

УДК 616-092.9

## К ПРОБЛЕМЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ СЕПСИСА

© 2021 г. М. Н. Черкасова\*

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи,  
Москва, Россия

\*e-mail: mari.cherkasova.1991@bk.ru

Поступила в редакцию 12.10.2020 г.

После доработки 13.10.2020 г.

Принята к публикации 13.10.2020 г.

Обсуждаются четыре варианта экспериментальных моделей сепсиса: инъекционных, хирургических, ожоговых, моделей пневмонии с переходом в сепсис. Проанализированы положительные и отрицательные стороны каждой из них. Отмечено, что оптимальный выбор животных является важнейшим условием для успешного моделирования сепсиса. Рассмотрены некоторые аспекты анатомии, физиологии и иммунологии, свойственные определенному виду млекопитающих. Принимая во внимание существующие различия реакций, можно отметить комплексы признаков, которые при сепсисе близки или идентичны у разных представителей животных. Однако, несмотря на ограничения, которые касаются каждой модели сепсиса, целесообразно использовать разные модели на разных видах животных. Сопоставление и сравнение полученных в процессе экспериментов результатов крайне важно для выяснения патогенетических критериев сепсиса.

*Ключевые слова:* модель, сепсис, эндотоксин, штамм, патогенез

DOI: 10.31857/S0042132421030054

### ВВЕДЕНИЕ

На протяжении всей истории человечества тяжелые эпидемии и пандемии поражали целые народы и уносили колоссальные количества жизней. Сегодня, когда такие особо опасные инфекции как чума и натуральная оспа остались в прошлом, на первый план вышли другие не менее тревожные проблемы, одна из которых – сепсис. Термин “сепсис” достаточно древний, происходит от греческого слова “разложение, гниение” и встречается в поэмах Гомера, трудах Гиппократ и Галена более 2.5 тыс. лет назад.

В 1914 г. немецкий врач Х. Шоттмюллер впервые сформулировал микробиологическую концепцию сепсиса. Согласно данной концепции, ведущую роль в патогенезе сепсиса играют бактерии, которые попадают в кровоток из инфекционного очага (Хаертынов и др., 2014). Длительный период изучения сепсиса, к сожалению, не привел к полному пониманию закономерностей развития этого опасного для жизни состояния. В современном представлении сепсис – это нерегулируемая системная воспалительная реакция организма на инфекционный агент, приводящая к тяжелой дисфункции жизненно важных органов, с высоким риском летального исхода. Как известно, воспалительный ответ организма подразделяется на две последовательные составляющие: провоспалительный ответ и компенсаторный противо-

воспалительный ответ. Первая составляющая (или стадия), как полагают, – результат активации механизмов врожденного иммунитета, сопровождающийся увеличением циркулирующих провоспалительных цито- и хемокинов. Развитие сепсиса происходит в том случае, когда иммунный ответ организма не может “правильно перейти” из стадии системного провоспалительного ответа в стадию компенсаторного противовоспалительного ответа и таким образом справиться с инфекцией. В этих случаях течение воспаления становится неуправляемым и завершается полиорганной недостаточностью с исходом в септический шок (Черных и др., 2001; Belikoff, Buras, 2008). Многофакторность развития сепсиса – главная причина невозможности точного воспроизведения этой патологии в экспериментальных моделях, которое позволило бы провести тщательное исследование закономерностей этого состояния. В то же время модель сепсиса, как и экспериментальная модель любого другого заболевания, должна представлять собой тестовую систему с возможностью неоднократного воспроизведения и подтверждения на патоморфологическом, патофизиологическом и биохимическом уровнях. На IX международной конференции Виггерс–Бернард (9th Wiggers–Bernard Conference), состоявшейся 3–5 мая 2017 г. в Вене, Австрия, для повышения качества и эффективности исследова-

ний были предложены руководящие принципы, рекомендации и ограничения, применимые для доклинических моделей сепсиса “Minimum quality threshold in pre-clinical sepsis studies”, MQTiPSS. Предполагается, что эти рекомендации должны служить вспомогательной платформой при анализе полученных экспериментальных данных и способствовать повышению уровня надежности их экстраполяции на развитие сепсиса у человека (Osuchowski et al., 2018; Hellman et al., 2019; Libert et al., 2019; Zingarelli et al., 2019)

### ОСНОВНЫЕ ПРОБЛЕМЫ В ВЫБОРЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Важным условием успеха экспериментального моделирования сепсиса является оптимальный выбор животных. Чаще всего в лабораторных условиях используют грызунов – мышей и крыс, что в основном связано с их относительно низкой стоимостью, возможностью получения генетически выведенных особей с определенными признаками и обусловлено высокой плодовитостью и коротким жизненным циклом. Средняя продолжительность жизни лабораторной мыши (Zingarelli et al., 2019), предположительно, составляет 24 мес. (то есть 9 дней жизни мыши примерно эквивалентны 1 году жизни человека, или 1 ч ее жизни сопоставим с 40 часами жизни человека). Хотя приведенное сопоставление не в пользу мыши в качестве объекта для моделирования, даже столь краткие сроки жизни этих животных позволяют проводить повторные тестирования моделей и наблюдать повторные циклы развития сепсиса в достаточно сжатые промежутки времени. Объективным преимуществом использования в опытах мышей является и то, что их геном хорошо охарактеризован (полная геномная последовательность линии C57Bl/6 *Mus musculus* была секвенирована в 1990-х гг. Консорциумом по секвенированию генома мыши). При этом выявлено, что около 80% генов мышей имеют один идентифицируемый ортолог в геноме человека. Генетически модифицированные животные оказались очень полезными для изучения клеточных и молекулярных механизмов патологических процессов и метаболических изменений при заболеваниях человека (Stortz et al., 2017; Guillon et al., 2019). Но существующие недостатки экспериментальных моделей на грызунах, конечно, связаны с их анатомическими и физиологическими несоответствиями по отношению к организму человека и других животных (Guillon et al., 2019). В модели полимикробного сепсиса, инициированного внутрибрюшинным введением фекальной суспензии крысам линии Wistar и мышам линии C57Bl/6, проводили анализ скорости метаболизма (потребления кислорода и выделения углекислого газа), величины сердечного выброса (методом

эхокардиографии) и показателей термометрии. В организме мышей наблюдалось прогрессирующее снижение поступления кислорода с одновременным падением температуры тела, а данные метаболических изменений совпадали с выраженным нарушением систолической активности левых отделов сердца. В отличие от мышей, сниженный сердечный выброс, соответствующий изменению этого показателя у больного сепсисом человека, присутствовал только у тяжело больных крыс. К терминальной стадии (во время геморрагического шока или тяжелой гипоксии) у крыс регистрировалось снижение потребления кислорода, что, однако, не столь выражено у пациентов с сепсисом (Naouzi, van de Louw, 2013). Важной особенностью мышей, по сравнению с человеком, объясняющей их защитные механизмы в ответ на гипоксические повреждения, является высокая скорость метаболизма: у животных она выше в 15–20 раз. Это отличие можно связывать с большим количеством тепла, выделяемого через поверхность тела мыши в результате недрожательного термогенеза, обусловленного особенностями активности разобщающих белков митохондрий. Возникающие при этом потребности кардиореспираторной системы в оксигенации сильно отличаются от потребностей этой системы у человека: например, частота сердечных сокращений у мыши очень высокая, составляет 500 ударов в минуту, в то время как частота дыхания составляет от 2 до 6 Гц (Naouzi, 2011). Из-за высокой активности антиоксидантных ферментов ткани крысы очень устойчивы к окислительному стрессу и ишемическим повреждениям – тем патогенетическим составляющим, которые во время сепсиса у человека ярко проявляются и имеют существенное значение для течения и исхода сепсиса. Дело в том, что при септическом шоке конечным медиатором вазодилатации и нарушения вазоконстрикторного ответа является оксид азота NO, а активность индуцибельной изоформы NO-синтазы (iNOS) у крыс хорошо выражена. Эта особенность объясняет повышение уровня нитритов и/или нитратов в крови септических крыс в 5–10 раз по сравнению с человеком и другими животными (свиньи, овцы и пр.) (Radermacher, Naouzi, 2013; Guillon et al., 2019). Существуют также литературные данные об успешном действии антиоксидантов или ингибиторов NO на крыс, однако аналогичных клинических данных не получено (Radermacher, Naouzi, 2013). Что касается использования для моделирования сепсиса более крупных животных с учетом большего сходства их некоторых функциональных параметров с человеком, следует отметить, что таких животных, которые бы максимально отвечали требованиям моделирования, нет. Не говоря уже о финансовых и этических аспектах, связанных с их использованием в опытах (Guillon et al., 2019).

