

На правах рукописи

Черкасова Мария Николаевна

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

1.5.11 – Микробиология

1.5.22 – Клеточная биология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2026 г.

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации в лаборатории индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов

Научные руководители:

Жуховицкий Владимир Григорьевич, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, заведующий лабораторией индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Боровая Татьяна Геннадьевна, доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН, профессор, главный научный сотрудник лаборатории индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Официальные оппоненты:

Попов Дмитрий Александрович, доктор медицинских наук, профессор РАН, заведующий микробиологической (бактериологической) лабораторией ФГБУ «НМИЦ ССХ им. А.Н. Бакулева» Минздрава России; профессор кафедры анестезиологии и реаниматологии с курсом клинической лабораторной диагностики ИПКВК и ПО ФГБУ «НМИЦ ССХ им. А.Н. Бакулева» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Одинцова Ирина Алексеевна, заслуженный работник высшей школы Российской Федерации, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой гистологии с курсом эмбриологии ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «16» декабря 2026 г. в 14.00 часов на заседании диссертационного совета ПДС 0300.034 в ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6)

Объявление о защите и автореферат диссертации размещены на сайтах:

<https://www.rudn.ru/science/dissovet> и <https://vak.gisnauka.ru/>

Автореферат разослан « » _____ 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета ПДС 0300.034
кандидат медицинских наук, доцент

Подопригора Ирина Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Несмотря на определенный прогресс, достигнутый в последние годы в терапии сепсиса, исследования этиопатогенеза этого состояния и поиск эффективных средств борьбы с сепсисом сохраняют актуальность.

Наряду с клиническими, инструментальными и клинико-лабораторными исследованиями, к приоритетным направлениям изучения проблемы сепсиса относится экспериментальное моделирование. Одним из наиболее часто встречающихся патогенных микроорганизмов в условиях многопрофильного стационара является *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) – синегнойная палочка (Liao C. et al., 2022; Morin C.D. et al., 2021). Клинические изоляты Pa, с высоким коэффициентом постоянства встречающиеся при бактериемии, характеризуются выраженным патогенным потенциалом, в частности, – наличием широкого спектра экзотоксинов (A, U, S, T, Y), большинство из которых являются эффекторными белками системы секреции III типа (Pendleton J.N. et al., 2013). Вместе с тем, патогенный потенциал каждого отдельного штамма складывается не только из комбинации свойственных ему экзотоксинов, но и протеолитических ферментов, сидерофоров, экзолизина, липаз, белков, индуцирующих апоптоз, пигментов и др. (Лазарева А.В. с соавт., 2015; Шерemet А.Б. с соавт., 2020; Horna G. et al., 2021; Qin S. et al., 2022). Столь представительный набор факторов патогенности Pa в случае развития сепсиса чаще всего обуславливает наступление летального исхода. Поскольку в модельных экспериментах значительно (по сравнению с клиническими исследованиями) расширяются возможности анализа, Pa может рассматриваться как кандидатный микроорганизм для моделирования септического процесса, в частности, – в рамках модели перитонеального сепсиса мышей.

Цель исследования

Создание экспериментальной модели синегнойного сепсиса и оценка эффективности лекарственного средства под условным внутрिलाбораторным названием Астрабионорм.

Задачи исследования

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

2. Определить дозы каждого штамма Pa, способные вызывать соответственно 50%-ную (LD₅₀) и 100%-ную (LD₁₀₀) 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-1бета и ИЛ-10) и оптическую плотность мРНК провоспалительных цитокинов (ИЛ-1бета, 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 высев 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.

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, используемых 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.).

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).

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.

Степень достоверности 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.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

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.

Личный вклад автора

Автором самостоятельно было запланировано исследование, разработаны дизайн и протоколы экспериментов, определены сроки их выполнения, осуществлены подбор штаммов Ра и их фенотипическая и генотипическая характеристики, разработаны экспериментальные модели сепсиса, выполнены бактериологические, молекулярно-биологические, гистологические, гистохимические, иммуногистохимические, морфометрические, электронномикроскопические исследования. Самостоятельно разработана схема введения лекарственного средства Астрабионорм и оценка его эффективности, а также статистическая обработка и анализ результатов исследования.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 7 научных работ (5 статей и 2 тезисов), в том числе, 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы исследования

В эксперименте использованы эталонные штаммы *P. aeruginosa* PAO1, *P. aeruginosa* PA103, *P. aeruginosa* ATCC 27853 и штаммы *P. aeruginosa* 5266 (Pa 5266), *P. aeruginosa* 1623 (Pa 1623), полученные из рабочей коллекции лаборатории индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Исследование проводили на половозрелых самцах мышей линии C57Bl/6 массой 18-20 г., возраста 6-8 недель, полученных из питомника «Пушино». Клетки, воду, подстилку и корм предварительно стерилизовали. Доступ к корму и воде у мышей был неограничен. Лабораторные животные были подвержены эвтаназии передозировкой внутримышечной инъекции смеси анестетиков «Золетил 100» + «Рометар» в дозах 15 мг/кг и 30 мг/кг, в объеме 0,2 мл. Биоматериалом для исследования служили: перитонеальная жидкость, кровь, висцеральные органы (легкие, надпочечники, почки, печень, селезенка) животных.

Культуры штаммов *P. aeruginosa* рекультивировали из лиофильно высушенного состояния на Cetrimide Agar Base (HiMedia, Индия) и культивировали на LB-бульоне (LB-broth) и Columbia Agar Base (Becton Dickinson, США).

Лекарственное средство под условным внутрилабораторным названием «Астрабионорм» (Патент РФ № 2738719. Средство для лечения коронавирусных, ретровирусных инфекций и гепатита С / В.Н. Ласкавый, М.А. Шурдов), действующим началом которого является водный раствор муравьиного альдегид в количестве 0,073–0,075% (об/об), было предоставлено разработчиком (авторами патента).

