

<https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-3-84-89>

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ПРЯМОГО ОСТРОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ЛЕГКИХ У КРЫС, ВЫЗВАННОГО ИНТРАТРАХЕАЛЬНЫМ ВВЕДЕНИЕМ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *SALMONELLA ENTERICA*

В.А. Пугач*, М.А. Тюнин, Н.С. Ильинский, Е.В. Левчук, Е.И. Строкина, А.А. Ельцов

ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт
военной медицины» Минобороны России
195043, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая, 4

В настоящем исследовании разработана экспериментальная модель прямого острого повреждения легких посредством однократного интратрахеального введения липополисахарида *Salmonella enterica* в дозе ЛД₅₀ (20 мг/кг). Прослежена динамика гибели животных, массы и температуры тела, а также выраженность патоморфологических проявлений в ткани легких. Установлено, что разработанная модель характеризуется прогрессирующим снижением массы тела на 15%, развитием стойкой гипотермической реакции, выраженного отека и воспалительной реакции в ткани легких в течение первых 4-х суток после введения липополисахарида. Разработанная экспериментальная модель острого повреждения легких проста в исполнении, стабильно воспроизводится и может быть использована в доклинических исследованиях по поиску и оценке эффективности кандидатных препаратов для профилактики и лечения острого респираторного дистресс-синдрома.

Ключевые слова: острый респираторный дистресс-синдром, острое повреждение легких, липополисахарид, биомоделирование, доклинические исследования

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Пугач В.А., Тюнин М.А., Ильинский Н.С., Левчук Е.В., Строкина Е.И., Ельцов А.А. Экспериментальная модель прямого острого повреждения легких у крыс, вызванного интратрахеальным введением липополисахарида *Salmonella enterica*. *Биомедицина*. 2021;17(3):84–89. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-3-84-89>

Поступила 16.04.2021

Принята после доработки 20.04.2021

Опубликована 10.09.2021

AN EXPERIMENTAL MODEL OF DIRECT ACUTE LUNG INJURY IN RATS CAUSED BY INTRATRACHEAL ADMINISTRATION OF LIPOPOLYSACCHARIDE FROM *SALMONELLA ENTERICA*

Victoria A. Pugach*, Mikhail A. Tyunin, Nikita S. Ilinskiy, Elena V. Levchuk,
Elena I. Strokina, Anatoly A. Eltsov

State Scientific Research Testing Institute of Military Medicine of the Ministry of Defense of Russia
195043, Russian Federation, Saint Petersburg, Lesoparkovaya Str., 4

An experimental model of direct acute lung injury was developed by intratracheal administration of lipopolysaccharide from *Salmonella enterica* (LD₅₀ = 20 mg/kg). The dynamics of animal lethality, body weight, temperature and the severity of pathomorphological changes in the lung tissue were analyzed. It was found that the developed model is accompanied by a progressive decrease in body weight by 15%, persistent hypothermic reaction, pronounced edema and inflammatory reaction in the lung tissue within

4 days following lipopolysaccharide administration. The simplicity and reproducibility of the developed experimental model make it useful for preclinical research aimed at selection of candidate drugs for the prevention and treatment of acute respiratory distress syndrome.

Keywords: acute respiratory distress syndrome, acute lung injury, lipopolysaccharide, biomodelling, pre-clinical research

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Pugach V.A., Tyunin M.A., Ilinskiy N.S., Levchuk E.V., Strokina E.I., Eltsov A.A. An Experimental Model of Direct Acute Lung Injury in Rats Caused by Intratracheal Administration of Lipopolysaccharide from *Salmonella enterica*. *Journal Biomed.* 2021;17(3):84–89. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-3-84-89>

