

ISPITIVANJE KONCENTRACIJE GLUKOZE U HRONIČNIM MODELIMA SEPSE KOD PACOVA

Dragica Stojanović^{1*}, Ružica Ašanin², Milica Ninković³,
Živorad Malićević³, Igor Stojanov¹

¹Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”, Novi Sad,

²Fakultet veterinarske medicine, Beograd

³Vojno medicinska akademija, Beograd

Kratak sadržaj

U cilju praćenja promena koncentracije glukoze u modelu sepse cecalna ligacija i punktura (CLP) sa mešanom i čistim kulturama bakterija, izazvali smo kliničku formu sepse kod pacova. Ogledi su izvedeni kod 104 mužjaka pacova, Wistar soja, telesne mase od 190 do 240 grama. Pacovi su podeljeni u četiri grupe od kojih su tri imale 28 životinja, dok je u kontrolnoj grupi bilo 20 životinja. Termini posmatranja i žrtvovanja životinja su bili: 12, 24, 72 i 120 časova posle hirurške intervencije.

Kod ispitivanih modela sepse, zabeležena je signifikantna hipoglikemija kod pacova u posmatranim terminima rane sepse (12 i 24 sata), a u grupi sa mešanom kulturom bakterija i 72. sata eksperimenta. Hiperglikemija je registrovana u kasnoj sepsi (72. sata) u grupi pacova kod kojih je sepsa izazvana čistim kulturama bakterija *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*, ali bez statističke značajnosti u odnosu na kontrolni nalaz.

Ključne reči: model sepse, pacov, glukoza

* e-mail: dragica@niv.ns.ac.rs

EXAMINATION OF GLUCOSE CONCENTRATION IN CHRONIC SEPSIS MODEL IN RATS

Dragica Stojanović^{1*}, Ružica Ašanin², Milica Ninković³,
Živorad Malićević³, Igor Stojanov¹

¹Scientific Veterinary Institute „Novi Sad”, Novi Sad,

²Faculty of Veterinary Medicine, Beograd,

³Military Medical Academy, Belgrade

Abstract

We induced clinical form of sepsis in rats by cecal ligation and perforation (CLP) with mixed and pure culture of bacteria, with the aim to monitor glucose concentration in sepsis. The trial was carried out on 104 male rats, Wistar strain, body mass 190 to 240 g. The rats were divided in four groups consisting of 28 animals, and a control group of 20 animals. The period of observations were 12, 24, 72 and 120 hours after surgical intervention. In the examined sepsis model, a significant hypoglycemic activity was noticed in early sepsis (12 and 24 hours), but in the group with mixed bacteria culture only after 72 hours. Hyperglycemia was registered in late sepsis (72 hours) in the group of rats where sepsis was caused by pure bacterial culture of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, without statistic significance compared to the findings in the control group.

Key words: sepsis model, rat, glucoses

UVOD

Sepsa predstavlja stanje teškog metaboličkog stresa sa dubokim promenama koncentracije citokina, hormona i drugih biohemijskih parametara u krvnoj plazmi. Poremećaj metabolizma glukoze je jedan od osnovnih patofizioloških procesa hiperdinamičke faze sepse i javlja se pre hemodinamičkih promena. Primarna promena je hiperglikemija koja je relativno kratkotrajna, nakon čega sledi dugotrajna hipoglikemija koja se ne može korigovati infuzijama glukoze. Dok neki autori ističu ulogu povećanog cirkulatornog nivoa kataboličkih hormona (kateholamina, kortikosteroida, glukagona i hormona rasta) (Vincent, 2002; Yelich, 1990), drugi disproporciju između procesa umerenog anabolizma i izraženog hiperkatabolizma objašnjavaju povećanjem cirkulatornog nivoa kataboličkih medijatora tumor nekroze faktora (TNF) i interleukina (IL-1) (Rixen i sar., 1996; Shapiro i sar., 1993). Sintezu medijatora mogu realizovati različite ćelije, a delovanje medijatora na ćelije

zavisu od stepena aktivnosti ćelija, njihove sposobnosti da oslobode medijatore kao i od prisustva drugih bioloških aktivnih supstancija.