Кроме того, у каждого из представителей крупных млекопитающих есть конкретные отличия от организма человека, которые могут быть весьма значимы для последующей экстраполяции результатов опыта на человека. Так, особенности анатомии и физиологии желудочно-кишечного тракта ограничивают использование жвачных животных (овец). При этом у овец, как и у людей, измерение уровня клиренса креатинина является маркером скорости клубочковой фильтрации, а у свиней данный показатель высок и не сопоставим с аналогичным у человека (Guillon et al., 2019). Свиньи, имеющие, как полагают, множество схожих с человеком структурно-функциональных свойств органов, отличаются повышенной склонностью к нарушениям легочных механизмов газообмена, что обусловлено недостатком коллатеральной альвеолярной вентиляции и более глубоко выраженной легочной гипертензией при патологии (Radermacher, Naouzi, 2013).

При сравнении концентрации циркулирующих цитокинов (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 и IL-1RA) у человека (добровольцы), крыс и свиней после введения липополисахарида (ЛПС) (Remick et al., 2000; Nielsen et al., 2007; Ramakers et al., 2011) отмечено увеличение уровней этих факторов в плазме и перитонеальной жидкости практически в одинаковых временных точках. Таким образом, несмотря на существующие различия реакции, отмечены признаки (и даже комплексы признаков), которые при сепсисе близки или идентичны у разных представителей млекопитающих (Zingarelli et al., 2019). В то же время следует учитывать существующую разницу в чувствительности каждого вида животного к ЛПС, которая, в первую очередь, зависит от активности Toll-подобных рецепторов TLR4 (toll-like receptor 4), распознающих бактериальный ЛПС. В этом отношении человек очень чувствителен к ЛПС, и характерную клиническую картину сепсиса у человека можно вызвать введением 1 нг ЛПС на 1 кг веса. Свиньи к действию ЛПС умеренно чувствительны, и диапазон эффективных доз ЛПС измеряется мкг/кг веса; мышцы еще более устойчивы – диапазон доз рассчитывается в мг/кг веса (Vaugh, Liu, 2014).

### МОДЕЛИ СЕПСИСА

Существуют несколько категорий моделей, используемых в экспериментах: инъекционные, хирургические, ожоговые, модель пневмонии с последующим переходом в сепсис (Корнеев, 2019; Poli-de-Figueiredo et al., 2008; Chen et al., 2014).

По характеру фактора, инициирующего развитие сепсиса, выделяют следующие инъекционные модели: 1) введение животным токсинов: внутривенно или внутривенно вводится ЛПС – эндотоксин грамотрицательных бактерий, липотейхоевая кислота (ЛТК) – эндотоксин грамполо-

жительных бактерий, зимозан – полисахарид, содержащийся в клеточной стенке некоторых видов дрожжей (Volman et al., 2005; Stortz et al., 2017); чаще всего при моделировании сочетают введение ЛПС с зимозаном; 2) введение живой культуры патогена (в частности *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* и т.д.).

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 CLP (cecum ligation and puncture), стентирование брыжейки восходящей ободочной кишки CASP (colon ascendens stent peritonitis).

Суть ожоговой модели заключается в подкожном введении инфицирующего агента (*P. aeruginosa*, *S. aureus*) в участке искусственно произведенного термического ожога (Stortz et al., 2017).

Модель пневмонии с последующим развитием сепсиса предполагает первоначальное моделирование бактериального воспалительного поражения легких (Müller-Redetzky et al., 2012; Lewis et al., 2016).

### Инъекционные модели сепсиса

#### Модель эндотоксинемии – введение липополисахарида

Широкое использование моделей с введением ЛПС обусловлено достаточно простыми манипуляциями и воспроизводимостью эксперимента. ЛПС – довольно стабильное и относительно чистое органическое соединение, которое может храниться в лиофилизированной форме (Корнеев, 2019; Poli-de-Figueiredo et al., 2008; Murando et al., 2019). Создание этой модели основывалось на концепции, согласно которой сепсис может быть вызван не только введением патогенных микроорганизмов, но и компонентов их стенки (для грамотрицательных бактерий это эндотоксин ЛПС, для грамположительных – ЛТК). Основным доводом правомерности указанной концепции явилось то, что в кровотоке пациентов реанимационных отделений, получающих высокие дозы антибактериальных препаратов, высвобождается большое количество эндотоксина из погибающих бактерий, что приводит к острому ухудшению гемодинамики и общего состояния пациентов (Poli-de-Figueiredo et al., 2008; Minasyan, 2019; Sondhi et al., 2019). ЛПС может быть введен подопытно животному внутривенно либо внутривенно в зависимости от дизайна исследования (Корнеев, 2019; Murando et al., 2019). Как компонент наружной части клеточной стенки всех грамотрицательных бактерий ЛПС состоит из трех доме-

нов: липида А, прикрепленного к бактериальной мембране, который заякоривает ЛПС и отвечает за его токсический эффект; основного (центрального) олигосахарида, служащего своеобразным молекулярным мостиком, связывающим липид А с О-антигеном; О-антигена, представляющего наиболее иммуногенную часть молекулы ЛПС, которая имеет уникальный состав в зависимости от штамма микроорганизма и легко распознается иммунной системой макроорганизма. По этой причине О-антиген является основой для серологической классификации грамотрицательных бактерий (Reyes et al., 2012; Park, Lee, 2013; Kingsley, Bhat, 2016; Minasyan, 2019). Известно, что система врожденного иммунитета обладает высоким потенциалом для распознавания множества микроорганизмов, а также структур их стенки, включая сахара, липиды и белки. Семейство Toll-подобных рецепторов играет важнейшую роль в обнаружении патогенов и их факторов вирулентности, в возникновении воспалительных реакций. В зависимости от типа патогенов существуют разные варианты TLRs. Например, ЛПС клеточной стенки грамотрицательных бактерий является лигандом для TLR4, а TLR2 избирательны по отношению к ЛТК, TLR9 тропны к бактериальной ДНК и ДНК герпесвирусов (Сепсис..., 2017; Park, Lee, 2013; Sondhi et al., 2019). При попадании в макроорганизм ЛПС распознается в сыворотке крови ЛПС-связывающим белком, который переносит его на мембранный корецептор CD14, экспрессирующийся на поверхности миеломоноцитарных клеток (моноцитов и макрофагов). Далее макрофаги расщепляют ЛПС на мономеры и представляют эти молекулы комплексу TLR4/MD2. Таким образом, ЛПС распознается благодаря рецепторному комплексу CD14/TLR4/MD2, который является мощным стимулятором клеток иммунной системы. В последующем инициируется сложный каскад сигналов, активирующий сигнальный путь NF-κB (Liang et al., 2009), приводя к высвобождению цитокинов: фактора некроза опухолей альфа (TNF-α), интерлейкинов IL-1, -1β, -6, -8, -10 и -12, интерферона гамма (IFNγ), хемокинов, простагландинов, а также активных форм кислорода (АФК). Эти соединения как провоспалительные медиаторы рекрутируют и активируют дополнительные иммунные клетки для активации воспаления (Сепсис..., 2017; Liang et al., 2009; Reyes et al., 2012; Park, Lee, 2013; Kingsley, Bhat, 2016; Minasyan, 2019; Sondhi et al., 2019). Показано, что ЛПС, поглощенный клетками Купфера, высвобождается в паренхиматозные клетки печени, где происходит ферментативная нейтрализация жирных кислот и О-антигена (Sondhi et al., 2019).

Описанным выше процессам, происходящим при введении ЛПС, соответствует довольно быстрое наступление системных клинических проявлений, включающих снижение двигательной ак-