Выявление генов экзотоксинов A (*exoA*), U (*exoU*), S (*exoS*), T (*exoT*), Y (*exoY*). Выделение ДНК чистых культур проводилось по методике Stone G.G. и соавторов (Stone G.G., 1994). Структура праймеров и режим амплификации для *exoU*, *exoS*, *exoT*, *exoY* были заимствованы у Ајауі Т. и соавт. (Ајауі Т., 2003), для *exoA* – у Khan A.A. и соавтор (Khan A.A., 1993). Для обнаружения ПЦР-продуктов использовался электрофорез в горизонтальном 1,5% агарозном геле при постоянном токе (120В, 400 мА). Полосы на электрофореze визуализировали на гель-документирующей системе (Cleaver Scientific, Россия).

Определение фосфолипазной активности проводили на мясопептонном агаре («Медгамал», Россия) с добавлением 20% желточной смеси через 24 часа инкубации культур при 37°C. Для интерпретации результатов применяли коэффициент отношения диаметра радужного венчика к диаметру колонии (мм).

Для определения гемолитической активности бараньи эритроциты инкубировали с суточной бульонной культурой штаммов Ра. Выход гемоглобина оценивали по оптической плотности при 490 нм на спектрофотометре (Wallac 1420 Manager) путем добавления в 96 – луночный полистероловый планшет (Sarstedt Mikrotestplatte 96 Well, F.) по 200 мкл супернатантов в каждую лунку. Процент лизиса рассчитывали по существующей формуле (Dacheux, D., 2003)

Оценка подвижности выполнялась на среде Motility Test Medium (BBLTM Becton Dickinson, США). Материал суточных агаровых культур штамма 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.

Оценка влияния Астрабионорма на ассоциированную со жгутиком подвижность. Штаммы Ра 1623 и Ра 5266 культивировали 60 и 120 минут в LB - бульоне, содержащем 0,0073% - 0,0075% (об/об) Астрабионорма, после чего доводили до множественности, соответствующей $\times 10^5$ КОЕ/мл, и высевали в объеме 1 мкл в центр чашечной среды Motility Test Medium уколом наконечника. Чашки инкубировали при 37°C в течение 24 часов и оценивали диаметр (мм) зоны подвижного роста.

Оценка антимикробного действия Астрабионорма. Культуры штаммов Ра 1623 и Ра 5266 выращивали на LB - бульоне при 35°C в течение 24 часов. Культуры доводили до оптической плотности 0,5 по стандарту мутности МакФарланда (McF) с помощью денсиметра Densimat (bioMérieux, Франция), что соответствовало множественности $\times 10^5$ КОЕ/мл. Тестирование проводили на 96-ти луночных планшетах (Sarstedt, Австрия), внося в опытную лунку 180 мкл испытуемой бульонной культуры и 20 мкл того или иного разведения Астрабионорма в LB-бульоне. Учет результатов проводили спектрофотометрически спустя 24 часа инкубации на приборе Wallac 1420 (LKB, Швеция) путем измерения оптической плотности проб при длине волны 490 нм с последующим высевом на Columbia Agar Base 100 мкл опытной взвеси.

Подготовка культуры для заражения. Суточные бульонные культуры штаммов Ра 1623 и Ра 5266 пересеивали на свежий LB-бульон, культивировали на шейкер-инкубаторе Ecotron (Infors, Швейцария) в течение суток, отмывали и суспендировали в стерильном физиологическом растворе, доводили до оптической плотности, соответствующей 2 McF с помощью денсиметра Densimat (bioMérieux, Франция).

Подбор инфицирующих доз для создания моделей. Определение значений LD₅₀ и LD₁₀₀ штаммов Ра проводили посредством биопроб на 12 половозрелых самцах лабораторных

мышей линии C57BL/6 в двух повторах. Величину LD₅₀ и LD₁₀₀ для каждого из штаммов Ра рассчитывали по методу Рида и Менча (Урбах, В.Ю., 1975).

Моделирование сепсиса с использованием разных штаммов Ра. Экспериментальные животные (n=242) были разделены на 5 групп. **Группа №1** – контрольная, состоящая из 2 подгрупп: подгруппа 1а (n=12) – животные, получившие внутрибрюшинно стерильный физиологический раствор; подгруппа 1б (n=6) – интактные здоровые мыши. **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. Гибель животных в обеих моделях сепсиса зарегистрирована через 24 – 26 часов. **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.

Методика определения Ра в перитонеальном смыве, в крови и гомогенатах органов. Образцы органов гомогенизировали в стерильных фарфоровых ступках, проводили серию 10-кратных разведений в изотоническом растворе хлорида натрия и высевали в чашки с питательной средой Columbia Agar Base (Becton Dickinson, США). Чашки с посевами культивировали 24 ч при 37°C, после чего подсчитывали выросшие колонии Ра с определением средних значений посева для каждой временной точки (КОЕ/г). Одновременно производили прямой посев периферической крови и перитонеальной жидкости в динамике развития сепсиса, оценивая результаты в КОЕ/мл.

Выбор терапевтической схемы введения Астрабионорма для лечения сепсиса. По рекомендации разработчиков Астрабионорма был произведен расчет рабочих доз и определена схема введения АБ. Заражённые животные получали повторные внутримышечные введения 0,2 мл (0,073 – 0,075% (об/об)) АБ через 60, 90, 240, 420 и 1440 минут после заражения; эксперимент был проведен в двух повторах.

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 «Axiostar Plus» (Carl Zeiss, Германия). Для количественного определения абсолютных площадей разных зон надпочечников и белой пульпы селезенки использовали срединные серийные срезы органов и компьютерную программу «PhotoM 1.21» с общими увеличениями светового микроскопа равными, соответственно, $\times 200$ и $\times 100$; для определения топографии фильтрующих и юкстамедуллярных нефронов почек – срезы во фронтальной плоскости.

Окрашивание амидочерным - 10В на общий белок. Парафиновые срезы органов депарафинизировали в ксилоле и спиртах нисходящей концентрации, промывали в 2-х сменах бидистиллированной воды и в течение 20 минут окрашивали срезы 0,02% раствором амидочерного-10В в смеси ледяной уксусной кислоты и метилового спирта (Буданцев, А.Ю., 2008).

Окрашивание по методу Маллори. Для окрашивания срезов применяли коммерческий набор реактивов фирмы «BioVitrum» согласно инструкции производителя.

