

СТРУКОВ Д. В., ВАСИЛЬЕВ А. Г.,  
АЛЕКСАНДРОВИЧ Ю. С.

## Быстрая модель септического шока у крыс

*Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет  
194000, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Литовская, 2  
e-mail: Dstrukov@yandex.ru*

### Реферат

**Введение и цель исследования.** Моделирование септического шока путем введения живых бактерий является наименее инвазивной адекватной формой воспроизведения этого патологического процесса, однако данных, касающихся оценки эффективности этой модели у крыс, на основе прямого измерения гемодинамических параметров недостаточно. Целью исследования было разработать эффективную модель септического шока путем внутривенного введения крысам живой культуры бифидобактерий. В ходе исследований анализировали показатели центральной гемодинамики, состояние эндотелия кровеносных сосудов, измеренные прямым путем, определяли содержание оксида азота, эндотелиального фактора роста сосудов — А (VEGF-A) и тканевого активатора плазминогена (tPA) плазмы, оценивали параметры гемостаза по уровню фибриногена и растворимых комплексов мономерного фибрина. Внутривенное введение культуры бифидобактерий приводило к развитию тяжелого септического шока к 15-й минуте от начала введения препарата с достоверным снижением всех исследуемых показателей системной гемодинамики. Выраженные гемодинамические нарушения сочетались с развитием эндотелиальной дисфункции и усилением активности гемостатических механизмов. Полученная модель безопасна для исследователя, может быть легко воспроизведена в условиях научной или учебной лаборатории и применяться для фундаментальных исследований проблемы септического шока, доклинических испытаний лекарственных средств и в учебных целях.

**Ключевые слова:** септический шок, дисфункция эндотелия, гипотензия, центральная гемодинамика, гемостаз.

### Введение

Септический шок является жизнеугрожающим состоянием, которое характеризуется нарушением реактивности эндотелия сосудов (как на внутреннее, так и на внешние стимулы), депрессией миокарда, приводящей к несоответствию насосной функции сердца, объема циркулирующей крови и емкости сосудистого русла. Прогрессирование этих процессов приводит к развитию синдрома полиорганной недостаточности, которая является непосредственной причиной смерти. Несмотря на то, что любой очаг воспаления в организме может быть потенциальным фактором риска развития септического шока, как правило, в первую очередь, этот процесс развивается у пациентов с тяжелыми сочетанными или комбинированными повреждениями внутренних органов, требующих агрессивной интенсивной терапии, у больных с гнойно-воспалительными заболеваниями органов брюшной полости (перитониты, острые панкреатиты) и у пациентов, страдающих хроническими заболеваниями, приводящими к выраженной иммуносупрессии.

Высокая частота данных патологических процессов обуславливает большой интерес специалистов различных медицинских направлений к вопросам профилактики, ранней диагностики и терапии септического шока. Невозможность проведения всестороннего, комплексного исследования клинико-лабораторных и инструментальных параметров септического шока у человека делает необходимым

поиск эквивалентных клиническим наблюдениям и легко воспроизводимых моделей на лабораторных животных. В современной научной литературе описано несколько моделей септического шока у животных [2–6]. Наиболее часто используются три варианта искусственного развития шока:

— липополисахарид-индуцированная модель (внутривенное или интраперитонеальное введение животным липополисахарида, полученного из клеточной стенки бактерий, например, *St. aureus*, *E. coli* и др.);

— модель полимикробного сепсиса вследствие прободения слепой кишки (модель «саморазвивающегося» септического шока, путем хирургической перфорации слепой кишки животного [3]);

— бактерииндуцированная модель (модель септического шока, основанная на дозированной внутривенной инфузии растворов, содержащих живые патогенные или условно-патогенные микроорганизмы).

Каждая из предлагаемых моделей имеет ряд преимуществ и недостатков, но до настоящего времени не решен вопрос, какая из этих моделей является наиболее оптимальной для оценки результатов доклинических испытаний различных фармакологических препаратов и других методов интенсивной терапии.

Исходя из данных литературы, моделирование септического шока путем введения живых бактерий является наименее инвазивной и наиболее адекватной формой воспроизведения этого патологического

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

процесса, но вместе с тем данных, касающихся оценки эффективности этой модели у крыс, на основе прямого измерения гемодинамических параметров недостаточно.