Mnogobrojni endogeni i egzogeni faktori, uključujući endotoksine gram negativnih kao i enterotoksine gram pozitivnih bakterija, predstavljaju osnovu veze u pokretanju patofizioloških mehanizama sepse. Sepsa kod ljudi zahteva obavezno medicinsko lečenje koje dovodi do promena u patofiziološkim procesima obolelih, odnosno do nemogućnosti adekvatnog sagledavanja šta se događa na nivou tkivnog metabolizma (Hazinski i sar., 1993). Imajući ovo u vidu, kao i činjenicu da mnoge promene i mnogi odgovori u toku pojedinih faza septičnog procesa nisu jasni, pre svega kako invazija mikroorganizama i drugih insulta indukuje oslobađanje citokina i sekundarnih medijatora, postaje jasno da su informacije o sistemskom inflamatornom odgovoru sadržane u kliničkim modelima sepse. Indukcija inflamacije kod modela sepse na životinjama, iako kompleksna povećava mogućnosti za razumevanje biološke kaskade (medijatora/modulatora) zavisno od inter i intracelularne signalizacije (Stojanović i sar., 2005), a razvoj novih pristupa u rešavanju i tretmanu sepse zahteva primenu kvantitativnih i kvalitativnih ispitivanja kod modela sepse na životinjama (Stojanović i sar., 2001).

MATERIJAL I METODE

Ogledi su izvedeni na 104 mužjaka pacova, Wistar soja, telesne mase od 190 do 240 grama. Pacovi su podeljeni u četiri grupe od kojih su tri imale 28 životinja i jedna kontrolna od 20 životinja. U cilju praćenja razvoja sepse termini posmatranja i žrtvovanja životinja su bili 12, 24, 72 i 120 časova posle hirurške intervencije.

Klinički vidljiva sepsa u dve grupe pacova izazvana je tako što su u prethodno ispražnjen, podvezan i ispran cekum inokulisane čiste kulture bakterija *Escherichia coli* (EC) i *Staphylococcus aureus* (SA) (Stojanović i sar., 2002). Kod treće grupe životinja sepsa je izazvana cekalnim sadržajem podvezanog i punktiranog cekuma (mešana kultura mikroorganizama - MC) (Wichterman i sar., 1980). Grupa kontrolnih životinja je lažno operisana otvaranjem abdomena.

U posmatranim terminima, krv je uzimana punkcijom iz aorte abdominalis i korišćena u svrhu određivanja koncentracije glukoze na automatskom analizatoru, američke firme Technicon.

Svi dobijeni podaci u ovim ispitivanjima obrađeni su na PC IBM kompatibilnom računaru u programskom paketu „Statgraph” 3.0, Excel 97 i Statistica 6.0. U obradi podataka korišćena je deskriptivna statistička metoda, metoda dvosmerne analize varijanse tj. zavisni i nezavisni Student t-test za mali uzorak.

REZULTATI I DISKUSIJA

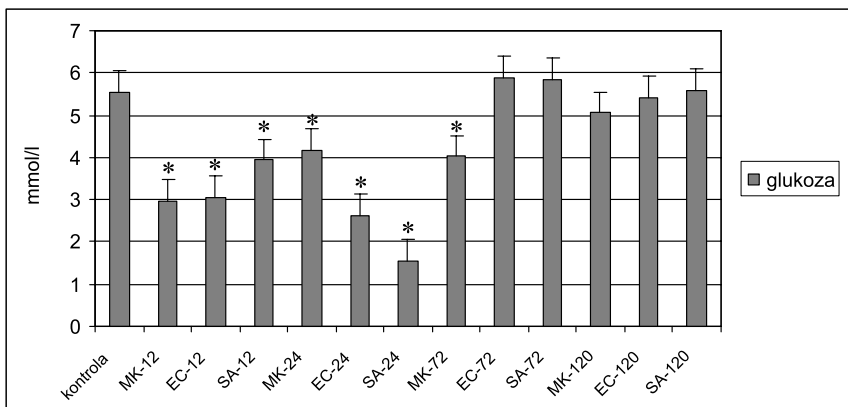
U našim ispitivanjima, tokom eksperimentalnog protokola zabeležena je signifikantna hipoglikemija u MK grupi pacova (osim 120. h), dok je u grupama EC i SA pacova sa sepsom signifikantna hipoglikemija zabeležena u terminima od 12 i 24 časa (grafikon 1). Prema istraživanjima nekih autora, hipoglikemija je posledica