Иммуногистохимический метод. Образцы органов инкубировали в 10мМ растворе цитратного буфера (Citrate buffer 0,01М, pH 6,0) в водяной бане ($t=95^{\circ}\text{C}$) с микропроцессором pT Link (Dako, Дания). 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, 1:200. В качестве вторичных антител использовалась универсальная двухкомпонентная система детекции HiDef Detection™ HRP Polymer system, («Cell Marque», США), анти–IGG мыши/кролика, пероксидаза хрена (HRP) и субстрат DAB (Novolink, Leica Biosystems, Великобритания). Для каждого маркера выполнялись контрольные исследования. Титр антител подбирали с использованием раствора для разведения антител Antibody Diluents (DAKO, Дания).

Метод трансмиссионной электронной микроскопии. Образцы органов фиксировали по Ито-Карновски с постфиксацией 1% тетрооксидом осмия (S. Ito, M. Karnovsky et al., 1968). Дегидратированный материал заливали в смолу LR White («London Resin Company Ltd», Великобритания). Ультратонкие срезы изготавливали на ультратоме LKB–8800 (LKB AB, Швеция), контрастировали по методу Reynolds (Reynolds E.S, 1963), просматривали и фотографировали в электронном микроскопе «JEM 2100Plus» («JEOL Ltd.», Япония) в режиме высокого вакуума при ускоряющем напряжении 160 кВ.

Определение уровней мРНК интерлейкинов. В парафиновых срезах надпочечников проводили выделение тотальной клеточной РНК с использованием набора 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 оценивали с помощью электрофореза в агарозном геле (FlashGel System, США). Обратную транскрипцию для генов-мишеней выполняли с использованием набора для обратной транскрипции QuantiTect (Qiagen, Германия). 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.

Статистическая обработка результатов исследования. Для статистической обработки результатов и определения средних значений использовали программу MS Excel 2010. Для оценки статистической значимости проводили сравнения по критерию Стьюдента. Данные представлены в виде среднеарифметического значения стандартной ошибки ($M \pm m$). Статистически значимыми считали различия при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика штаммов, используемых для экспериментального моделирования сепсиса. У обоих штаммов Ра было выявлено наличие генов *exoA*, *exoT*, *exoY*. У штамма Ра 1623 присутствовали гены *exoS* и отсутствовал ген *exoU*; у штамма Ра 5266, напротив, присутствовал ген *exoU* и отсутствовал ген *exoS*. Таким образом, опытные штаммы Ра могут быть охарактеризованы следующим образом: штамм Ра 1623 (*exoA*⁺, *exoT*⁺, *exoY*⁺, *exoS*⁺, *exoU*⁻); штамм Ра 5266 (*exoA*⁺, *exoT*⁺, *exoY*⁺, *exoS*⁻, *exoU*⁺).

Показатели фосфолипазной активности (диаметр венчика и коэффициент М±m) были более высокими у штамма *P. aeruginosa* 1623 (Таблица 1).

Таблица 1 – Показатели фосфолипазной активности штаммов Ра 1623 и Ра 5266

Штамм	Диаметр венчика (мм, М ± m)	Диаметр колонии (мм, М ± m)	Коэффициент М ± m
Ра 1623	0,91 ± 0,06	1,77 ± 0,15	0,53 ± 0,02*
Ра 5266	0,013 ± 0,0058	1,97 ± 0,033	0,007 ± 0,0067*

Примечание: данные представлены: М ± m – среднеарифметическое значение ± стандартная ошибка. * – различия статистически значимы (при p < 0,05)

Показатели гемолитической активности, напротив, более высокими были у штамма Ра 5266 (Таблица 2).

Таблица 2 – Показатели гемолитической активности штаммов Ра 1623 и Ра 5266

Штамм	Результат (OD)	% лизиса
Ра 1623	0,138±0,0016*	65,03
Ра 5266	0,183±0,0011*	92,64
Физиологический раствор	0,032±0,00064	-
SDS	0,195±0,00295	-

Примечание: * – различия статистически значимы (p ≤ 0,05)

Экспериментальные модели сепсиса, основанные на внутрибрюшинном введении культур Ра. Животным первой опытной группы (n = 12) внутрибрюшинно вводили культуру штамма Ра 5266; LD₁₀₀ составила 3×10⁷ КОЕ/мышь, терминальную стадию регистрировали через 20-24 часа после заражения. LD₅₀ в этой группе составила 1,3×10⁷ КОЕ/мышь, терминальная стадия регистрировалась к 48 часам.

Животным второй опытной группы (n = 12) внутрибрюшинно вводили культуру штамма Ра 1623; LD₁₀₀ составила 7×10⁶ КОЕ/мышь и LD₅₀ – 6,2×10⁶ КОЕ/мышь. Терминальная стадия при LD₁₀₀ наступала через 24-26 часов после заражения, при LD₅₀ гибель животных регистрировалась к 72 часам. Для создания моделей были избраны дозы заражения Ра LD₁₀₀, так как длительность септического процесса была одинакова для всех животных и летальность

составляла 100%. Получено воспроизводство моделей с LD₁₀₀ для штаммов Ра 1623 и Ра 5266 в двух повторах.

Результаты высеваемости *P. aeruginosa* из крови, перитонеальной жидкости и гомогенатов органов. Результативность посева Ра из крови животных в обеих моделях оказалась высокой уже через 15 мин после введения Ра в брюшную полость и составила (в КОЕ/мл): в модели 1623 – $2,01 \times 10^4 \pm 7,2 \times 10^2$ (lg 4,5); в модели 5266 – $3,90 \times 10^4 \pm 9,38 \times 10^2$ (lg 5,5). Высокому уровню высеваемости Ра 1623 и Ра 5266 из крови в первые 15 мин соответствовало падение высеваемости из перитонеальной жидкости (Рисунок 1.1, Рисунок 1.2). К терминальной стадии сепсиса происходило еще большее сближение показателей высева из крови и перитонеальной жидкости. Из гомогенатов органов максимальный уровень высеваемости достигался в обеих моделях к первому часу после заражения. К терминальной стадии показатели высеваемости из органов приближались в обеих моделях к сходной высокой отметке (Рисунок 1.1, Рисунок 1.2).