тивности, появление вялости, дрожи, пилоэрекции, нарушение функций гемостаза – активация системы комплемента и факторов свертывания крови, лактоацидоз, заканчивающийся, в основном, развитием грозных осложнений – диссеминированным внутрисосудистым свертыванием крови, нарушением сократительной способности миокарда, системной артериальной гипотензией, острой полиорганной недостаточностью, приводящим к летальному исходу за достаточно короткий период времени (Minasyan, 2019; Murando et al., 2019). Однако у мышей в условиях моделирования сепсиса с помощью ЛПС наблюдались: быстро наступающая эндотоксемия (Buras et al., 2005; Nemzek et al., 2008; Murando et al., 2019), кратковременный монофазный подъем уровня циркулирующего TNF, продолжительное повышение уровня циркулирующего IL-6 и отсутствие увеличения уровня группы белков высокой подвижности HMGB-1 (high-mobility group box 1), что свидетельствует о неполном соответствии этой модели развитию сепсиса у человека (Liang et al., 2009). В целом цитокиновые профили у септических мышей оказались на несколько порядков выше, чем у людей. Показано, что в сыворотке мышей присутствуют некоторые факторы, нейтрализующие выработку цитокинов, но их природа на данный момент мало изучена. Группой ученых (Liang et al., 2009) с помощью метода хроматографии был идентифицирован гем-связывающий белок – гемопексин. Получены данные, что в сыворотке мыши при сепсисе повышается уровень гемопексина, который, взаимодействуя с макрофагами, подавляет продукцию последними TNF и IL-6, тормозя развитие системного воспалительного процесса, инициированного ЛПС (Liang et al., 2009). Существенным замечанием следует считать то, что концентрации ЛПС, способные вызвать сепсис у лабораторных мышей, широко варьируют в зависимости от происхождения эндотоксина и линии мышей (Stortz et al., 2017). Например, линии мышей C57Bl/6J, DBA2, BALB/c, C3H/ARC отличаются от линии C3H/HeJ, по меньшей мере, двумя генетическими локусами, имеющими существенное значение в реализации врожденного иммунного ответа. И, вероятно, в этой связи штамм C3H/HeJ нечувствителен к ЛПС, тогда как четыре других обозначенных выше линии мышей к этому агенту достаточно восприимчивы (Vaure, Liu, 2014). Не соответствие в степени чувствительности к ЛПС организма человека и мыши отмечено в ряде исследований, что ставит под сомнение целесообразность использования данного метода моделирования сепсиса (Copeland et al., 2005; Nemzek et al., 2008; Murando et al., 2019). Для увеличения чувствительности мышей к эндотоксину предпринимались попытки параллельно введению ЛПС вводить животным D-галактозамин. Одна-

ко гепатотоксичность D-галактозамина в значительной степени искажала развитие клинической картины сепсиса и создавала еще больше препятствий для сопоставления результатов модели с развитием сепсиса у человека (Buras et al., 2005; Nemzek et al., 2008; Kingsley, Bhat, 2016).

В заключение хотелось бы отметить, что ЛПС — только один из факторов вирулентности грамотрицательных бактерий, и сам по себе он не вызывает сепсис у человека. Кроме ЛПС, в арсенале грамотрицательных бактерий существует множество ферментов, экзотоксинов и пигментов, которые также оказывают негативное влияние на макроорганизм (Minasyan, 2019).

### Введение зимозана

Еще одной из предложенных инъекционных моделей сепсиса является внутрибрюшинная инъекция мышам частиц зимозана (Volman et al., 2005; Stortz et al., 2017). Данное вещество представляет собой компонент клеточной стенки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, которое получают путем кипячения и расщепления трипсином. В своем составе зимозан содержит несколько полисахаридов: бета-глюкан, маннан и хитин. Поскольку зимозан может фагоцитироваться макрофагами и стимулировать воспалительные реакции, его используют в изучении механизмов врожденного иммунного ответа, фагоцитоза и регуляции продукции цитокинов. Фагоцитоз частиц зимозана происходит при участии рецепторов: Dectin-1, TLR2, TLR6 и интегрин Mac-1 (Любимов и др., 2016; Volman et al., 2005; Municio et al., 2013; Jiang et al., 2013). Известно, что зимозан участвует в секреции АФК, TNF- $\alpha$ , а также IL-1 $\beta$ , -6, -8. Существуют три пути, с помощью которых зимозан активирует секрецию цитокинов. Во-первых, в сыворотке крови содержится иммуноглобулин IgG, который, связываясь с зимозаном, образует комплексы с последующей активацией классического пути системы комплемента; далее происходит высвобождение TNF- $\alpha$  путем перекрестного связывания с Fc-рецептором макрофагов. Во-вторых, зимозан активирует комплемент через альтернативный путь: связывание C3b/iC3b с зимозаном позволяет поглощать частички через рецепторы комплемента на макрофагах и гранулоцитах. В-третьих, связывание C3b с поверхностью зимозана приводит к увеличению конверсии C5 в C5a, вызывая высвобождение TNF- $\alpha$ . Все эти пути действуют синергически, вызывая высвобождение TNF- $\alpha$ , однако механизмы, с помощью которых другие цитокины индуцируются зимозаном, менее известны. Высвобождение IL-1 $\beta$  и IL-6 макрофагами частично зависит от воздействия TNF- $\alpha$ , а повышение секреции IL-8 активируется при фагоцитозе зимозана моноцитарными клетками (Любимов и др.,

2016; Volman et al., 2005). Было показано, что при введении зимозана грызунам в дозировке 0.8–1.0 мг/г наблюдается сильный воспалительный ответ с высвобождением широкого спектра медиаторов воспаления, который, главным образом, зависит от TLR2 и TLR6 (Jiang et al., 2013). Поскольку зимозан не подвергается разрушению, процесс его фагоцитоза макрофагами приводит к длительному воспалительному ответу (Volman et al., 2005). После фагоцитоза зимозана макрофаги высвобождают лизосомальные ферменты, АФК, простагландины и лейкотриены, арахидоновую кислоту и TNF- $\alpha$  (Volman et al., 2005). В то же время замечено, что способность зимозана стимулировать воспалительные реакции цитокинов слабее, чем у других растворимых стимуляторов TLR2. Одной из причин, по-видимому, является то, что зимозану необходим прямой контакт с клетками врожденного иммунитета для активации пути TLR2 (Jiang et al., 2013). Следует отметить, что, в отличие от ЛПС, реакция макроорганизма на зимозан является трехступенчатой. Ранний провоспалительный ответ, при котором у животных развивается острая картина перитонита (с характерной клинической картиной — диарея, вялое поведение и снижение массы тела), продолжается около 1–2 дней. В анализах присутствует лейкопения, увеличивается потребление кислорода, повышаются уровни миелопероксидазы в легких, увеличивается проницаемость эндотелия. Смертность на этом этапе обычно составляет от 10 до 35%. Оказалось, что небольшие дозы ЛПС предотвращают гиперреакцию организма грызунов на зимозан. На втором этапе, который длится 3–5 дней, состояние выживших животных восстанавливается, признаки перитонита отсутствуют. Однако на 7-й день животные становятся вялыми, дыхание — затрудненным, падает температура тела. Между 7-м и 14-м днями смертность составляет от 20 до 30%. При гистологическом анализе выявлены изменения, которые указывают на генерализованный системный воспалительный процесс с обширными повреждениями и отеком органов, массивными кровоизлияниями в легких. В печени отмечается накопление макрофагов и мононуклеарных клеток, образующих гранулемоподобные структуры. В селезенке регистрируются выраженные структурные изменения в красной и белой пульпе с увеличением количества мегакариоцитов и плазматических клеток, увеличение активности матриксных металлопротеиназ — класса ферментов, катализирующих деградацию тканей. Третий этап характеризуется высокой летальностью животных из-за прогрессирования полиорганной недостаточности.

Преимуществом данной модели является достаточно продолжительный период течения сепсиса до его исхода в полиорганную недостаточность, что позволяет подробно наблюдать дина-

мику 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 (Volman et al., 2005).

### Введение живой культуры патогена

*Введение живых бактерий.* Позднее был предложен еще один вариант моделирования сепсиса, основанный на внутрибрюшинной или внутривенной инъекции живой бактериальной культуры одного штамма (Lewis et al., 2016; Murando et al., 2019). Для моделирования применялись различные виды бактерий: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и многие другие (Lewis et al., 2016). Показано, что летальность животных в ходе эксперимента, в первую очередь, зависит от количества введенных бактерий, путей введения и сопутствующего применения антибиотиков (Lewis et al., 2016). Например, если бактерии вводили в высоких дозах, то они не колонизировались и не размножались в макроорганизме, так как практически мгновенно лизировались системой комплемента, при этом возникал не сепсис, а состояние эндотоксинемии (Murando et al., 2019), которое проявлялось характерным молниеносным течением, снижением гемодинамики, бурной экспрессией цитокинов и при отсутствии своевременной реанимации приводило к молниеносной летальности (Popov, Pavlov, 2013). При анализе инъекционных моделей с использованием живого возбудителя менее сложным и более атравматичным является внутрибрюшинный способ заражения (Lewis et al., 2016). Следует отметить важную деталь: при различных путях введения бактерий регистрируется разница в ответе цитокинов, которая характеризуется более выраженной экспрессией TNF- $\alpha$ , IL-6 и -1 при внутривенном введении, нежели при внутрибрюшинном (Chen et al., 2014). В литературе также имеют 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 (Lewis et al., 2016). Однако антибиотикотерапия не всегда имеет положительное вспомогательное значение, и даже напротив, антибиотики, разрушая компоненты клеточной стенки бактерий и грибов, способствуют выраженной воспалительной реакции, сопровождающемуся высоким уровнем TNF- $\alpha$  и ухудшением гемодинамики с исходом в коллапс (Poli-de-Figueiredo et al., 2008). Несмотря на скепти-

цизм некоторых исследователей по отношению к данной модели, ее можно контролировать, вводя оптимальное количество 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, например, в модели лигирования слепой кишки (Poli-de-Figueiredo et al., 2008). Следует заметить, что существует ряд видоспецифических особенностей взаимодействия макроорганизма и бактерий. Так, например, штамм *Salmonella typhi* не вызывает генерализованную инфекцию у лабораторных мышей, но ответствен за возникновение брюшного тифа у человека. У мышей есть родственный штамм *Salmonella typhimurium*, который инициирует системную инфекцию и обычно используется в моделировании брюшного тифа, несмотря на его низкую вирулентность для человека. Таким образом, один штамм может вызывать широкий спектр клинических проявлений, в том числе в зависимости от экспрессии генов вирулентности (Poli-de-Figueiredo et al., 2008).