**Цель исследования** — создание патогенетически обоснованной, экономически целесообразной и легко воспроизводимой модели септического шока у лабораторных крыс и ее клинко-лабораторное изучение.

### Материал и методы исследования

В исследование включены 32 самца-альбиноса серых крыс массой тела 280–310 г, разведения ГП «Рапполово» РАМН (Ленинградская область). Питание и содержание животных соответствовали нормам биоэтики и правилам надлежащей лабораторной практики.

Всем крысам под наркозом (внутримышечное введение смеси — кетамин (50 мг/кг)+реланиум (5 мг/кг)) производили катетеризацию бедренной вены и общей сонной артерии. К артериальному катетеру присоединяли принимающую линию программно-аппаратного комплекса PhysExp (ООО «Cardioprotect», Россия), предназначенного для инвазивного определения показателей гемодинамики у лабораторных животных. Подопытные крысы были разделены на две группы, «контроль» и «шок», по 16 особей в каждой. В группу «контроль» вошли здоровые животные без признаков соматической и инфекционной патологии, для исследований показателей гемодинамики, состояния эндотелия сосудов и активности системы гемостаза в норме. Группу «шок» составили здоровые животные, которым производили моделирование септического шока.

Крысам группы «шок» с 5-й по 20-ю минуты медленно в три приема внутривенно вводили 1,0 мл

взвеси живой культуры бифидобактерий (Бифидум-бактерин, Микроген НПО ФГУП (НПО «Вирион»), Россия) в дозе 370 мг/кг в стерильном физиологическом растворе.

На протяжении всего эксперимента у каждого животного производили непрерывный мониторинг параметров гемодинамики (систолическое, диастолическое, среднее артериальное давление, частота сердечных сокращений).

Взятие крови для лабораторных исследований производили на 60-й минуте от начала эксперимента путем транскутанной пункции сердца крысы в вакуумные системы с антикоагулянтom K3-EDTA. Обработку крови производили сразу после взятия описанным ранее способом [1].

Для оценки состояния эндотелия кровеносных сосудов в плазме крови подопытных крыс определяли содержание оксида азота (II) (NO), эндотелиального фактора роста сосудов — А (VEGF-A) и тканевого активатора плазминогена (tPA) иммуноферментным методом при помощи коммерческих наборов в соответствии с инструкцией фирмы-производителя («Cusabio», Китай). Оценку параметров гемостаза производили в плазме крови крыс гемостазиологическим методом; определяли концентрацию фибриногена и частоту обнаружения растворимых комплексов мономерного фибрина (РКМФ).

Статистическую обработку результатов производили при помощи пакета программ SPSS for Windows 13.0. Данные представлены в виде  $M \pm SD$  (среднее арифметическое  $\pm$  среднее квадратическое отклонение). Для проверки характера распределения применяли тест Колмогорова–Смирнова.

Результаты оценивали, применяя t-критерий Стьюдента (при нормальном характере распределения) и критерий Вилкоксона (при распределении,

Показатели системной гемодинамики у крыс при внутривенном введении живой культуры бифидобактерий ( $M \pm SD$ )

Таблица 1

Исследуемый показатель	Группа крыс	
	контроль	шок
АД систолическое, мм рт. ст.	124 $\pm$ 13,3	41 $\pm$ 20,3*
АД диастолическое, мм рт. ст.	90 $\pm$ 15,6	25 $\pm$ 14,2*
АД среднее, мм рт. ст.	107 $\pm$ 14,2	32 $\pm$ 16,9*
ЧСС, уд./мин	408 $\pm$ 29,1	269 $\pm$ 63,8*

Здесь и далее: \* — отличия от группы «контроль» достоверны на принятом уровне значимости.