Submitted 16.04.2021

Revised 20.04.2021

Published 10.09.2021

Введение

Несмотря на интенсивное развитие фармакологии и фармацевтики, эффективность современных лекарственных средств, применяемых для лечения острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), остается низкой. Частота развития ОРДС при прямом повреждении легких составляет около 20%, а летальность достигает 40–50%. Высокая актуальность исследований по поиску новых эффективных средств и схем фармакологической терапии ОРДС, вызванного прямым повреждением легких, обуславливает необходимость разработки легко воспроизводимых экспериментальных моделей, характеризующихся типовыми изменениями показателей общего состояния животных, структуры и функции легких. Существующие модели ОРДС отличаются рядом недостатков, главным из которых является широкая вариабельность степени повреждения легких из-за сложности дозирования повреждающего фактора и его неравномерного распределения на уровне нижних дыхательных путей [1]. Данная проблема особенно актуальна для исследований с использованием мелких лабораторных животных, поскольку для стандартизованного ингаляционного введения индукторов острого повреждения легких (ОПЛ) требуются дорогостоящие генераторы аэрозоля, обеспечивающие максималь-

но эффективное осаждение аэрозольных частиц на уровне нижних дыхательных путей. В связи с этим в качестве альтернативного варианта для моделирования прямого ОПЛ используют интратрахеальное (и/т) введение таких индукторов, как липополисахариды, блеомицин и др. Вместе с тем типовых моделей с использованием и/т введения липополисахарида (ЛПС), предназначенных для поиска и оценки эффективности кандидатных препаратов для профилактики и лечения ОРДС, до настоящего времени не разработано.

Целью исследования стала разработка модели прямого ОПЛ путем и/т введения ЛПС в дозе ЛД₅₀.

Материалы и методы

Работа выполнена на 65-ти белых беспородных крысах-самцах массой тела 310–350 г (питомник «Рапполово», Ленинградская обл.). ОПЛ моделировали посредством и/т введения ЛПС клеточной стенки бактерии *Salmonella enterica* («Sigma-Aldrich») в дозе ЛД₅₀ (20 мг/кг). Объем введения составлял 1,5 мл/кг. Растворитель — р-р фосфатно-солевого буфера (рН=7,4). Перед выполнением и/т введения животных наркотизировали с помощью внутривенного введения препарата «Золетил 100» в дозе

4,0 мг/кг. Процедуру и/т введения осуществляли через 5 мин после наркотизации и проверки глубины наркоза с помощью зонда для крыс («MicroSprayer®» Aerosolizer, модель IA-1B, США). В качестве контроля использовали животных после и/т введения фосфатно-солевого буфера в аналогичном объеме. Измерение массы и температуры тела крыс осуществляли ежедневно в течение 14-ти сут. Для оценки выраженности отека легких рассчитывали массовый коэффициент (МК) (отношение массы легочного комплекса к массе животного). Образцы легких фиксировали в 10% р-ре забуференного формалина и заливали в парафин. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

Статистическую обработку результатов проводили методами непараметрической статистики в программе Statistica 10.0. Результаты исследования приведены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей — Me [Q1; Q3]. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для оценки динамики показателей в качестве фоновых значений использовали данные измерений, полученные за день до моделирования ОПЛ.

Результаты и их обсуждение

Результаты исследований представлены в табл. 1 и 2. Гибель животных после и/т введения ЛПС регистрировали в период с 12-ти ч до 4-х сут. С целью расчета среднего эффективного времени гибели использовали логарифмическое уравнение регрессии, полученное на основе кумулятивного графика времени гибели животных. Значение искомого параметра составило $29,1 \pm 3,05$ ч.

В группе контроля у животных наблюдали стабильный прирост массы тела в течение всего периода наблюдения, который в итоге составил 7,4% ($p < 0,05$). Измерение температуры тела позволило выявить незначительные колебания показателя, которые не имели статистической значимости.