*Введение штаммов Pseudomonas aeruginosa, охарактеризованных по наличию разных генов вирулентности.* В практику моделирования сепсиса входит также применение штаммов, выделенных из разных очагов инфекции у человека: ожоговых ран, крови септических больных, смывов бронхоальвеолярного лаважа и др. (Боровая и др., 2017; Черкасова и др., 2020; Poli-de-Figueiredo et al., 2008; Cherkasova et al., 2020). При моделировании сепсиса введением живых культур ключевое значение имеет то, какие штаммы бактерий – клинические или лабораторные – вводятся, поскольку вирулентность этих штаммов может существенно различаться. Например, липид А, входящий в состав эндотоксина ЛПС *P. aeruginosa*, отличается по структуре и активности у клинического и лабораторного штаммов (Hajjar et al., 2002). На течение сепсиса и уровень летальности при сепсисе в значительной мере влияют различия микроорганизмов по наборам генов вирулентности, по их экспрессии или репрессии у конкретного вида и штамма возбудителя (Mora-Rillo et al., 2015). Известно, что *P. aeruginosa* располагает богатым спектром факторов вирулентности, которые способствуют повреждению органов и генерализации инфекционного процесса (Лазарева и др., 2015). Введение *P. aeruginosa* в эукариотическую клетку токсинов, обусловлено системой секреции III типа (ССТТ). Считается, что при ССТТ введение белков-эффекторов U (exoU), S (exoS), T (exoT), Y (exoY) происходит при контакте с клетками макроорганизма путем формирования канала для транслокации этих бактериальных эффекторов в клетки. Данные белки-эффекторы оказывают разнообразное влияние на клетки: exoS индуци-

рует апоптоз, ингибирует миграцию клеток, разрушает плотные контакты и актиновый цитоскелет в эпителиальных (и, вероятно, в эндотелиальных) клетках; *exoT* подавляет деление и миграцию клеток, вызывая их гибель (кроме того, *exoS* и *exoT* ингибируют поглощение бактерий эпителиальными и фагоцитарными клетками, а также подавляют функции нейтрофилов и макрофагов); *exoU* обладает активностью фосфолипазы A2, приводя к быстрой смерти многие типы клеток; *exoY* представляет собой аденилатциклазу, которая способна разрушать актиновый цитоскелет. Совместное негативное влияние вышеназванных белков-эффекторов на механизмы врожденного иммунного ответа макроорганизма способствует генерализации инфекции с неблагоприятным исходом (Engel, Balachandran, 2009). Предложена модель сепсиса (Боровая и др., 2017; Черкасова и др., 2020; Cherkasova et al., 2020), основанная на внутрибрюшинном введении мышам линии C57Bl/6 суточной бульонной культуры штаммов *P. aeruginosa*. Первый штамм — *P. aeruginosa* 1840 — был выделен из раневого отделяемого ожогового больного, второй штамм — *P. aeruginosa* 1623 — из бронхиального смыва больного, находившегося на искусственной вентиляции легких. Данные штаммы были протестированы на наличие или отсутствие генов экзотоксинов ССТТ методом полимеразной цепной реакции. Было выявлено, что штамм *P. aeruginosa* 1840 содержит *exoU*, *exoT*, *exoY*, а штамм *P. aeruginosa* 1623 — *exoS*, *exoT*, *exoY*. Таким образом, эти два штамма различались по содержанию генов *exoU* и *exoS*. При анализе гистологической картины печени, почек и селезенки подопытных животных было отмечено, что штамм *P. aeruginosa* 1840, обладающий набором генов *exoU*, *exoT*, *exoY*, вызывал наиболее глубокие деструктивные изменения печени, а также гипоплазию белой пульпы селезенки; в то время как штамм *P. aeruginosa* 1623, имеющий гены *exoS*, *exoT*, *exoY*, приводил к выраженным структурным нарушениям почек и гиперплазии белой пульпы селезенки. Реактивные изменения легких в обеих группах были сходными и заключались в наличии неаэрированных участков (участков ателектазов) с признаками геморрагий, наряду с гипераэрированными участками, разрушением стенок легочных ацинусов и альвеол в участках гипераэрации, в кламатозе апикальных фрагментов эпителиоцитов мелких бронхов. В обеих опытных группах был зарегистрирован акантоз эритроцитов как признак их старения. Из полученных результатов следует, что существуют достоверные и выраженные различия морфогенетических реактивных изменений органов (печени, почек, селезенки) в моделях, инициированных введением генотипически различающихся штаммов *P. aeruginosa*.

### Хирургические модели

Первые хирургические модели сепсиса были разработаны еще в конце 1960-х—начале 1970-х гг. Бактериальная контаминация брюшной полости является наиболее частой причиной септического перитонита у людей, характеризующегося инфильтрацией брюшной полости нейтрофилами и перитонеальными макрофагами, представляющими первую линию защиты от бактерий. При отсутствии в организме функциональных механизмов, способных локализовать бактериальный очаг в перитонеальной полости (осумковать или уничтожить), инфекция попадает в кровоток и активизирует системный иммунный ответ (Hotchkiss, Karl, 2003).

### Модель имплантации зараженного патогенными микроорганизмами материала в брюшную полость

В середине прошлого столетия были предложены модели сепсиса, использующие внутрибрюшинное введение желатиновых гранул или фибриновых сгустков, содержащих в своем составе один штамм возбудителя или фекальный материал. Для предотвращения быстрого разрушения содержимого капсул, увеличения выживаемости и длительности развития реакции подопытных животных им вводился вспомогательный компонент — сульфат бария (Murando et al., 2019).

Изначально сепсис моделировали имплантацией в брюшную полость животных их собственных фекалий. Результаты опытов были неудачными по причине присутствия у животных высокой степени толерантности к их собственной кишечной микрофлоре.

Для решения возникшей проблемы были предложены другие подходы, в частности, инокуляция смешанного фекального содержимого, полученного от других животных. Таким способом был смоделирован полимикробный сепсис с выраженным гипердинамическим ответом организма и высокой летальностью (Popov, Pavlov, 2013). После введения фекальных гранул первоначально развивается острый сепсис, уровень смертности от которого составляет около 40% через три дня. При посевах крови отмечается преобладание аэробных бактерий (в основном *E. coli* и *Enterococcus* sp.). У выживших мышей через 5–7 дней начинается вторая фаза заболевания, проявляющаяся в развитии внутрибрюшных абсцессов, в которых преобладают анаэробы *B. fragilis* и *F. varium* (Murando et al., 2019). Процент летальности животных в этих опытах в основном зависит от состава введенных фекалий, который напрямую связан с особенностями кормления мышей (Murando et al., 2019). Следует отметить, что моделирование введением фекальных гранул является, по сути, не моделью абдоминального сепсиса, а

моделью абдоминального абсцесса как последствия перитонита. Недостатком данной модели является невозможность точной оценки количества вводимых микроорганизмов, которое, естественно, определяет и степень тяжести, и длительность течения сепсиса. Именно этот недостаток является причиной невоспроизводимости модели. Соответственно, потребовались новые разработки моделей, которые отвечали бы, в первую очередь, условиям стандартизации (Murando et al., 2019).

Животным стали вводить внутрибрюшинно бактерии, заключенные в фибриновые сгустки. В проведенных опытах обнаружена разница в летальности крыс, которым внутрибрюшинно введена суспензия *E. coli* в физиологическом растворе, и крыс, которым имплантировали фибриновый сгусток, содержащий такое же количество бактерий *E. coli*. В первой группе летальность в течение 24 ч составляет 100%, во второй — достигает 90% только к десятому дню. Недостатком модели по имплантации фибринового сгустка является сложность хирургического вмешательства, проводимого под общим наркозом. Кроме того, фибрин препятствует высвобождению бактерий из сгустка, что впоследствии приводит к частому развитию хронического внутрибрюшинного абсцесса (Popov, Pavlov, 2013).