iscrpljenja glikogenskih rezervi, inhibicije glukoneogeneze od strane bakterijskih toksina i/ili medijatora i pojačanog ulaska glukoze u tkiva, posebno u skeletne mišiće (Titheradge i sar., 1995; Yelich, 1990). Na osnovu eksperimentalnih istraživanja, sugerisano je da endotoksin ima insulinu sličan efekat (insuline-like effect) ili da potencira osetljivost tkiva na efekte insulina, najverovatnije delujući na membranski transport glukoze. Gamelli i sar. (1996) su ustanovili da je kod miša olakšan ulazak glukoze u ćelije makrofaga, omogućen kroz povećanje glukoze transporter-1 (GLUT-1) iRNA i nivoa proteina. *In vitro* ispitivanjima Ceppi i sar. (1996) su ustanovili da tretman kulture hepatocita sa kombinovanim citokinima (TNF-alfa, INF-gama, IL-1-beta) i LPS-om sprečava glukoneogenezu i dovodi do pada glikogena, zavisno od vremenskog povećanja sinteze azotnog oksida (NO). Do sličnih rezultata su došli Casada i sar. (1996) *in vitro* i *in vivo* ispitivanjima na modelu endotoksičnog šoka kod pacova. Autori izveštavaju da su promene glukoneogenetskog fluksa udružene sa smanjenjem glukoze transporter-2 (GLUT-2) iRNA i fosfoenolpiruvat karboksikinaze, u vreme kada je povećan nivo iRNA inducibilne NO sintetaze (iNOS).

U ispitivanim modelima sepse, povećanje koncentracije glukoze je zabeleženo 72. sata kod pacova kod kojih je sepsa izazvana čistim kulturama bakterija, ali bez statističke signifikantnosti u odnosu na kontrolni nalaz (grafikon 1). U sličnim ispitivanjima, kod modela septičnog šoka primarna promena je hiperglikemija kod pacova, nakon čega sledi hipoglikemija. Nije sasvim jasno da li je hiperglikemija posledica pojačane glikogenolize ili glukoneogeneze. Kako je u sepsi pojačan katabolizam proteina, to se povećana koncentracija alanina i drugih aminokiselina u krvi dovodi u vezu sa glukoneogenezom. Međutim, studije na životinjama prezentuju da bakterijski toksini inhibišu glukoneogenezu pa je korelacija nemoguća (Schumer, 1988). Postoji još i mogućnost da preko raznih sistema drugih glasnika, endotoksin deluje na regulatorne enzime glikolize, pre svega enzim fosfofrukto kinazu (PFK), čija se aktivnost povećava povećanjem koncentracije ADP-a, AMP-a i neorganskog fosfora, a inhibira od strane ATP-a. Pretpostavlja se da u slučaju sepse dolazi do povećanog glikolitičkog fluksa posredstvom povećane aktivnosti PFK (Thyrault i sar., 1993).

S druge strane, povećano iskorišćavanje glukoze u pojedinim tkivima u toku sepse ima za posledicu pojavu laktične acidoze. Smatra se da je moguća meta metaboličkog delovanja bakterijskih toksina i piruvat dehidrogenaza (PDH), koja reguliše iskorišćenost piruvata od strane Krebsovog ciklusa (Gutierrez i sar., 1996). Pretpostavlja se da prilikom sepse dolazi do konverzije aktivnog oblika PDH u inaktivni izoenzim. Neposredna posledica takve inhibicije PDH je nagomilavanje piruvata, nakon čega sledi stvaranje laktata. Eksperimentalne studije ispitala su da upotreba dihloracetata (DCA) povećava metabolizam piruvata, najverovatnije stimulišući formiranje aktivne PDH (Lang i sar., 1987).

Grafikon 1. Kretanje vrednosti glukoze kod septičnih pacova u terminima rane (12 i 24 h) i kasne sepse (72 i 120 h)



EC-grupa pacova kod kojih je sepsa izazvana sa čistom kulturom bakterija *Escherichia coli*
SA- grupa pacova kod kojih je sepsa izazvana sa čistom kulturom bakterija *Staphylococcus aureus*

MK-grupa pacova kod kojih je sepsa izazvana sa mešanom kulturom bakterija (podvezani i punktiranani deo cekuma)

*statistički značajna razlika u odnosu na kontrolne vrednosti.

ZAKLJUČAK

Dobijeni eksperimentalni rezultati ukazuju da ispitivani modeli sepse dovode do značajnih promena u koncentraciji glukoze, odnosno signifikantne hipoglikemije u prvoj polovini eksperimentalnog protokola (rana sepsa), dok je hiperglikemija zabeležena 72. sata kod pacova kod kojih je sepsa izazvana sa čistim kulturama bakterija (kasna sepsa). Na osnovu izvršenih ispitivanja može se zaključiti da ispitivani modeli sepse otvaraju nove mogućnosti za izučavanje patofizioloških mehanizama sepse, posebno na nivou intra i intercelularne signalizacije, dok primena različitih terapijskih tretmana kod ispitivanih modela otvara nove mogućnosti za potencijalnu bioterapiju.