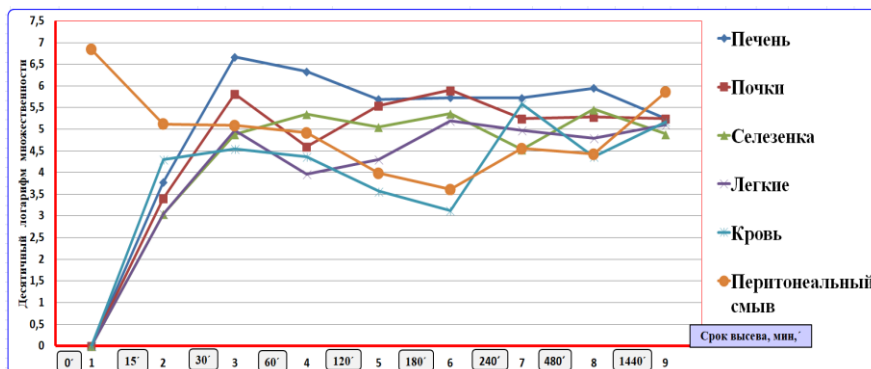


Рисунок 1.1 – Высеваемость *P. aeruginosa* 1623 из перитонеальной жидкости, крови и гомогенатов органов в динамике сепсиса (по оси ординат – десятичный логарифм множественности, по оси абсцисс – время заражения в минутах: от 0 до 1440 мин [24 часа])

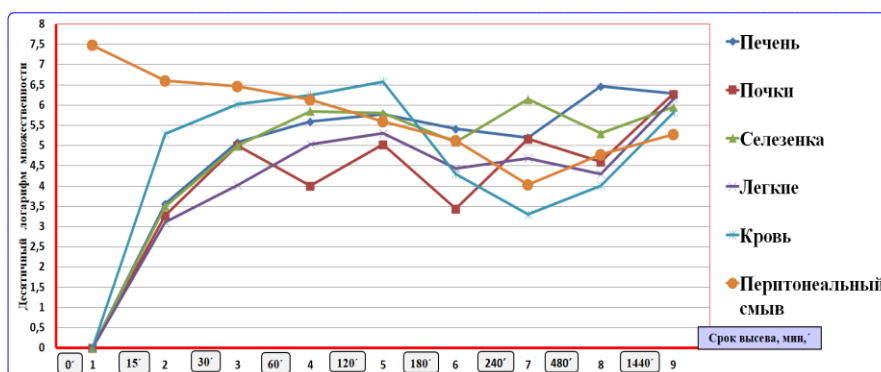


Рисунок 1.2 – Высеваемость *P. aeruginosa* 5266 из перитонеальной жидкости, крови и гомогенатов органов в динамике сепсиса (по оси ординат – десятичный логарифм множественности, по оси абсцисс – время заражения в минутах: от 0 до 1440 мин [24 часа])

Гистологические изменения органов на терминальной стадии экспериментального сепсиса. На терминальной стадии сепсиса у животных в рамках двух созданных моделей

(модель 1623 и модель 5266) были выявлены достоверные различия в гистологических изменениях печени, почек и селезенки; различий в реакции легких и надпочечников обнаружено не было.

Изменения гистоструктуры **легких** в обеих моделях (Рисунок 2.1, Рисунок 2.2) состояли из: неравномерного аэрирования легочной паренхимы (наряду с зонами интерстициального отека и практически спавшихся альвеол присутствовали «гипераэрированные» участки с разрывами легочных ацинусов), признаков гиперемии и диапедеза эритроцитов в легочные альвеолы, очагов лейкоцитарной инфильтрации с краевым стоянием лимфоцитов в венах. В совокупности перечисленные признаки могут расцениваться как реакция острого воспаления. Отмечены деструктивные изменения слизистой оболочки мелких внутрилегочных бронхов в виде клазматоза эпителия, частичной или полной облитерации клазматозными массами и слизи просветов мелких бронхов, с чем могло быть связано неравномерное аэрирование респираторной части легких. В совокупности, зарегистрированные реактивные изменения легких могли служить ведущей (или одной из ведущих) причин летального исхода сепсиса.

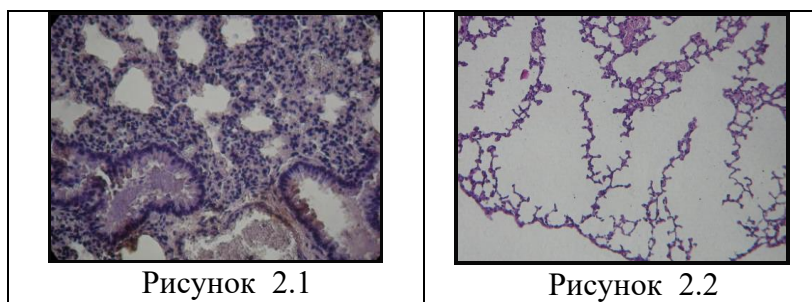


Рисунок 2.1 – Модель 5266, терминальная стадия сепсиса. Фрагмент легкого: интерстициальный отек, спавшиеся легочные ацинусы. Окрашивание: гематоксилин и эозин. Увеличение: $\times 200$

Рисунок 2.2 – Модель 5266, терминальная стадия сепсиса. Фрагмент легкого. Разрывы легочных ацинусов. Окрашивание: гематоксилин и эозин. Увеличение: $\times 100$

Реактивные изменения гистологической структуры **надпочечников** были также однотипны в обеих моделях. Изменения заключались в венозном полнокровии с картинами стаза в мозговом веществе, дезинтеграции citoархитектоники и разрушении клеток коркового и мозгового вещества. Количественно подтверждено уменьшение абсолютной площади столбчатой части пучковой зоны – продуцента кортикостероидов, прогрессирующее в динамике сепсиса (с $23488,65 \pm 2451,07$ усл. ед. в модели 1623 и с $29166,18 \pm 494,58$ усл. ед. в модели 5266 в первые 1,5 часа после заражения до $12086,29 \pm 1397,77$ и $16533,17 \pm 2652,3$ усл. ед. соответственно – к терминальной стадии). Отмечена тенденция к снижению абсолютной площади клубочковой зоны, производящей минералокортикоиды. В кортикостероцитах клубочковой зоны и столбчатой части пучковой зоны на ультраструктурном уровне

зарегистрированы: разрушение органелл мембранного типа, отсутствие липидных включений – субстрата для биосинтеза стероидов, появление на их месте крупных вакуолей, фигур апоптоза (Рисунок 3.1, Рисунок 3.2, Рисунок 3.3). Показатели абсолютной площади мозгового вещества варьировали у разных животных (в рамках каждой модели), что связано с различиями в степени венозного полнокровия. В хромаффиноцитах присутствовали: вакуолярная деструкция митохондрий, разрушение гранулярной эндоплазматической сети, разрушение и уменьшение численности секреторных гранул. Вторичных септических очагов, как и очагов лейкоцитарной инфильтрации, в надпочечниках животных обеих моделей зарегистрировано не было (кроме отдельных небольших групп лейкоцитов на границе коры с мозговым веществом), что согласуется с мнением исследователей о том, что при синегнойном сепсисе лейкоцитарная инфильтрация может отсутствовать или быть незначительной (Мишнев О.Д. с соавт., 2004).

