

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-291

**ОПТИМАЛЬНЫЕ ПАРАМЕТРЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ МЫШИНОЙ МОДЕЛИ
ИНФИЦИРОВАННЫХ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* РАН*****SELECTION OF PARAMETERS FOR CREATING A MOUSE MODEL
OF INFECTED *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* WOUNDS**М. М. Абдулкадиева¹, В. В. Литвиненко^{1,2}, Д. А. Слонова¹, К. А. Собянин^{1,5}, Е. В. Сысолятина¹¹Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии
им. Н. Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва²Объединенный институт высоких температур РАН, Москва³Российский национальный исследовательский медицинский университет
им. Н. И. Пирогова Минздрава России, МоскваM. M. Abdulkadieva¹, V. V. Litvinenko^{1,2}, D. A. Slonova¹, K. A. Sobyenin^{1,5}, E. V. Sysolyatina¹¹Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow²Joint Institute of High Temperatures RAS, Moscow³Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

✉ Maryam094@yandex.ru

Аннотация

Инфицирование ран приводит к удлинению сроков лечения, повышению риска развития сепсиса и инвалидизации. Для тестирования новых антибактериальных и ранозаживляющих средств требуются адекватные *in vivo* модели. Целью данной работы стал подбор оптимальных параметров мышиной модели инфицированных *Pseudomonas aeruginosa* ран, в том числе с иммунной супрессией, с учетом массы мышей, заражающей дозы и техники моделирования и ведения ран.

Abstract

Infection of wounds leads to longer treatment periods, increased risk of sepsis and disability. Adequate *in vivo* models are required to test new antibacterial and wound healing agents. The aim of this work was to select the optimal parameters of mouse model of infected *Pseudomonas aeruginosa* wounds with and without immune suppression, such as mass of mice, infectious dose and techniques for modeling and wound management.

Введение

Заживление ран — сложный динамический многофазный процесс восстановления поврежденных тканей. Особой проблемой и финансовым бременем для систем здравоохранения во всем мире являются хронические раны [1, 2]. Переход раны в хроническое состояние часто происходит вследствие контаминации раневой поверхности, что ухудшает качество жизни пациентов, увеличивает риск инвалидизации и смертности. Большую сложность в лечении представляют собой огнестрельные раны, так как все они являются контаминированными, а заживление часто протекает на фоне иммунной супрессии пациента.

Разработка средств для ранозаживления невозможна без адекватных моделей *in vivo*. Целью данной работы был подбор оптимальных параметров мышиной модели инфицированных *Pseudomonas aeruginosa* ран, в том числе на фоне иммунной супрессии.

Материалы и методы

Мышам линий BALB/c и C57BL/6, самцы, $m = 18-22$ г ($n = \min 10$ для каждой группы) в рану вносили *P. aeruginosa* (2943, 21), в дозах $10^6, 10^7, 10^8, 10^9$ кл./рана. Наблюдение проводили в течение 14 дней после нанесения раны. Обсемененность поверхности ран учитывалась на 1, 2, 3, 4, 5, 7-й день после инфицирования.

Модель иммунной супрессии разрабатывалась на самцах линии BALB/c массой 21–23 г. Циклофосфамид в дозе 500, 1000, 1200, 1500 мкг/мышь вводился перитонеально за 4 дня до формирования ран и инфицирования *P. aeruginosa* 21 в дозе $10^6, 10^7, 10^8$ кл./рана.

* Работа выполнена в рамках государственного задания № 056-00006-24-02.

© М. М. Абдулкадиева, В. В. Литвиненко, Д. А. Слонова, К. А. Собянин, Е. В. Сысолятина, 2024

Моделирование ран

Полнослойные раны ($d = 12$ мм) наносили перфоратором, после чего на поверхность кожи наклеивали кольца с аналогичным диаметром. В рану вносили бактерии в матриксе из 1 % метилцеллюлозы, отверстие заклеивали медицинским пластырем. Все манипуляции с животными проводили с использованием изофлюранового наркоза.

Микробиологические смывы брали стерильным ватным тампоном, смоченным в физиологическом растворе с последующими высевами на твердый питательный агар ВНИ (Difco, США). Материал на гистологическое исследование отбирался на 4, 7, 14-й день эксперимента стандартным способом.

Результаты

Использование кольца предотвращало контракцию раны. Заклеивание раневой поверхности приводило к формированию гнойных масс к 3-му дню эксперимента на обеих линиях мышей в 100 % случаев. Оптимальная инфицирующая доза составила 10^8 кл/рана (рис. 1). На мышах линии C57BL/6 выраженность воспалительной реакции и объем гнойных масс были ниже, чем для мышей линии BALB/c.