#### **Модель перевязки слепой кишки с нанесением микроперфораций на ее стенке — CLP-модель**

В ранних опытах на собаках и свиньях хирургические модели состояли в нарушении кровоснабжения сегмента кишечника. Техника заключалась в перевязке слепой кишки ниже илеоцекального клапана для избежания обтурации кишечника. Перевязанная слепая кишка подвергалась трансмуральному некрозу с развитием септического процесса. Такая модель плохо воспроизводилась по причине значительного варьирования численности и штаммов бактерий в кишечнике разных животных и различий в интенсивности реакции организма в разные периоды времени (Popov, Pavlov, 2013; Murando et al., 2019).

В 1979 г. группой ученых (Wichterman et al., 1980) продемонстрировано, что перевязка слепой кишки мыши приводит не к сепсису, а лишь к появлению абсцессов брюшной полости. Для улучшения модели эти авторы дополнили лигирование слепой кишки микроперфорированием ее стенки, что позволило получить постоянное бактериальное обсеменение брюшной полости. Данные эксперименты завершились развитием у животных сепсиса, в основе которого было сочетанное влияние на организм как полимикробной бактериемии, так и некротических масс ишемизированной и поврежденной стенки слепой кишки

(Murando et al., 2019). Хирургическая процедура модели заключается в следующем: слепая кишка выводится наружу через небольшой разрез стенки брюшной полости, производят ее лигирование дистальной илеоцекального клапана и прокалывают стенку. В контрольной группе слепая кишка также выводится, затем возвращается в брюшную полость без лигирования и прокола (Popov, Pavlov, 2013). В одном из исследований (Delano et al., 2007) у некоторых мышей в условиях аналогичного опыта отсутствовало развитие септического шока, а наблюдался переход от острого воспалительного ответа к хроническому воспалительному состоянию. Также была выявлена тенденция образования внутриабдоминальных абсцессов (Maier et al., 2004; Stortz et al., 2017), сопровождающихся повышением уровней провоспалительных цитокинов и изменением миелопоэза (Delano et al., 2007; Stortz et al., 2017). Преимущество использования рассматриваемого варианта модели заключается в том, что оператор может контролировать количество содержимого слепой кишки, выделившегося в брюшную полость, и величину ишемического повреждения кишки, изменяя диаметр иглы и/или длину перевязанного участка кишки. Следует заметить, что эта модель, наряду с положительными качествами, имеет также недостатки, хотя получила название “Золотой стандарт моделирования сепсиса”. В частности, результаты моделирования в значительной степени зависят от качества исполнения операции, консистенции каловых масс в просвете слепой кишки (Stortz et al., 2017; Murando et al., 2019), анатомических особенностей слепой кишки и разницы в количестве и составе микробиоты толстой кишки у разных животных. В этой связи рассматриваемую модель очень сложно стандартизировать. Кроме того, довольно частой проблемой в этой области моделирования является инициация молниеносного сепсиса либо развитие внутрибрюшинного абсцесса (Mutlak et al., 2013). Данный вариант модели невозможно воспроизвести на новорожденных мышях из-за малого размера их слепой кишки и неполного развития кишечника в целом (Wynn et al., 2007).

#### **Модель стентирования брыжейки восходящей ободочной кишки — CASP-модель**

В 1998 г. группой исследователей (Zantl et al., 1998) разработана модель хирургического сепсиса — стентирование брыжейки восходящей ободочной кишки — CASP-модель, основанная на установке стента в восходящую ободочную кишку. Идея заключалась в допущении на практике расхождения анастомоза после резекции кишки с последующим развитием перитонита и септического шока. В ходе опытов было зарегистрировано, что смертность животных от септического шока за-

висит от диаметра стента: с его увеличением смертность возрастает. Положительной чертой модели являлось то, что в ней достигаются состояние дисфункции органов (почек, легких, мозга) и активация продукции IL-1 или IFN $\gamma$ , характерных для сепсиса у человека. Модель CASP (Stortz et al., 2017), выполненная на мышах, включает имплантацию стента заданного диаметра в ободочную кишку, обеспечивающего постоянную утечку кишечного содержимого в брюшную полость с иницированием перитонита и полимикробного сепсиса. Модель стентирования характеризуется тем, что вызывает перитонит диффузного характера, в отличие от очагового перитонита при CLP-модели (Buras et al., 2005; Stortz et al., 2017). В модели стентирования регистрируется экспоненциальное увеличение количества бактерий, высеваемых из брюшной полости, тогда как в CLP-модели отмечен кратковременный и небольшой начальный пик, затем следует период снижения количества бактерий, и далее – молниеносное увеличение их числа в брюшной полости. Если в CLP-модели невозможно контролировать количество бактерий, то в модели стентирования это более реально благодаря выбору стента определенного диаметра (Zantl et al., 1998; Buras et al., 2005; Murando et al., 2019). Кроме того, в модели стентирования бактериемия зарегистрирована через 12 ч, и через 2 ч после установки стента в сыворотке крови уже отмечаются повышенные уровни циркулирующего ЛПС, цитокинов TNF- $\alpha$ , IL-1, -6, -10, MCP-1 и др., возрастающие пропорционально повышению КОЕ бактерий (Maier et al., 2004; Stortz et al., 2017). Подобно CLP-модели, когда летальность опытных животных напрямую зависит от размера иглы, с помощью которой производится перфорация, в модели стентирования смертность животных и тяжесть заболевания зависят от диаметра стента (Popov, Pavlov, 2013; Stortz et al., 2017). Позднее анализ результатов модели (Zantl et al., 1998) позволил дополнить этот вариант моделирования повторными хирургическими вмешательствами для удаления стента в определенное время (через три, пять и девять часов). Удаление стента через три часа привело к 100% выживаемости животных, а через девять часов – сопровождалось 100%-ной летальностью. Операция, выполненная через пять часов, характеризовалась средней численностью смертей животных (Stortz et al., 2017). С одной стороны, модель стентирования ободочной кишки воспроизводит клинические признаки острого перитонита, не нарушая васкуляризации кишечника с последующим некрозом и образованием абсцесса, как это происходит в CLP-модели. Однако, с другой стороны, она больше напоминает модель эндотоксинемии и характеризуется сложностью установки стентов. Кроме того, в просвет стента непрерывно диффузно и

неконтролируемо высвобождается большое количество бактериальной микрофлоры ободочной кишки (Popov, Pavlov, 2013; Stortz et al., 2017).

В 2013 г. предложена модель лигирования части слепой кишки с последующим отсечением сформированной культуры. Культура оставалась в брюшной полости и по мере прогрессирования некротических изменений служила источником инфицирования брюшной полости. Положительно в этой модели то, что некротическая культура кишки не инкапсулируется (Mutlak et al., 2013). Однако модель сложно стандартизировать, так как 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, гематологических, иммунологических и биохимических показателей в разных опытах этого варианта моделирования может существенно отличаться (Popov, Pavlov, 2013; Murando et al., 2019).

Часто для улучшения выживаемости животных в моделях сепсиса (особенно в хирургических моделях) применяются антибиотики. В разных исследованиях применяют разные виды и комбинации этих препаратов, что объясняет имеющиеся разногласия в интерпретации результатов проведенных опытов и ставит дополнительные препятствия для стандартизации модели (Popov, Pavlov, 2013; Lewis et al., 2016; Kennedy et al., 2018; Murando et al., 2019).

Следует отметить, что при хирургическом моделировании сепсиса 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 времени на восстановление организма после наркоза. Иными словами, любой анестетик оказывает дополнительное негативное влияние на организм, и с разными способами анестезии могут быть связаны противоречивые результаты исследований (Lindenblatt et al., 2005; Uhlig et al., 2015; Lewis et al., 2016).

#### *Ожоговая модель*

Ожоговая модель – нанесение термического ожога на участок кожи животного с последующим подкожным введением инфицирующего агента (*P. aeruginosa*, *S. aureus*). Важная особенность ожоговых ран кожи (в отсутствие своевременного и адекватного лечения) – легко возникающее инфицирование и развитие генерализованного воспалительного процесса (Dai et al., 2011; Abdullahi et al., 2014). Это их свойство использовано при создании ожоговой модели сепсиса. В ос-