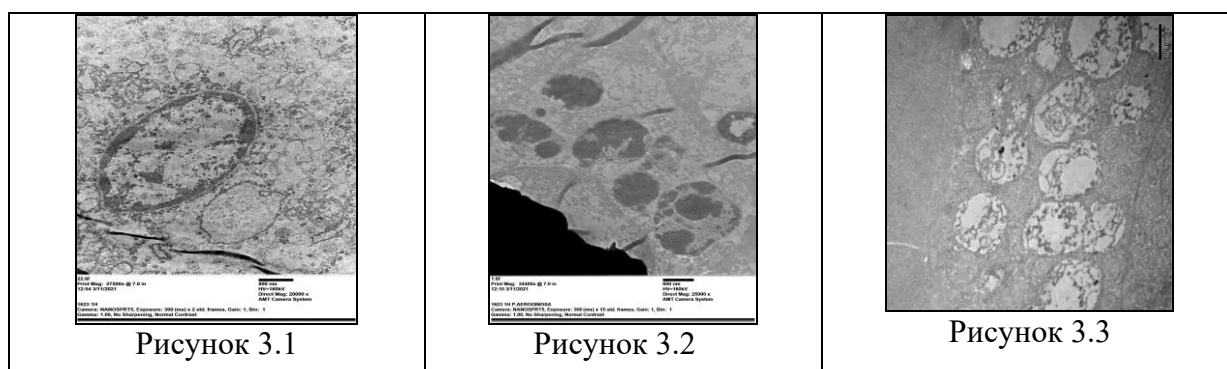


Рисунок 3.1 – Рисунок 3.3 – Модель 1623, терминальная стадия сепсиса. Ультраструктурные признаки дегенерации кортикостероцитов:

Рисунок 3.1 - Хроматинолиз ядра и разрушение мембранных органелл. Электроннограмма. Увеличение: – $\times 7000$

Рисунок 3.2 – Апоптоз, Электроннограмма. Увеличение: – $\times 20000$,

Рисунок 3.3 - Разрушение органелл с выходом в вакуолярную дегенерацию. Электроннограмма. Увеличение: – $\times 20000$.

В микроциркуляторных сосудах, в клетках и в межклеточном веществе надпочечников присутствовали морфологически неизмененные клетки *P. aeruginosa*. В тканях надпочечников у животных обеих моделей зарегистрированы высокие показатели оптической плотности (ОП) мРНК провоспалительных интерлейкинов: ИЛ–1бета, ИЛ–6, ФНО (с соответствующими максимальными значениями: $17,25 \pm 0,67$; $13,95 \pm 1,33$; $8,53 \pm 0,58$ ед. ОП в модели 1623 и $16,58 \pm 1,53$; $14,69 \pm 1,76$; $9,72 \pm 0,64$ ед. ОП – в модели 5266), а также позитивное иммуногистохимическое окрашивание эндотелия сосудов и части клеток коркового вещества на провоспалительный цитокин ИЛ–1бета, что указывает на вероятность синтеза этих провоспалительных цитокинов клетками надпочечников. Приведенные выше факты свидетельствуют в пользу выраженной функциональной недостаточности (истощения)

надпочечников к терминальной стадии сепсиса и возможного участия этих желез в формировании характерного для сепсиса «цитокинового шторма».

Гистологические изменения **селезенки** были различны в двух созданных моделях. В модели 1623 реакция белой пульпы – источника активных форм лимфоцитов, проявлялась в виде гиперплазии, а в модели 5266 – в виде гипоплазии. Показатели абсолютной площади белой пульпы селезенки на терминальной стадии сепсиса были равны: в модели Ра 1623 – $59266,14 \pm 1750,25$ усл. ед. и в модели 5266 – $30585,71 \pm 3039,52$ усл. ед; в контрольной группе – $38463,815 \pm 1599,89$ усл. ед. ($p < 0,05$). Вместе с тем, столь разная реакция белой пульпы сопровождалась массовым апоптозом лимфоцитов. Не исключено, что самоуничтожение лимфоцитов, возникающее как при гипер-, так и при гипоплазии белой пульпы, составляет основу неэффективности иммунной функции селезенки при сепсисе, даже если существенно выражена гиперплазия белой пульпы (как в модели 1623), направленная на поддержание этой функции.

Гистологические изменения **печени** в модели 1623 в подавляющем большинстве случаев были менее выраженными, нежели в модели 5266, и характеризовались утратой дольковой структуры паренхимы органа, вакуолярной дегенерацией и хроматинолизом гепатоцитов, снижением содержания общего белка в гепатоцитах, стазом крови в печеночных синусоидных капиллярах. В модели 5266, помимо признаков, отмеченных для модели 1623, была практически полностью утрачена балочная организация гепатоцитов, в перисинусоидных пространствах отмечалось скопление эозинофильных масс белка, присутствие рассеянных очагов лейкоцитарной инфильтрации, участков некроза паренхимы, отдельных тромбов. Известно, что некротический эффект (Phillips R.M. et al., 2003, Strateva T.C et al., 2011), заключающийся в лизисе клеточных мембран, свойственен экзотоксину U, геном которого обладает штамм Ра 5266.