Состояние эндотелия и системы гемостаза у крыс при внутривенном введении живой культуры бифидобактерий ( $M \pm SD$ )

Таблица 1

Исследуемый показатель	Группа крыс	
	контроль	шок
NO, мкмоль/л	101,0 $\pm$ 10,56	220,4 $\pm$ 57,93*
VEGF-A, пг/мл	21,5 $\pm$ 6,90	7,9 $\pm$ 5,36*
tPA, нг/мл	10,2 $\pm$ 0,45	9,9 $\pm$ 4,1
Фибриноген, г/л	5,8 $\pm$ 0,25	7,0 $\pm$ 1,20*
РКМФ, %	25	100*

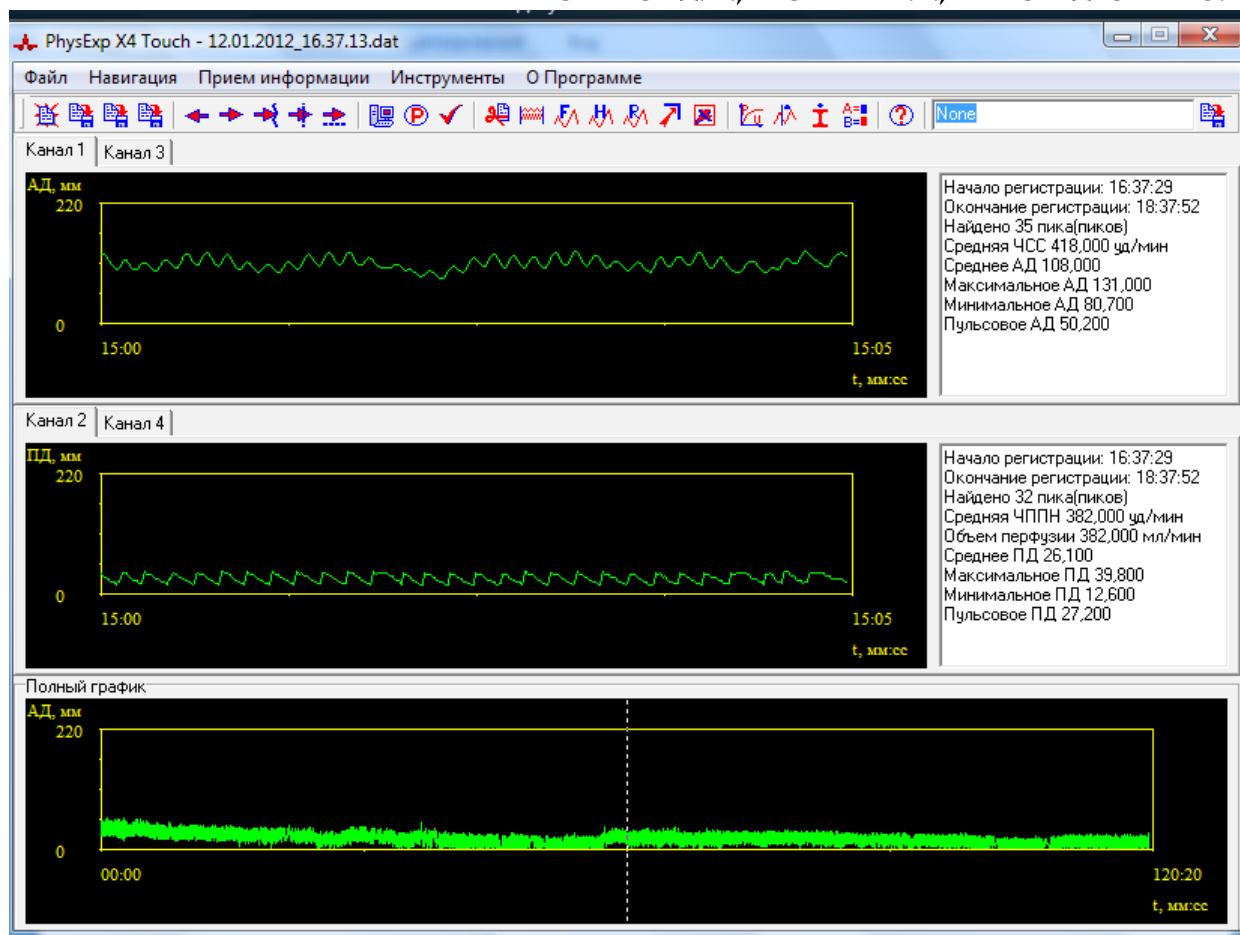


Рис. 1. 15-я минута эксперимента в группе «контроль»