новном при моделировании применяют горячую воду или нагретый металл, вызывающие прямой контактный ожог. Выбор времени контакта с водой или с металлом и температуры последних зависит от того, какую глубину ожога требуется получить (Dahiya, 2009; Qu, Nourbakhsh, 2017; Ogunniyi et al., 2018). В настоящее время предложен широкий спектр способов нанесения ожоговой травмы в опытах на грызунах и более крупных животных. Процедура нанесения термического ожога заключается в следующем: животному (например, мышам) дают общий наркоз, сбрасывают шерсть на участке кожи и затем к этому участку прикладывают разогретую металлическую пластину определенной площади на 6–45 с (время экспозиции определяется экспериментатором). Известная площадь поверхности пластины обеспечивает контроль площади повреждения тканей, а температура и экспозиция определяют глубину и степень ожога (Qu, Nourbakhsh, 2017). Возможен и другой вариант нанесения ожога: выбритый участок кожи с помощью специального устройства оставляют на теле животного открытым (при экранировании остальной части тела) и подвергают его воздействию горячей воды с температурой 90°C в течение 10 с. После нанесения ожога мышам вводят раствор Рингера для восстановления водно-электролитного баланса (Haynes et al., 2005; Hamerly et al., 2017). Дальнейший этап моделирования заключается в инфицировании животного, получившего ожог. Для этого в область ожога глубоко подкожно вводится патоген (чаще *P. aeruginosa* либо *S. aureus*) в дозе  $10^2$ – $10^3$  КОЕ/особь (Haynes et al., 2005; Hamerly et al., 2017). Показано, что *P. aeruginosa* взаимодействует с тканями на основе адгезии к анионным боковым цепям гепарансульфата. Указанные патогенные микроорганизмы — одна из основных причин осложнений у пациентов ожоговых отделений (Haynes et al., 2005). По достижении пороговой концентрации бактерий в очаге (приблизительно равной  $10^9$  КОЕ/г ткани) *P. aeruginosa* распространяется системно, вызывая сепсис с последующей полиорганной недостаточностью, и, в конечном итоге, приводит к смертельному исходу. Гибель животных в ожоговых моделях наступала примерно через 24–48 ч после нанесения ожога и заражения (Hamerly et al., 2017). Массивная инфильтрация нейтрофилами, характерная для термического повреждения, имеет отрицательный биологический эффект: активированные нейтрофилы высвобождают гидролитические ферменты, которые в сочетании с бактериальными протеолитическими ферментами усиливают протеолиз тканей, усугубляя деструктивные изменения в очаге ожога. Как известно, в балансе защитных и деструктивных механизмов воспаления важную роль играют медиаторы воспаления. Одна из важных групп медиаторов воспаления —

протеогликаны группы гепарансульфатов, представляющие собой молекулы, экспрессируемые практически всеми клетками организма. В числе важнейших представителей семейства гепарансульфатов можно назвать синдеканы. Синдеканы участвуют в заживлении ран, ангиогенезе, проницаемости сосудов, модуляции активности хемокинов. При повреждении тканей активируется выделение синдекана-1 и повышение его уровня в крови. При ожоговом сепсисе LasA-протеаза, продуцируемая *P. aeruginosa*, вызывает активацию образования синдекана-1. При инфицировании участка термической травмы *P. aeruginosa* происходит колонизация ожоговой раны *P. aeruginosa* и дедартериализация области ожога, что обеспечивает идеально подходящую среду для роста *P. aeruginosa*.

В другом варианте модели ожогового сепсиса, исследователи вместо *P. aeruginosa* в ожоговую рану вводили культуру *S. aureus*. Было зарегистрировано увеличение экспрессии синдекана-1 на эндотелиальных клетках посредством действия альфа- и бета-токсинов (Park et al., 2003; Haynes et al., 2005).

У линейных мышей, у которых отсутствует ген синдекана-1, зарегистрирована сниженная экспрессия генов провоспалительных цитокинов, сниженные темпы развития сепсиса и более низкая смертность в ожоговой модели с применением *P. aeruginosa*. В литературных источниках также отмечено, что при ожоговом сепсисе, вызванном *P. aeruginosa*, в окружении кровеносных сосудов через 8 ч после инфицирования области ожога формируются биопленки этих бактерий, что может играть важную роль в генерализации инфекции (Schaber et al., 2007).

В целом, при создании ожоговых моделей сепсиса в разных исследованиях часто существенно варьируют фактор температуры, продолжительность и площадь воздействия термического раздражителя на кожу. Отмечено, что крысы могут переносить площадь ожоговой раны до 60% от их общей поверхности тела — для нанесения им глубокого ожога кожи требуется 12 с при температуре воды 70°C, а для формирования ожога более тяжелой формы необходима температура до 100°C и 8 с экспозиции. Мыши могут переносить ожоги, в том числе глубокие, до 30% от всей поверхности тела при температуре от 54° до 100°C и времени воздействия от 6 до 45 с (Pereira, HERNON, 2005; Abdullahi et al., 2014; Qu, Nourbakhsh, 2017). Если рассматривать ожоговые раны мыши и человека с позиций патологической анатомии, то заметна существенная разница в их строении (Abdullahi et al., 2014; Qu, Nourbakhsh, 2017). У грызунов эпидермис и дерма более тонкие (Wong et al., 2011; Abdullahi et al., 2014; Qu, Nourbakhsh, 2017), волосяные фолликулы у мышей и крыс богаты стволовыми клетками, с чем связана

быстрая кератинизация и заживление ран без рубцевания (Abdullahi et al., 2014; Qu, Nourbakhsh, 2017). Травмированная кожа грызунов заживает в большей степени за счет сокращения раны, а у человека заживление происходит посредством ре-эпителизации и грануляции (Abdullahi et al., 2014; Qu, Nourbakhsh, 2017). Кожа мыши уникальна тем, что четко выражен панникулусный карнозус – тонкий скелетный мышечный слой (Dahiya, 2009; Wong et al., 2011; Abdullahi et al., 2014), отсутствующий у человека.

Серьезный аргумент, ограничивающий использование данной модели, – применение общей анестезии. Известно, что основные риски общего наркоза у мелких лабораторных животных – гипотензия, гипоксемия, гиповентиляция и гипотермия. Пол и возраст животного могут сильно влиять на дозировку анестетика из-за различий в уровне метаболизма и мышечной массы тела (Zambricki, Dalecy, 2004; Uhlig et al., 2015). У мышей физиологические функции, иммунный ответ и гемостаз в большой мере зависимы от температуры тела (Lindenblatt et al., 2005; Uhlig et al., 2015).

Таким образом, ожоговая модель имеет довольно много ограничений, которые ставят под сомнение использование ее в качестве основной для воспроизводства сепсиса в эксперименте.

#### *Модель пневмонии с последующим развитием сепсиса*

Одна из частых и распространенных причин развития сепсиса у человека – пневмония. По данным статистики наиболее часто встречается внебольничная пневмония. Внутрибольничная пневмония приобретает в основном в отделениях интенсивной терапии и у пациентов с тяжелым сепсисом затрагивает до 70% легких. Широкий спектр патогенов с высокой резистентностью к антибиотикам рассматривается как причина этого вида патологии. Наиболее частыми бактериальными агентами во внебольничной пневмонии являются *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella* spp., *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. и др. Основной причиной внутрибольничных пневмоний в основном признаны *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *Acinetobacter* spp., *Serratia*, *Proteus* spp., *E. coli* или *Klebsiella* spp. и др., а также грибы *Candida* spp., *Aspergillus niger* и вирусы. При развитии пневмонии возбудители прикрепляются к эпителиальным клеткам нижних отделов дыхательных путей и транслоцируются через эпителий, приводя к бактериемии и генерализации инфекции (Müller-Redetzky et al., 2012; Lewis et al., 2016). Для правильного понимания патогенетических звеньев перехода пневмонии в сепсис были предложены модели, использующие разные пути

введения бактерий: интраназальный, интратрахеальный и аэрозольный. При интратрахеальном введении возбудителя применяется общая анестезия, которая, как уже было сказано, имеет ряд побочных эффектов, искажающих результаты опыта (Müller-Redetzky et al., 2012; Lewis et al., 2016). Вид выбранного животного также влияет на способ введения бактерий. Например, мыши и крысы не имеют кашлевых рефлексов, что делает назальный путь особенно актуальным вариантом заражения этих видов. Напротив, у морских свинок отмечен выраженный кашлевой рефлекс, и это объясняет необходимость использования внутритрахеального или аэрозольного способов (Hraiech et al., 2015). 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 (Hraiech et al., 2015). Наиболее простым вариантом инфицирования дыхательных путей является интраназальный путь. Мышей на короткий промежуток времени вводят в наркоз и, фиксируя в вертикальном положении, вводят им в ноздри бактериальную культуру в объеме 5–50 мкл. Если вводить объем менее 5 мкл, то культура оседает на уровне верхних дыхательных путей, не поступая в нижние отделы. Введение более 50 мкл культуры может привести к гибели животного из-за удушья. Основным ограничением данного пути инокуляции бактерий является неточность дозировки микроорганизмов, попадающих в легкие, поскольку часть культуры бактерий может попасть в пищевод и нижележащие отделы желудочно-кишечного тракта (Hraiech et al., 2015). Для предотвращения этого и введения точного количества микроорганизмов был предложен интратрахеальный способ. Его техника состоит в интубации трахеи или выполнении трахеотомии. Ограничением модели является хирургическое вмешательство под общим наркозом, возможные послеоперационные осложнения, а также то, что интубационный способ не обеспечивает получения равномерного развития воспаления в зонах и сегментах легких (Mizgerd, Skerrett, 2008; Hraiech et al., 2015). Для аэрозольного заражения необходимо дорогостоящее оборудование – специальные камеры с распылителями. Хотя вдыхание аэрозолей с микроорганизмами приводит к более равномерному распределению бактерий в легких, частицы аэрозолей оседают в верхних дыхательных путях, на коже, на поверхности глаз, попадают при распылении и в желудочно-кишечный тракт. Также есть культуры микроорганизмов, которые наиболее чувствительны к высыханию, к примеру, *S. pneumoniae*. Приборы для аэрозольной модели