В структуре **почек** в модели 1623 зафиксировано выраженное (по сравнению с изменениями почек в модели 5266) разрушение субкапсулярно расположенных проксимальных канальцев (принадлежащих, по всей видимости, корковым фильтрующим нефронам) (Рисунок 4.1) В гистологически неизмененных проксимальных канальцах, располагающихся более глубоко в корковом веществе и принадлежащих, вероятно, промежуточным фильтрующим нефронам, находились эозинофильные массы белка, что указывает на затруднение его реабсорбции. На субмикроскопическом уровне в эпителиоцитах таких канальцев отмечалось разрушение щеточной каемки и базальной исчерченности, осуществляющих процесс реабсорбции, а также обнаружены Ра. Известно деструктивное влияние экзотоксина S на элементы цитоскелета (Kipnis E. et al., 2006, Lee V.T. et al., 2005), при участии которого клетки проксимальных канальцев в норме сохраняют морфологическую

целостность щеточной каемки, производящей реабсорбцию. В модели 1623 выявлены уменьшение размеров и деформация телец корковых и промежуточных нефронов, деструкция их клеток с пикнозом ядер, резкое снижение кровенаполнения капилляров (Рисунок 4.2). Капиллярные клубочки юкстамедуллярных (нефильтрующих) нефронов, напротив, были переполнены кровью. В венозных сосудах мозгового вещества присутствовали признаки стаза. В совокупности зафиксированные структурные изменения почек в модели 1623 указывают на существенную роль нарушений реабсорбционной функции фильтрующих нефронов в формировании характерной для сепсиса гипоальбуминемии и на нарушение микроциркуляции (вследствие шунтирования и сброса крови через систему юкстамедуллярных нефронов) как на возможную причину деструктивных изменений почечных телец и канальцев фильтрующих нефронов при сепсисе. В почках животных в модели 1623 были обнаружены в разной степени выраженные деструктивные изменения дистальных канальцев, петель Генле и собирательных трубочек.

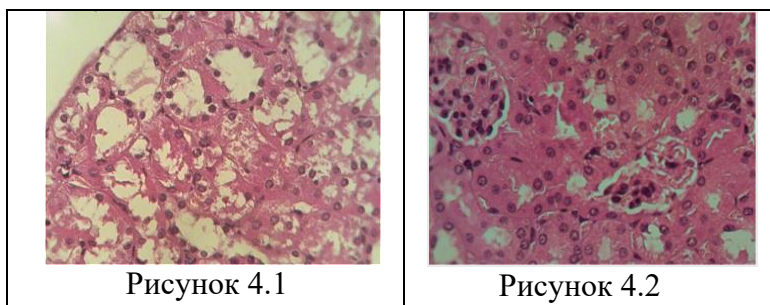


Рисунок 4.1 – Модель 1623, терминальная стадия сепсиса. Фрагмент почки: разрушение субкапсулярно расположенных проксимальных канальцев нефронов (корковых нефронов). Окрашивание: – гематоксилин и эозин. Увеличение: – $\times 200$.

Рисунок 4.2 - Модель 1623, терминальная стадия сепсиса. Фрагмент почки: деформация телец корковых нефронов, пикноз клеточных ядер, отсутствие кровенаполнения капиллярных клубочков. Окрашивание: – гематоксилин и эозин. Увеличение: – $\times 400$.

«Взаимодействие» Ра с эритроцитами. В обеих моделях при трансмиссионной электронной микроскопии крови вокруг бактериальных клеток Ра 1623 и Ра 5266, а также в участках их контактов с эритроцитами отмечалось исчезновение мелкодисперсной ультраструктуры плазмы крови, что может косвенно указывать на влияние продуктов метаболизма Ра на ультраструктурную текстуру плазмы, создающуюся и поддерживающуюся молекулами белка (Рисунок 5.1). Зарегистрировано образование эритроцитами множественных «выростов» в направлении бактериальных клеток и превращение эритроцитов в стареющие формы – эхиноциты. Направленность таких “выростов” указывает на возможную связь между их формированием и действием факторов вирулентности Ра.

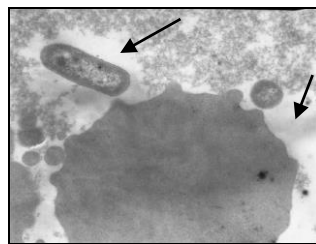


Рисунок 5.1 – Модель 1623, терминальная стадия сепсиса. Исчезновение ультраструктурной текстуры плазмы крови вокруг Ра (стрелки), формирование микровыростов эритроцита. Электроннограмма. Увеличение: $\times 30000$.

Оценка эффективности Астрабионорма. Результаты проведенного бактериологического исследования указали на комплексное влияние АБ на Ра. Так, *in vitro* АБ подавлял рост и подвижность обоих штаммов Ра. Под влиянием АБ подвижность штамма Ра 1623 подавлялась в 2,2 и 9,5 раза в зависимости от продолжительности экспозиции с АБ (60 и 120 мин соответственно); для штамма Ра 5266 подавление подвижности к 60 мин экспозиции достигало 2,8 раза, а к 120 минутам отмечалось полное отсутствие видимого роста (Таблица 3).

Таблица 3 – Влияние Астрабионорма на рост Ра на среде Motility Test Medium

Штамм	Диаметр зоны роста Ра (мм, $M \pm m$)		
	До обработки АБ	Через 60 минут	Через 120 минут
Ра 1623	$4,47 \pm 0,32^*$	$2,07 \pm 0,067^{**}$	$0,47 \pm 0,033^{***}$
Ра 5266	$2,43 \pm 0,033^\Delta$	$0,87 \pm 0,088^\#$	Отсутствие роста

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

Отмеченное угнетение подвижности может указывать на жгутики Ра как потенциальную мишень АБ.

Предварительные испытания свойств Астрабионорма в использованных концентрациях доказали отсутствие его токсичности для животных. Через 60 минут после внутрибрюшинной инъекции Ра, когда у животных явно проявлялись признаки нарушения общего состояния, повторные введения АБ показали отличный результат: выжили 100% леченых мышей. По-видимому, полная выживаемость связана, прежде всего, с бактерицидным действием АБ на Ра, поскольку в обеих моделях на 7 сутки Ра не высевались ни из перитонеальной жидкости, ни из крови, ни из гомогенатов органов. При последующем (в течение 6 месяцев) наблюдении за лечеными АБ мышами не было выявлено каких-либо изменений в их общем состоянии.