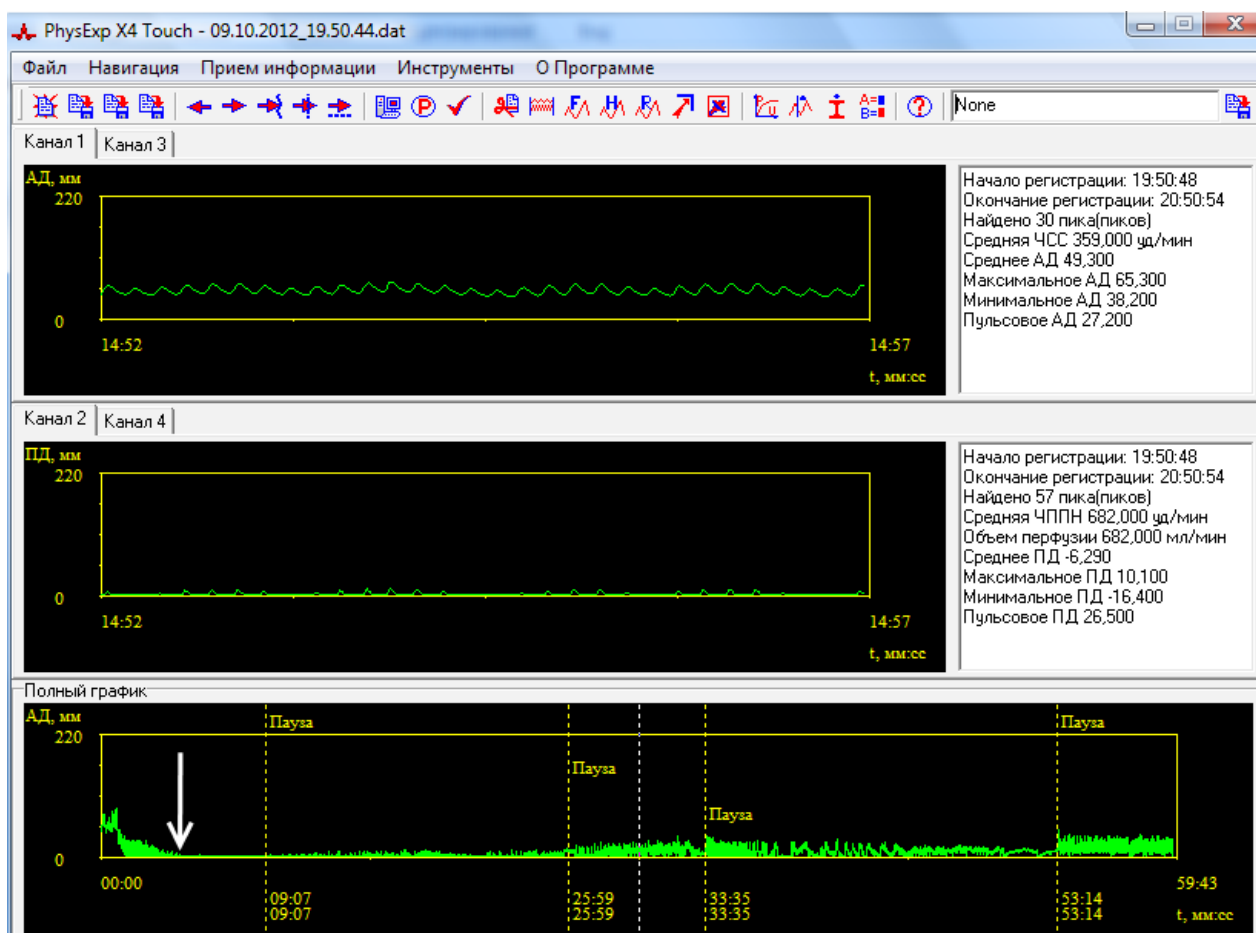


Рис. 2. Графическое представление тяжелого септического шока у крысы через 15 минут после внутривенного введения культуры бифидобактерий

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

отличном от нормального). Статистически значимым уровнем отличий считали вероятность не менее 95 % ( $p < 0,05$ ).