требуют постоянной калибровки, регулярного обслуживания и тестирования. Кроме того, данный вариант моделирования представляет биологическую опасность для персонала. Упомянутые выше способы заражения приводят в основном к острой форме пневмонии. Если же культуры муконидных штаммов *P. aeruginosa* вводить в альгинатных шариках, то это влечет за собой формирование биопленок и хроническое течение инфекции (Hraiech et al., 2015). В исследованиях применяют также модели с так называемыми двумя ударами, которые имитируют клиническое течение сепсиса у человека как осложнение после абдоминального сепсиса или травмы. Для этого на мышах моделируют лигирование и прокол стенки слепой кишки, далее – через 72 ч – одной группе животных вводят интраназально бактериальную суспензию *Pseudomonas aeruginosa*, а животным другой группы – суспензию *Streptococcus pneumoniae*. В срезах легких контрольных мышей, которым была произведена операция лигирования и прокола слепой кишки, регистрировали инфильтрацию интестина мононуклеарами и полиморфноядерными лейкоцитами, при этом альвеолярные перегородки не были уплотнены и не было кровоизлияний. В легких обеих групп подопытных животных были выявлены обширные очаги мононуклеарной и полиморфноядерной лейкоцитарной инфильтрации, утолщение альвеолярных перегородок и кровоизлияния. При этом в модели с использованием *Pseudomonas aeruginosa* отмечено диффузное поражение легких, смертность регистрировалась начиная с 24 ч после введения бактерий и достигала максимума через 3 дня. В модели с применением *Streptococcus pneumoniae* поражение легких было более локальным, а смертность животных – более отсроченной. Таким образом, в приведенных исследованиях были продемонстрированы различия в течении и морфологических особенностях сепсиса в зависимости от вида инфекционного агента (Muenzer et al., 2006; Lewis et al., 2016).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Моделирование сепсиса на животных, безусловно, вносит значительный вклад в изучение патогенетических звеньев и закономерностей сепсиса. Благодаря моделированию найдены новые биомаркеры сепсиса, улучшены схемы терапии, получена дополнительная информация о фармакокинетике, токсичности и механизме действия разных препаратов. Несмотря на то, что существует множество ограничений, относящихся к каждому из рассмотренных вариантов моделей, целесообразно использовать разные формы моделирования на разных видах животных, ибо при сопоставлении результатов этих опытов могут

быть найдены общие (следовательно, объективные) критерии патогенеза сепсиса.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Боровая Т.Г., Жуховицкий В.Г., Андреевская С.Г., Черкасова М.Н. Гистологические изменения печени и почек при экспериментальном сепсисе в аспекте специфики строения их микроциркуляторного русла // Патогенез. 2017. Т. 15. № 4. С. 32–37.
- Корнеев К.В. Мышиные модели сепсиса и септического шока // Мол. биол. 2019. Т. 53. № 5. С. 799–814.
- Лазарева А.В., Чеботарь И.В., Крыжановская О.А. и др. *Pseudomonas aeruginosa*: патогенность, патогенез и патология // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2015. Т. 17 (3). С. 170–186.
- Любимов Г.Ю., Любимов А.Г., Козлов В.А. Влияние обработанных зимозаном нейтрофилов на рост меланомы В16 в печени и селезенке мышей // Рос. иммунол. журнал. 2016. Т. 10 (19). № 1. С. 81–87.
- Сепсис: классификация, клинико-диагностическая концепция и лечение / Ред. Б.Р. Гельфанд. М.: МИА, 2017. 408 с.
- Хаертынов Х.С., Анохин В.А., Бойчук С.В. Патофизиология неонатального сепсиса // Вестн. соврем. клин. мед. 2014. Т. 7. № 6. С. 97–104.
- Черкасова М.Н., Жуховицкий В.Г., Боровая Т.Г. Сравнительная характеристика белой пульпы селезенки в экспериментальных моделях сепсиса, вызванного разными штаммами *Pseudomonas aeruginosa* // Бюл. эксперим. биол. мед. 2020. Т. 170. № 7. С. 57–60.
- Черных Е.Р., Леплина О.Ю., Тихонова М.А. Цитокиновый баланс в патогенезе системного воспалительного ответа: новая мишень иммуноотералептических воздействий при лечении сепсиса // Мед. иммунол. 2001. Т. 3. № 3. С. 415–429.
- Abdullahi A., Amini-Nik S., Jeschke M.G. Animal models in burn research // Cell. Mol. Life Sci. 2014. V. 71 (17). P. 3241–3255.
- Belikoff B., Buras J.A. A practical approach to animal models of sepsis // Sourcebook of models for biomedical research / Ed. P.M. Conn. Totowa: Humana Press, 2008. P. 473–482.
- Buras J.A., Holzmann B., Sitkovsky M. Animal models of sepsis: setting the stage // Nat. Rev. Drug Discov. 2005. V. 4. P. 854–865.
- Chen P., Stanojic M., Jeschke M.G. Differences between murine and human sepsis // Surg. Clin. North Am. 2014. V. 94 (6). P. 1135–1149.
- Cherkasova M., Zhukhovitsky V., Borovaya T. The growth dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from peritoneal fluid, blood and homogenates of the organs