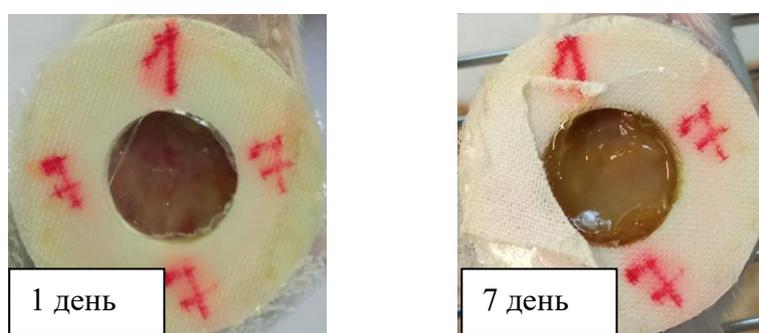


Рис. 1. Фото раны мыши BALB/c с контракционным кольцом

Данные по высевам при инфицирующей дозе 10^8 кл/рана приведены на рис. 2. На второй день после инфицирования наблюдалось 100-кратное увеличение количества бактерий, и затем каждые 24 ч обсемененность снижалась приблизительно на порядок. Высевы на 7-й день проводить было нецелесообразно в связи с образованием плотного струпа.

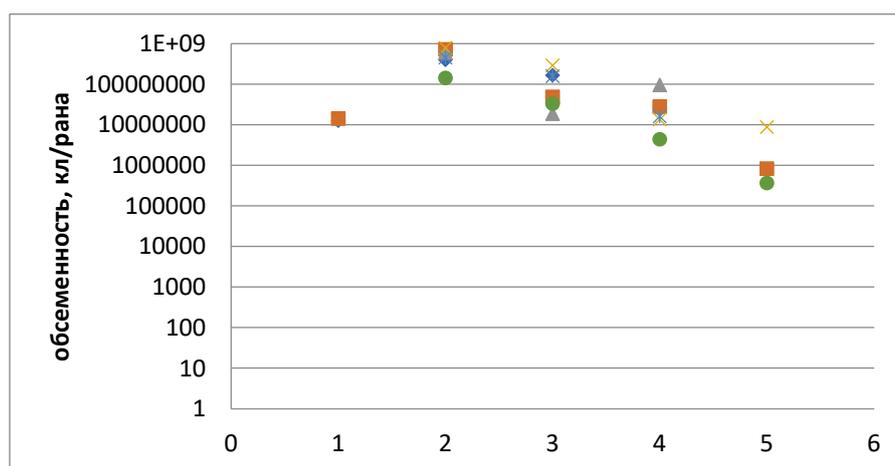


Рис. 2. Обсемененность раневой поверхности мышей линии BALB/c, инфицированных *P. aeruginosa* 21, на 1, 2, 3, 4, 5-й дни эксперимента

Развитие воспаления было подтверждено гистологически — на 4-й день в раневом ложе наблюдались обильные гнойно-некротические массы, под ними — отложения эозинофильной массы и зачатки грануляционной ткани, инфильтрированной лейкоцитами. Подкожная мышца и фасция также были инфильтрированы лейкоцитами. У некоторых животных с краю раневого дефекта были сформированы «карманы», заполненные гнойным экссудатом.

На 7-й день в ране под струпом находились гнойно-некротические массы, но отмечалось активное кровоснабжение грануляционной ткани и инфильтрация ее лейкоцитами, В-клетками и плазмоцитами. Отмечено заполнение дефекта грануляционной тканью, содержащей фибробласты и фиброциты.

Иммунная супрессия со снижением массы тела (в пределах $1,1-2,0 \pm 0,3$ г), истощением тимуса и селезенки наблюдалась при дозах циклофосфида ≥ 1000 мкг/мышь. При использовании инфицирующей дозы *P. aeruginosa* обоих штаммов 10^8 кл/рана на 2-й день после инфицирования наблюдалась 100%-я гибель. Оптимальной дозой для модели инфицированных ран у иммуносупрессированных животных являлась концентрация 10^7 кл/рана при массе животного на момент введения циклофосфида не ниже 21 г.

Уровень обсемененности раневой поверхности иммуносупрессированных животных был сопоставим с таковым для иммунокомпетентных при различии в инфицирующей дозе в 10 раз. Однако естественное снижение бактериальной нагрузки происходило значительно медленнее: так, на 3-й день эксперимента обсемененность раневой поверхности составила в среднем $1,2 \times 10^8$ кл/рана, на 4-й день — $5,2 \times 10^7$, на 7-й день плотный струп не формировался, и обсемененность составила $3,56 \times 10^7$ кл/рана.

Литература

1. Sen C. K. Human wound and its burden: Updated 2020 compendium of estimates. *Adv. Wound Care.* 2021; 10:281–292. DOI: 10.1089/wound.2021.0026.
2. Раны и раневые процессы: учеб.-метод. пособие для интернов, ординаторов и врачей / под общ. ред. В. В. Кочубей. Краснодар: ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России, 2016. 29 с.