, C. Morgan, J. F. Pittet // Toxins. — 2020. — Vol. 12, № 6. — P. 369.

261. Warrener, P. A novel anti–PcrV antibody providing enhanced protection against *Pseudomonas aeruginosa* in multiple animal infection models / P. Warrener, R. Varkey, J. C. Bonnell, A. DiGiandomenico, M. Camara, K. Cook, L. Peng, J. Zha, P. Chowdury, B. Sellman, C. K. Stover // Antimicrobial agents and chemotherapy. — 2014. — Vol. 58, № 8. — P. 4384–4391.

262. Wesche–Soldato, D. E. The apoptotic pathway as a therapeutic target in sepsis / D. E. Wesche–Soldato, R. Z. Swan, C. S. Chung, A. Ayala // *Current drug targets*. — 2007. — Vol. 8, № 4. — P. 493–500.

263. Woodcock, T. E. Revised Starling equation and the glycocalyx model of transvascular fluid exchange: an improved paradigm for prescribing intravenous fluid therapy / T. E. Woodcock, T. M. Woodcock // *British journal of anaesthesia*. — 2012. — Vol. 108, № 3. — P. 384–394.

264. Woth, G. Activated platelet–derived microparticle numbers are elevated in patients with severe fungal (*Candida albicans*) sepsis / G. Woth, M. Tóké–Füzesi, T. Magyarlaki, G. L. Kovács, I. Vermes, D. Mühl // *Annals of clinical biochemistry*. — 2012. — Vol. 49, № 6. — P.554–560.

265. Wu, L. Peritubular capillary dysfunction and renal tubular epithelial cell stress following lipopolysaccharide administration in mice / L. Wu, M. M. Tiwari, K. J. Messer, J. H. Holthoff, N. Gokden, R. W. Brock, P. R. Mayeux // *American journal of physiology. Renal physiology*. — 2007. — Vol. 292, № 1. — P. F261–F268.

266. Yu, P. H. Gubisne–Harberle D. Physiological and pathological implications of semicarbazide–sensitive amine oxidase / P. H. Yu, S. Wright, E. H. Fan, Z. R. Lun, D. Gubisne–Harberle // *Biochimica et biophysica acta*. — 2003. — Vol. 1647, № 1–2. — P. 193–199.

267. Zarjou, A. Sepsis and acute kidney injury / A. Zarjou, A. Agarwal // *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*. — 2011. — Vol. 22, № 6. — P. 999–1006.

268. Zhang, Y. Y. Signaling pathways and intervention therapies in sepsis / Y. Y. Zhang, B. T. Ning // *Signal transduction and targeted therapy*. — 2021. — Vol. 6, № 1. — P. 407.

269. Zingarelli, B. Part I: minimum quality threshold in pre–clinical sepsis studies (MQTiPSS) for study design and humane modeling endpoints / B. Zingarelli, C. M. Coopersmith, S. Drechsler, P. Efron, J. C. Marshall, L. L. Moldawer, W. J. Wiersinga, X. Xiao, M. F. Osuchowski, C. Thiernemann // *Shock*. — 2019. — Vol. 51, № 1. — P. 10–22.