### Результаты исследования и их обсуждение

Показатели системной гемодинамики у крыс группы «контроль» не претерпевали значимых изменений и колебались в пределах нормы (рис. 1). Внутривенное введение подопытным животным культуры живых бифидобактерий приводило к развитию характерной картины тяжелого септического шока к 15-й минуте от начала введения препарата (рис. 2). Это проявлялось, статистически значимым снижением всех исследуемых показателей системной гемодинамики у крыс группы «шок», по сравнению с аналогичными показателями у крыс контрольной группы (табл. 1). Выраженные гемодинамические нарушения у подопытных крыс сочетались с развитием эндотелиальной дисфункции и усилением активности гемостатических механизмов (табл. 2).

Содержание NO у крыс группы «шок» было в среднем на 119,4 мкмоль/л выше, чем у крыс группы «контроль» ( $p < 0,001$ ) ( $220,4 \pm 57,93$  мкмоль/л и  $101,0 \pm 10,56$  мкмоль/л соответственно). На наш взгляд, именно избыточная продукция оксида азота эндотелиоцитами и паравазальными макрофагами в ответ на бактериемию приводит к выраженной вазодилатации и обвальному падению системной гемодинамики крыс. Физиологическая активность эндотелия у животных группы «шок», напротив, оказалась сниженной.

Это проявлялось статистически значимым уменьшением концентрации в крови крыс с бактериемией VEGF-A в среднем на 13,6 пг/мл ( $p < 0,001$ ) и тенденцией к снижению содержания tPA — важного эффектора фибринолитической системы организма и маркера состояния эндотелия (табл. 2).

Одновременно с развитием эндотелиальной дисфункции наблюдалось увеличение потенциала системы гемостаза крыс группы «шок», что проявлялось увеличением содержания в крови фибриногена и частоты обнаружения РКМФ (табл. 2). Наряду с описанными изменениями системной гемодинамики крыс с бактериемией, формированием эндотелиальной дисфункции, выявленное нарастание активности гемостатических механизмов может создать предпосылки для развития ДВС-синдрома и гибели экспериментального животного.

### Заключение

Внутривенное введение крысам живой культуры бифидобактерий является адекватной моделью септического шока. Это подтверждается характерными изменениями системной гемодинамики подопытных животных, развитием эндотелиальной дисфункции и активацией системы гемостаза в ответ на бактериемию. Описанная модель полностью безопасна для исследователя, может быть легко воспроизведена в условиях научной или учебной лаборатории и применяться для фундаментальных исследований проблемы септического шока, доклинических испытания лекарственных средств и в учебных целях, при проведении практических занятий со студентами медицинских вузов.

## Литература

1. Андронов Е. В., Киричук В. Ф., Иванов А. Н., Мамонтова Н. В. Роль оксида азота в регуляции микроциркуляторного звена системы гемостаза // Саратов. науч.-мед. журн. 2007. Т. 3. № 3. С. 41–44.
2. Бебякова Н. А., Хромова А. В., Феликсова О. М. Взаимосвязь периферической вазоконстрикции с полиморфизмом T-786C гена эндотелиальной синтазы оксида азота // Фундамент. исслед. 2013. № 12. С. 176.
3. Берсудский С. О. Избранные лекции по патофизиологии. Саратов: Саратов. мед. ун-т, 2004. 304 с.
4. Трашков А. П., Васильев А. Г., Дементьева Е. А. и др. Сравнительная характеристика нарушений работы плазменного компонента системы гемостаза крыс при развитии экспериментальных опухолей различного гистологического типа // Вестник Росс. военно-мед. академии. 2011. № 1 (33). С. 148–153.
5. Avontuur J. A. M., Bruining H. A., Ince C. Inhibition of Nitric Oxide Synthesis Causes Myocardial Ischemia in Endotoxemic Rats // Am. Heart Association. 1995. Vol. 36. P. 11–28.
6. Broderick K. E., Singh V., Zhuang S. et al. Nitric oxide scavenging by the cobalamin precursor cobinamide. // J. Biol. Chem. 2005. Vol. 280. P. 8678–8685.
7. Bruins M. J., Soeters P. B., Lamers W. H. et al. L-arginine supplementation in hyperdynamic endotoxemic pigs: effect on nitric oxide synthesis by the different organs // Crit. Care Med. 2002. Vol. 30. P. 508–517.
8. Deutz N. E. P., Hallemeesch M. M., Lamers W. H. The role of iNOS and eNOS in the in vivo reduction of gut glutamine consumption after endotoxin treatment in mice // FASEB. 2002. Vol. 16. P. 6–22.
9. Hallemeesch M. M., Soeters P. B., Deutz N. E. P. Renal arginine and protein synthesis are increased during early endotoxemia in mice // Am. J. Physiol. Renal. Physiol. 2002. Vol. 282. P. 216–223.