LITERATURA

1. Casada M, Diaz Guerra M.J, Bosca L, Martin Sanz P.: Characterization of nitric oxide dependent changes in carbohydrate hepatic metabolism during septic shock. *Life Sci*, 58, 7, 561-72, 1996.
2. Ceppi E.D, Smith FS, Titheradge M.A.: Effect of multiple cytokines plus bacterial endotoxin on glucose and nitric oxide production by cultured hepatocytes. *Biochem J*, 317, 2, 503-7, 1996.
3. Gamelli R.L, Liu H, He L.K, Hofmann C.A.: Augmentations of glucose uptake and glucose transporter-1 in macrophages following thermal injury and sepsis in mice. *J Leukoc Biol*, 59, 5, 639-47, 1996.

4. Gutierrez G, Wulf M.E.: Lactic acidosis in sepsis: a commentary. *Intensive Care Med*, 22(1), 6-16, 1996.
5. Hazinski M.F, Iberti T.J, Intyre N.R, Parker M.M, Tribett D, Prion S.: Epidemiology, pathophysiology and clinical presentation of gram-negative sepsis. *Am J Crit Care*, 2, 3, 224-35, 1993.
6. Lang C.H, Bagby G.J, Blakesley H.L, Spitzer J.J.: Glucose kinetics and pyruvate dehydrogenase in septic rats treated with dichloroacetate. *Circ Shock*, 23, 2, 131-41, 1987.
7. Maitra S.R, Pan W, Geller E.R.: Effect of diltiazem on altered glucose regulation during endotoxic shock. *J Surg Res*, 55, 2, 201-4, 1993.
8. Pittner R.A, Spitzer J.A.: Shift from alpha to beta-type adrenergic receptor-mediated responses in chronically endotoxemic rats. *Am J Physiol*, 264, 4-1, 650-4, 1993.
9. Rixen D, Siegel J.H, Phil F.M.: „Sepsis/SIRS,” Physiologic classification, severity stratification, relation to cytokine elaboration and outcome prediction in posttrauma critical illness. *J Trauma*, 41, 4, 581-98, 1996.
10. Schumer W.: Liver gluconeogenic metabolites in young and old rats during septic shock. *Arch Surg*, 54(7), 460-2, 1988.
11. Shapiro L, Gelfand J.A.: Cytokines and sepsis: pathophysiology and therapy. *New Horiz*, 1, 1, 13-22, 1993.
12. Stojanović D, Ašanin R, Maličević Ž, Vidić B.: Application of different remedies in therapy of experimentally induced and clinically manifested sepsis. *Mikrobiologija*, 38, 2, 61-70, 2001.
13. Stojanović D, Maličević Ž.: Eksperimentalni modeli sepse. *Veterinarski žurnal Republike Srpske*, 5, 3-4, 146-50, 2005.
14. Stojanović D, Maličević Ž, Ašanin R.: The use a new model for the investigation of sepsis. *Acta Veterinaria*, 52, 2-3, 125-31, 2002.
15. Thyrault M, Chemla D, Coirault C.: Physiopathology of myocardial dysfunction in septic shock. *Arch Mal Coeur Vaiss.*, 86, 3, 349-57, 1993.
16. Titheradge M.A, Knowles R.G, Smith F.S, Horton R.A, Ceppi E.D.: Mechanism of inhibition of hepatic gluconeogenesis by bacterial endotoxin: a role for nitric oxide? *Biochem Soc Trans*, 23, 4, 1002-8, 1995.
17. Vincent J.L. : Endocrine support in the critically ill. *Crit Care Med*, 30, 702-3, 2002.
18. Wichterman K.A, Baue A.E, Chaudry I.H.: Sepsis and septic shock-A review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res*, 29, 2, 189-201, 1980.
19. Yelich M.R.: Glucoregulatory, hormonal, and metabolic responses to endotoxemia or cecal ligation and puncture sepsis in the rat: A direct comparison. *Circ Shock*, 31, 3, 351-63, 1990.

Primljeno: 25.06.2009.

Odobreno: 28.06.2009.