У опытных животных в течение 1–5-х сут после и/т введения ЛПС отмечали снижение массы тела относительно фоновых величин на 12,1–15,5% ($p < 0,05$). Через 6 сут наблюдения у выживших животных регистрировали положительную динамику массы тела в виде стабильного и равномерного прироста показателя. На 14-е сут эксперимента масса тела крыс после ЛПС-индуцированного повреждения легких восстанавливалась до уровня фоновых значений. Следует отметить, что в течение всего периода наблюдения масса тела опытных животных статистически значимо отличалась от значений показателя у контрольных животных. В течение первых 4-х сут после и/т введения ЛПС регистрировали стойкую гипотермическую реакцию. Уже через 3 ч после моделирования ОПЛ отмечали резкое снижение температуры тела на $3,7^\circ\text{C}$ ($p < 0,05$) относительно фоновых значений. Далее динамика температуры тела характеризовалась постепенным повышением показателя, в результате чего температура тела достигала уровня фоновых значений к исходу 5-х сут наблюдения.

Измерение МК легких и проведение гистоморфологического исследования позволило проследить характерную динамику развития патологического процесса в ткани легких в течение 4-х сут после моделирования ОПЛ. Через 6 ч после введения ЛПС МК опытных животных увеличился в 1,5 раза относительно животных в контрольной группе. К исходу 4-х сут МК у животных с ЛПС-индуцированным повреждением легких оставался на уровне 8,89 [7,72; 10,11], что в 1,6 раза превышало значения показателя у контрольных животных (5,51 [4,93; 6,46]). Через 3–6 ч после введения ЛПС в паренхиме легких уже отмечали выраженные патологические изменения: развитие интерстициального и внутриальвеолярного отека, кровоизлияния и массивную лейкоцитарную инфильтрацию всех структурных компонентов паренхимы

Таблица 1. Показатели летальности, массы и температуры тела в группах экспериментальных животных в течение 1–5 сут наблюдения
Table 1. Indicators of mortality, weight and body temperature in groups of experimental animals during 1–5 days of observation

Группа живот- ных	фон	Срок наблюдения							
		3 сут	6 ч	12 ч	1 сут	2 сут	3 сут	4 сут	5 сут
Гибель (опыт)	0/20 (0%)	0/20 (0%)	0/20 (0%)	1/20 (5%)	5/20 (25%)	9/20 (40%)	10/20 (50%)	11/20 (55%)	11/20 (55%)
Масса тела, г									
Контроль	325 [310;339]	–	–	–	328 [312;345]	327 [313;343]	330 [310; 349]	330 [315;345]	335 [314;345]
Опыт	330 [310;346]	–	–	–	290** [280;315]	286** [261;298]	281** [254;298]	280** [257;301]	285** [257;303]
Температура тела, °С									
Контроль	37,0 [36,8;37,3]	37,5 [37,3;37,6]	37,1 [36,8;37,4]	37,4 [37,0;37,5]	37,0 [36,7;37,3]	37,2 [36,8;37,4]	37,2 [36,9;37,4]	37,0 [36,7;37,1]	37,5 [37,0;37,6]
Опыт	37,4 [36,8;37,5]	33,5** [33,1;34,0]	34,7** [34,0;35,2]	35,7** [34,8;36,3]	35,8** [34,9;36,2]	35,4** [34,6;35,6]	36,5** [35,4;36,7]	36,6* [36,3;37,0]	37,3 [36,7;37,5]

Таблица 2. Показатели летальности, массы и температуры тела в группах экспериментальных животных в течение 6–14 сут наблюдения
Table 2. Indicators of mortality, weight and body temperature in groups of experimental animals during 6–14 days of observation