## Quick model of septic shock in rats

*Saint-Petersburg State Pediatric Medical University  
194000, Alitovskaya str. 2, St. Petersburg, Russia  
e-mail: Dstrukov@yandex.ru*

## Abstract

Modeling septic shock by means of administration of living bacteria is a minimum invasive adequate model for reproduction of this pathologic process, however there is a few data on effectiveness of this model in rats on the basis of direct measurement of hemodynamic parameters. The goal of the study was to elaborate a simple and convenient model of septic shock by intravenous infusion of living bifidobacteria. Indexes of central hemodynamics evaluated by direct method were analyzed in the study as well as endothelial function of blood vessels assessed by measuring concentration of NO, vessels' endothelial growth factor-A and tissue plasminogen activator. Dysfunction of hemostasis was also estimated by measuring fibrinogen level and soluble complexes of fibrin monomer. Intravenous infusion of living bifidobacteria caused development of severe septic shock by 15th minute after administration with valid decrease of all systemic hemodynamics' parameters. Marked hemodynamic disturbances combined with development of endothelial dysfunction and hemostatic mechanisms' increased activity. The present model is absolutely safe; it can be easily reproduced in a research or training laboratory and it can be used for fundamental research of septic shock, for pre-clinical tests of drugs as well as for educational purposes.

**Keywords:** septic shock, endothelial dysfunction, hypotention, central haemodynamics, haemostasis.

## References

1. Andronov E.V., Kirichuk V.F., Ivanov A.N., Mamontova N.V. Rol' oksida azota v regulyacii mikrocirkulyatornogo zvena sistemy gemostaza // *Saratovskij nauchno medicinskij zhurnal*. – 2007. – №3. – tom 3. – S.41-44. [In Russian]
2. Bebyakova N.A., Hromova A.V., Feliksova O.M., Vzaimosvyaz 'perefericheskoy vazokonstrikcii s polimorfizmom T-786S gena ehndotelial'noj sintazy oksi-da azota // *Fundamental'nye issledovaniya*.-2013.-№12.-S.176. [In Russian]
3. Bersudskij S.O. Izbrannye lekzii po patofiziologii // *Izdatel'stvo Sara-tovskogo medicinskogo universiteta*. – 2004. – 304c. [In Russian]
4. Trashkov, A.P., Vasil'ev A.G., Dement'eva E.A. i dr. Sravnitel'naya harakte-ristika narushenij raboty plazmennogo komponenta sistemy gemostaza kry's pri razvitii ehksperimental'nyh opuholej razlichnogo gistologicheskogo tipa // *Vestnik Rossijskoj voenno-medicinskoj akademii*. - 2011. - №1 (33). - S. 148-153. [In Russian]
5. Avontuur J.A.M., Bruining H.A., Ince C. Inhibition of Nitric Oxide Synthesis Causes Myocardial Ischemia in Endotoxemic Rats. // *American Heart Association*.-1995.-Vol.36.-P 11-28.
6. Broderick K.E., Singh, V., Zhuang, S. et al. Nitric oxide scavenging by the cobalamin precursor cobinamide. // *J. Biol. Chem*.-2005.-Vol.8726, № 280.-P 8678–8685.
7. Bruins M.J., Soeters P.B., Lamers Wh. et al. L-arginine supplementation in hyperdynamic endotoxemic pigs: effect on nitric oxide synthesis by the different organs. // *Crit Care Med*.-2002.-Vol.30.-P 508–517.
8. Deutz N.E.P, Hallemeesch M.M., Lamers W.H. The role of iNOS and eNOS in the in vivo reduction of gut glutamine consumption after endotoxin treatment in mice. // *FASEB*.-2002.-Vol.782.-P 6-22.
9. Hallemeesch M.M., Soeters P.B., Deutz N.E.P. Renal arginine and protein synthesis are increased during early endotoxemia in mice. // *Am J Physiol Renal Physiol*.-2002.-Vol.282.-P 216-223.