- of septic mice // Abstract book 30<sup>th</sup> European congress of clinical microbiology and infectious diseases. 2020. Abstract 7897. P. 3776.
- Copeland S., Warren H.S., Lowry S.F. et al. Acute inflammatory response to endotoxin in mice and humans // Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2005. V. 12. P. 60–67.
- Dahiya P. Burns as a model of SIRS // Front. Biosci. 2009. V. 14 (1). P. 4962.
- Dai T., Kharkwal G.B., Tanaka M. et al. Animal models of external traumatic wound infections // Virulence. 2011. V. 2 (4). P. 296–315.
- Delano M.J., Scumpia P.O., Weinstein J.S. et al. MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis // J. Exp. Med. 2007. V. 204 (6). P. 1463–1474.
- Engel J., Balachandran P. Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease // Curr. Opin. Microbiol. 2009. V. 12 (1). P. 61–66.
- Guillon A., Preau S., Aboab J. et al. Preclinical septic shock research: why we need an animal ICU // Ann. Intens. Care. 2019. V. 9 (1). P. 66.
- Hajjar A.M., Ernst R.K., Tsai J.H. et al. Human Toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications // Nat. Immunol. 2002. V. 3 (4). P. 354–359.
- Hamerly T., Everett J.A., Paris N. et al. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* biomarkers from thermally injured mice *in situ* using imaging mass spectrometry // Anal. Biochem. 2017. V. 539. P. 144–148.
- Haouzi P. Murine models in critical care research // Crit. Care Med. 2011. V. 39 (10). P. 2290–2293.
- Haouzi P., van de Louw A. Uncoupling mitochondrial activity maintains body VO<sub>2</sub> during hemorrhage-induced O<sub>2</sub> deficit in the anesthetized rat // Respir. Physiol. Neurobiol. 2013. V. 186. P. 87–94.
- Haynes A. 3rd, Ruda F., Oliver J. et al. Syndecan 1 shedding contributes to *Pseudomonas aeruginosa* sepsis // Infect. Immun. 2005. V. 73 (12). P. 7914–7921.
- Hellman J., Bahrami S., Boros M. et al. Part III: Minimum quality threshold in pre-clinical sepsis studies (MQTiPSS) for fluid resuscitation and antimicrobial therapy endpoints // Shock. 2019. V. 51 (1). P. 28–38.
- Hotchkiss R.S., Karl I.E. The pathophysiology and treatment of sepsis // New Eng. J. Med. 2003. V. 348. P. 138–150.
- Hraiech S., Papazian L., Rolain J., Bregeon F. Animal models of polymicrobial pneumonia // Drug Des. Devel. Ther. 2015. V. 9. P. 3279–3292.
- Jiang L.I., Sternweis P.C., Wang J.E. Zymosan activates protein kinase A via adenylyl cyclase VII to modulate innate immune responses during inflammation // Mol. Immunol. 2013. V. 54 (1). P. 14–22.
- Kennedy E.A., King K.Y., Baldrige M.T. Mouse microbiota models: comparing germ-free mice and antibiotics treatment as tools for modifying gut bacteria // Front. Physiol. 2018. V. 9. P. 1534.
- Kingsley S.M., Bhat B.V. Differential paradigms in animal models of sepsis // Curr. Infect. Dis. Rep. 2016. V. 18 (9). P. 26.
- Lewis A.J., Seymour C.W., Rosengart M.R. Current murine models of sepsis // Surg. Infect. 2016. V. 17 (4). P. 385–393.
- Liang X., Lin T., Sun G. et al. Hemopexin down-regulates LPS-induced proinflammatory cytokines from macrophages // J. Leukoc. Biol. 2009. V. 86 (2). P. 229–235.
- Libert C., Ayala A., Bauer M. et al. Part II: Minimum quality threshold in pre-clinical sepsis studies (MQTiPSS) for types of infections and organ dysfunction endpoints // Shock. 2019. V. 51 (1). P. 23–32.
- Lindenblatt N., Menger M.D., Klar E. et al. Sustained hypothermia accelerates microvascular thrombus formation in mice // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2005. V. 289 (6). P. H2680–H2687.
- Maier S., Traeger T., Entleutner M. et al. Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis // Shock. 2004. V. 21 (6). P. 505–511.
- Minasyan H. Sepsis: mechanisms of bacterial injury to the patient // Scand. J. Trauma Resusc. Emerg. Med. 2019. V. 27. P. 19.
- Mizgerd J.P., Skerrett S.J. Animal models of human pneumonia // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 2008. V. 294 (3). P. L387–L398.
- Municio C., Alvarez Y., Montero O. et al. The response of human macrophages to  $\beta$ -glucans depends on the inflammatory milieu // PLoS One. 2013. V. 8 (4). P. e62016.
- Murando F., Peloso A., Cobiainchi L. Experimental abdominal sepsis: sticking to an awkward but still useful translational model // Mediators Inflamm. 2019. V. 2019. P. 8.
- Mora-Rillo M., Fernández-Romero N., Navarro-San Francisco C. et al. Impact of virulence genes on sepsis severity and survival in *Escherichia coli* bacteremia // Virulence. 2015. V. 6 (1). P. 93–100.
- Maier S., Traeger T., Entleutner M. et al. Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis // Shock. 2004. V. 21 (6). P. 505–511.
- Muenzer J.T., Davis C.G., Dunne B.S. et al. Pneumonia after cecal ligation and puncture // Shock. 2006. V. 26. P. 565–570.
- Mutlak H., Jennewein C., Tran N. et al. Cecum ligation and dissection: a novel modified mouse sepsis model // J. Surg. Res. 2013. V. 183 (1). P. 321–329.
- Müller-Redetzky H., Suttorp N., Witzernath M. Experimental models of pneumonia-induced sepsis // Drug Discov. Today Dis. Models. 2012. V. 9 (1). P. e23–e32.
- Nemzek J.A., Hugunin K.M., Opp M.R. Modeling sepsis in the laboratory: merging sound science with animal well-being // Comp. Med. 2008. V. 58 (2). P. 120–128.
- Nielsen J.S., Larsson A., Rix T. et al. The effect of activated protein C on plasma cytokine levels in a porcine model of acute endotoxemia // Intens. Care Med. 2007. V. 33 (6). P. 1085–1093.
- Osuchowski M.F., Ayala A., Bahrami S. et al. Minimum quality threshold in pre-clinical sepsis studies (MQTiPSS): an international expert consensus initiative for improvement of animal modeling in sepsis // Shock. 2018. V. 50 (4). P. 377–380.
- Ogunniyi A.D., Kopecki Z., Hickey E.E. et al. Bioluminescent murine models of bacterial sepsis and scald wound infections for antimicrobial efficacy testing // PLoS One. 2018. V. 13 (7). P. e0200195.
- Park B.S., Lee J.O. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes // Exp. Mol. Med. 2013. V. 45 (12). P. e66.

- Park P.W., Foster T.J., Nishi E. et al. Activation of syndecan-1 ectodomain shedding by *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -toxin and  $\beta$ -toxin // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 279 (1). P. 251–258.
- Pereira C.T., Herndon D.N. The pharmacologic modulation of the hypermetabolic response to burns // *Adv. Surg.* 2005. V. 39. P. 245–261.
- Poli-de-Figueiredo L.F., Garrido A.G., Nakagawa N. et al. Experimental models of sepsis and their clinical relevance // *Shock*. 2008. V. 11 (1). P. 53–59.
- Popov D., Pavlov G. Sepsis models in experimental animals // *Trakia J. Sci.* 2013. V. 1. P. 13–23.
- Qu M., Nourbakhsh M. Current experimental models of burns // *Discov. Med.* 2017. V. 23. P. 95–103.
- Radermacher P., Haouzi P. A mouse is not a rat is not a man: species-specific metabolic responses to sepsis – a nail in the coffin of murine models for critical care research? // *Intens. Care Med. Exp.* 2013. V. 1 (1). P. 26.
- Ramakers B.P., Riksen N.P., van den Broek P. et al. Circulating adenosine increases during human experimental endotoxemia but blockade of its receptor does not influence the immune response and subsequent organ injury // *Crit. Care*. 2011. V. 15 (1). P. R3.
- Remick D.G., Newcomb D.E., Bolgos G.L. et al. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs cecal ligation and puncture // *Shock*. 2000. V. 13 (2). P. 110–116.
- Reyes R.E., González C.R., Jiménez R.C. et al. Mechanisms of O-antigen structural variation of bacterial lipopolysaccharide (LPS) // *The complex world of polysaccharides* / Ed. D.N. Karunaratne. Rijeka: IntechOpen, 2012. P. 71–98.
- Schaber J.A., Triffo W.J., Suh S.J. et al. *Pseudomonas aeruginosa* forms biofilms in acute infection independent of cell-to-cell signaling // *Infect. Immun.* 2007. V. 75 (8). P. 3715–3721.
- Sondhi P., Maruf M.U., Stine K.J. Nanomaterials for biosensing lipopolysaccharide // *Biosensors*. 2019. V. 10 (1). P. 2.
- Stortz J.A., Raymond S.L., Mira J.C. et al. Murine models of sepsis and trauma: can we bridge the gap? // *ILAR J.* 2017. V. 58 (1). P. 90–105.
- Uhlig C., Krause H., Koch T. et al. 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 // *PLoS One*. 2015. V. 10 (8). P. e0134205.
- Vaure C., Liu Y. A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species // *Front. Immunol.* 2014. V. 5. P. 316.
- Volman T.J., Hendriks T., Goris R.J. Zymosan-induced generalized inflammation: experimental studies into mechanisms leading to multiple organ dysfunction syndrome // *Shock*. 2005. V. 23 (4). P. 291–297.
- Wichterman K.A., Baue A.E., Chaudry I.H. Sepsis and septic shock – a review of laboratory models and a proposal // *J. Surg. Res.* 1980. V. 29 (2). P. 189–201.
- Wong V.W., Sorkin M., Glotzbach J.P. et al. Surgical approaches to create murine models of human wound healing // *J. Biomed. Biotechnol.* 2011. V. 2011. P. 969618.
- Wynn J.L., Scumpia P.O., Delano M.J. et al. Increased mortality and altered immunity in neonatal sepsis produced by generalized peritonitis // *Shock*. 2007. V. 28 (6). P. 675–683.
- Zambricki E.A., Daley L.G. Rat sex differences in anesthesia // *Comp. Med.* 2004. V. 54. P. 49–53.
- Zantl N., Uebe A., Neumann B. et al. Essential role of gamma interferon in survival of colon ascendens stent peritonitis, a novel murine model of abdominal sepsis // *Infect. Immun.* 1998. V. 66 (5). P. 2300–2309.
- Zingarelli B., Coopersmith C.M., Drechsler S. et al. Part I: Minimum quality threshold in pre-clinical sepsis studies (MQTiPSS) for study design and humane modeling endpoints // *Shock*. 2019. V. 51 (1). P. 4–17.

## On the Problem of Experimental Modeling of Sepsis

M. N. Cherkasova\*

*Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology,  
Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia*

\*e-mail: mari.cherkasova.1991@bk.ru

Four variants of experimental models of sepsis are discussed: injection, surgical, burn, models of pneumonia with the transition to sepsis. The positive and negative aspects of each of them are analyzed. It is noted that the optimal choice of animals is the most important condition for successful modeling of sepsis. Some aspects of anatomy, physiology, and immunology peculiar to a particular mammalian species are considered. Taking into account the existing differences in reactions, it is possible to note the complexes of signs that are similar or identical in different representatives of animals in sepsis. However, despite the limitations that apply to each sepsis model, it is advisable to use different models on different animal species. Comparison and comparison of the results obtained in the course of experiments is extremely important for elucidating the pathogenetic criteria of sepsis.

*Keywords:* model, sepsis, endotoxin, strain, pathogenesis