Известно, что *in vivo* альдегид муравьиной кислоты в минимальных количествах образуется в организме человека в ходе физиологического метаболизма (Song, X. A et al., 2018), а в очагах воспаления накапливаются более высокие его концентрации. Результаты анализа антимикробного действия препарата АБ, проведенного *in vitro* после суточной инкубации обоих

штаммов Ра на 96-ти луночном планшете, показали достоверное снижение оптической плотности (ОП) культур обоих штаммов (таблица 4). 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 4 – Антимикробное действие Астрабионорма (по значениям ОП)

	Штамм	Разведение		
		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
1	Ра 1623 + АБ	$0,056 \pm 0,0028^{\#}$	$0,104 \pm 0,0038^{##}$	$0,483 \pm 0,053^{###}$
2	Ра 5266 + АБ	$0,088 \pm 0,0027^{\bullet}$	$0,096 \pm 0,021^{\bullet\bullet}$	$0,509 \pm 0,049^{\bullet\bullet\bullet}$
3	Ра 1623	$0,704 \pm 0,138^*$	$0,852 \pm 0,0054^{**}$	$0,860 \pm 0,032^{***}$
4	Ра 5266	$0,712 \pm 0,041^{\star}$	$0,865 \pm 0,02^{\star\star}$	$0,858 \pm 0,017^{\star\star\star}$
5	Контроль (АБ в LB-бульоне)	$0,058 \pm 0,0012$	$0,047 \pm 0,00067$	$0,054 \pm 0,0017$

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

С угнетением подвижности (и, соответственно, со снижением эффективности преодоления Ра барьерных свойств брюшины), а также антимикробным действием АБ может быть связано и отмеченное нами последовательное и прогрессирующее снижение высевов Ра из крови и органов в динамике сепсиса. Так, продуктивность высевов возбудителей из крови в модели 1623 повышалась с $8,0 \times 10^2 \pm 1,9 \times 10^2$ КОЕ/мл к 4 часам после заражения до $5,0 \times 10^3 \pm 3,9 \times 10^2$ КОЕ/мл к 24 часам; на 7 сутки высев отсутствовал полностью. Динамика высевов в модели 5266 составляла $2,2 \times 10^4 \pm 1,1 \times 10^3$ КОЕ/мл к 4 часам, $8,0 \times 10^2 \pm 8,0 \times 10^1$ КОЕ/мл – к 24 часам, на 7 сутки была получена лишь 1 изолированная колония. Результативность высева Ра из гомогенатов печени в той же хронологической последовательности составила: в модели 1623: $1,2 \times 10^3 \pm 8,8 \times 10^1$ КОЕ/г, $1,2 \times 10^3 \pm 1,8 \times 10^2$ КОЕ/г, к 7 суткам – 1 колония; в модели 5266: $2,2 \times 10^4 \pm 1,1 \times 10^3$ КОЕ/г; $3,6 \times 10^2 \pm 4,1 \times 10^1$ КОЕ/г; к 7 суткам высев отсутствовал. Динамика высеваемости Ра из почек составила в модели 1623: $1,0 \times 10^5 \pm 1,3 \times 10^4$ КОЕ/г; $1,9 \times 10^3 \pm 2,2 \times 10^2$ КОЕ/г, к 7 суткам – 3 колонии; в модели 5266: $9,7 \times 10^4 \pm 7,5 \times 10^3$ КОЕ/г; $2,2 \times 10^3 \pm 1,5 \times 10^2$ КОЕ/г; к 7 суткам высев отсутствовал. Высеваемость Ра из селезенки в модели 1623 составляла последовательно: $4,7 \times 10^5 \pm 2,9 \times 10^4$ КОЕ/г; $8,3 \times 10^2 \pm 4,1 \times 10^1$ КОЕ/г к 7 суткам высев отсутствовал. В модели 5266: $9,2 \times 10^4 \pm 7,5 \times 10^3$ КОЕ/г; $5,8 \times 10^3 \pm 7,1 \times 10^2$ КОЕ/г; к 7 суткам высев отсутствовал. Результативность высевов Ра из легких: в модели 1623 последовательно равнялась: $2,6 \times 10^4 \pm 1,6 \times 10^3$ КОЕ/г, $8,3 \times 10^2 \pm 2,9 \times 10^1$ КОЕ/г, к 7 суткам – 10 колоний. В модели 5266: $3,3 \times 10^4 \pm 3,0 \times 10^3$ КОЕ/г; $1,4 \times 10^3 \pm 2,7 \times 10^2$ КОЕ/г; к 7 суткам – 5 колоний. Последовательные показатели высевов Ра из надпочечников составили: в модели 1623 – $1,9 \times 10^4 \pm 2,2 \times 10^3$ КОЕ/г,

$3,7 \times 10^2 \pm 4,3 \times 10^1$ КОЕ/г; к 7 суткам высев отсутствовал. В модели 5266: $5,7 \times 10^4 \pm 4,0 \times 10^3$ КОЕ/г; $4,6 \times 10^2 \pm 5,7 \times 10^1$ КОЕ/г; к 7 суткам высев отсутствовал.