Группа животных	6 сут	7 сут	8 сут	9 сут	10 сут	11 сут	12 сут	13 сут	14 сут
Гибель (опыт)	11/20 (55%)	11/20 (55%)	11/20 (55%)	11/20 (55%)	11/20 (55%)	11/20 (55%)	11/20 (55%)	11/20 (55%)	11/20 (55%)
Масса тела, г									
Контроль	337 [320; 349]	336 [319;352]	338 [320;356]	340* [322;355]	340* [320;356]	345* [325;349]	344* [326;345]	346* [323;349]	349* [330;354]
Опыт	288# [249;311]	295# [255;319]	291# [254;322]	296# [256;331]	298# [257;329]	306# [261;334]	308# [262;339]	313# [266;339]	314# [268;340]
Температура тела, °С									
Контроль	36,9 [36,8;37,1]	37,3 [37,0;37,5]	37,8 [37,5;37,9]	37,1 [36,7;37,4]	37,2 [37,0;37,4]	37,0 [36,9;37,3]	37,5 [37,2;37,6]	37,2 [37,1;37,4]	37,4 [37,2;37,5]
Опыт	37,0 [36,7;37,3]	37,2 [36,9;37,5]	37,4 [36,8;37,6]	36,7 [36,6;37,5]	37,0 [36,7;37,5]	37,0 [36,8;37,4]	37,3 [37,0;37,6]	37,5 [37,3;37,7]	37,7 [37,5;37,9]

Примечание: * — различия статистически значимы относительно фоновых значений ($p < 0,05$, критерий Фридмана); # — различия статистически значимы относительно группы контрольных животных ($p < 0,05$, критерий Манна—Уитни).

Note: * — differences are statistically significant relative to the baseline values ($p < 0,05$, Friedman's test); # — differences are statistically significant relative to the control ($p < 0,05$, Mann-Whitney test).

легких. Через 12–24 ч после воздействия ЛПС у опытных животных прогрессировали патологические изменения в паренхиме легких, обусловленные усилением альвеолярного отека. Около 2/3 ее объема было представлено безвоздушной паренхимой с тотальным внутриальвеолярным отеком и кровоизлияниями. На 4-е сут после моделирования ОПЛ в патологически измененных участках легких просматривались пролиферативные процессы, направленные на элиминацию отека и клеточную репарацию эпителия респираторных и воздухоносных путей. Прежде всего, исчезали проявления паравазального отека и увеличивалось количество инфильтрата в виде активных форм макрофагов, лимфоцитов и эозинофильных лейкоцитов.

Выводы

Разработанная модель прямого ОПЛ характеризуется прогрессирующим снижением массы тела на 15%, развитием стойкой гипотермической реакции, выраженного отека и воспалительной реакции в ткани легких животных в течение первых 4-х сут после введения ЛПС в дозе ЛД₅₀. Простота исполнения, высокая воспроизводимость и наличие простых количественных критериев (масса тела, температура тела, количество погибших животных, массовый коэффициент легких) позволяет рекомендовать данную модель ОПЛ для проведения доклинических исследований, направленных на поиск и оценку эффективности кандидатных препаратов для профилактики и лечения ОРДС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Yehya N. Lessons learned in acute respiratory distress syndrome from the animal laboratory.

Ann Transl Med. 2019;7(19):503. DOI: 10.2103/atm.2019.09.33.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Пугач Виктория Александровна*, к.б.н., ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Минобороны России;
e-mail: gniiivm_7@mil.ru

Victoria A. Pugach*, Cand. Sci. (Biol.), State Scientific Research Testing Institute of Military Medicine of the Ministry of Defense of Russia;
e-mail: gniiivm_7@mil.ru

Тюнин Михаил Александрович, к.м.н., ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Минобороны России

Mikhail A. Tyunin, Cand. Sci. (Med.), State Scientific Research Testing Institute of Military Medicine of the Ministry of Defense of Russia

Ильинский Никита Сергеевич, ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Минобороны России

Nikita S. Ilinskiy, State Scientific Research Testing Institute of Military Medicine of the Ministry of Defense of Russia

Левчук Елена Владимировна, «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Минобороны России

Elena V. Levchuk, State Scientific Research Testing Institute of Military Medicine of the Ministry of Defense of Russia

Строкина Елена Игоревна, ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Минобороны России

Elena I. Strokina, State Scientific Research Testing Institute of Military Medicine of the Ministry of Defense of Russia

Ельцов Анатолий Анатольевич, ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Минобороны России

Anatoly A. Eltsov, State Scientific Research Testing Institute of Military Medicine of the Ministry of Defense of Russia

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author