Гистологические особенности легких, печени, почек и селезенки леченых препаратом АБ животных соответствовали их физиологической микроструктуре. Надпочечники животных, леченых АБ, в рамках обеих моделей к 24 часам имели особенности, отличающие их от контрольных показателей. Клетки коркового вещества имели резко просветленную цитоплазму (возможный признак голокриновой секреции), что предположительно может расцениваться как напряженное функциональное состояние коры надпочечников. В мозговом веществе присутствовали признаки разрушения кластеров хромаффиноцитов. На 7-е сутки в надпочечниках септических животных, получавших лечение АБ, полностью восстанавливались и соответствовали контрольным признакам цитоархитектоника коры и мозгового вещества надпочечников, физиологическая зональность коры и светооптические свойства кортикостероцитов и хромаффиноцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного комплексного анализа патогенных свойств штаммов *P. aeruginosa* 1623 и *P. aeruginosa* 5266, бактериологического исследования, гистологического анализа органов позволяют заключить, что внутрибрюшинное введение *P. aeruginosa* в примененных дозах (для штамма Ра 1623 – 7×10^6 КОЕ/мышь; для штамма Ра 5266 – 3×10^7 КОЕ/мышь), вызывают острый экспериментальный сепсис, который характеризуется развитием ранней (в течение 15-30 минут) бактериемии, быстрым (в пределах первого часа после заражения) обсеменением органов, гибелью 100% животных в течение 20-26 часов. Ведущей причиной летальности предположительно могут быть выраженные нарушения в гистологической структуре легких и надпочечников, хотя выявленные нарушения структуры других исследованных органов, несомненно, усугубляют течение сепсиса, и способствуют летальному исходу. Результаты проведенного комплексного анализа влияния Астрабионорма на свойства штаммов *P. aeruginosa* 1623 и *P. aeruginosa* 5266, бактериологические показатели высевок, гистологические характеристики органов, позволяют сделать заключение о его 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 LD_{50} 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 LD_{50} составляет $1,3 \times 10^7$ КОЕ/мышь и вызывает гибель животных в течение 48 часов. Дозы LD_{100} , 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 позволяют применять разработанную экспериментальную модель для изучения патогенеза сепсиса, апробирования действия лекарственных средств, а также рекомендовать дальнейшее изучение эффекта Астрабионорма.

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

Статьи:

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.

Аннотация

Диссертационная работа посвящена актуальному вопросу современной экспериментальной и клинической медицины – изучению проблемы сепсиса. Целью диссертационного исследования явилось создание экспериментальной модели синегнойного сепсиса и оценка эффективности лекарственного средства «Астрабионорм» (Астрабионорм). В рамках исследования были отобраны два штамма *P. aeruginosa* 5266 и *P. aeruginosa* 1623, различающиеся по наличию генов экзотоксинов *exoU* и *exoS*, степени фосфолипазной и гемолитической активности, по степени подвижности. Была разработана воспроизводимая гибель мышей в результате внутрибрюшинного заражения, изучена динамика высева *P. aeruginosa* из перитонеальной жидкости, крови и гомогенатов печени, почек, легких, селезенки, надпочечников септических животных от момента заражения до терминальной стадии.

Введение *P. aeruginosa* в дозах: для штамма *P. aeruginosa* 1623 – 7×10^6 КОЕ/мышь; для штамма *P. aeruginosa* 5266 – 3×10^7 КОЕ/мышь, вызывало острый экспериментальный сепсис, характеризующийся развитием ранней (в течение 15-30 минут) бактериемии, быстрым (в пределах первого часа после заражения) обсеменением органов, гибелью 100% животных в течение 20 - 26 часов. Проанализированные гистологические изменения вышеуказанных органов на терминальной стадии сепсиса в созданных моделях указывают на существование зависимости между степенью их структурных изменений и биологическими свойствами конкретного штамма *P. aeruginosa*. 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.

Результаты проведенного комплексного анализа влияния Астрабионорма: снижение уровней высева *P. aeruginosa* из крови и органов в первые часы сепсиса и отсутствие высева на 7 сутки после окончания лечения; соответствие структуры исследованных органов их физиологическому состоянию, позволяют сделать заключение об эффективности Астрабионорма и возможности использования разработанной экспериментальной модели синегнойного сепсиса для оценки эффективности лекарственных средств.

Summary

The dissertation is dedicated to the current issue of modern experimental and clinical medicine - the study of the problem of sepsis. The aim of the dissertation research was to create an experimental model of *Pseudomonas aeruginosa* sepsis and evaluate the effectiveness of the drug «Astrabionorm» (Astrabionorm). As part of the study, two strains of *P. aeruginosa* 5266 and *P. aeruginosa* 1623 were selected, differing in the presence of exotoxin genes *exoU* and *exoS*, the degree of phospholipase and

hemolytic activity, and the degree of mobility. A reproducible death of mice as a result of intraperitoneal infection was developed, the dynamics of *P. aeruginosa* seeding from peritoneal fluid, blood and homogenates of the liver, kidneys, lungs, spleen, adrenal glands of septic animals from the moment of infection to the terminal stage was studied. The introduction of *P. aeruginosa* in doses: for the *P. aeruginosa* strain 1623 – 7×10^6 CFU/mouse; for the *P. aeruginosa* strain 5266 – 3×10^7 CFU/mouse, caused acute experimental sepsis, characterized by the development of early (within 15-30 minutes) bacteremia, rapid (within the first hour after infection) seeding of organs, death of 100% of animals within 20-26 hours. The analyzed histological changes in the above-mentioned organs at the terminal stage of sepsis in the created models indicate the existence of a relationship between the degree of their structural changes and the biological properties of a specific *P. aeruginosa* strain. High levels of mRNA of proinflammatory cytokines (IL-1beta, IL-6, TNF) in adrenal tissues and a positive immunolabeling reaction for IL-1beta indicate the participation of the adrenal glands in creating a cytokine imbalance in sepsis.

The results of the comprehensive analysis of the effect of Astrabionorm: a decrease in the levels of *P. aeruginosa* seeding from the blood and organs in the first hours of sepsis and the absence of seeding on the 7th day after the end of treatment; compliance of the structure of the studied organs with their physiological state, allow us to conclude that Astrabionorm is effective and that the developed experimental model of *Pseudomonas aeruginosa* sepsis can be used to evaluate the effectiveness of drugs.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АБ – лекарственное средство под условным внутрилабораторным названием «Астрабионорм» (Астрабионорм)
 ИЛ-1бета – интерлейкин 1бета
 ИЛ-6 – интерлейкин 6
 ИЛ-10 – интерлейкин 10
 мРНК – матричная (информационная) РНК
 ОП – оптическая плотность
 ПЦР – полимеразная цепная реакция
 Усл. ед. – условные единицы
 ФНО – фактор некроза опухоли
 LD50 – средняя инфицирующая доза, вызывающая гибель половины животных опытной группы
 LD100 – средняя инфицирующая доза, вызывающая гибель всех животных опытной группы
 Ра – *Pseudomonas aeruginosa* (синегнойная палочка)
 Ра 5266 – *Pseudomonas aeruginosa* 5266
 Ра 1623 – *Pseudomonas aeruginosa* 1623
 SDS – додецилсульфат натрия