

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека»

На правах рукописи

Джалилова Джулия Шавкатовна

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ
ОСОБЕННОСТИ СИСТЕМНОЙ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ У
ЖИВОТНЫХ С РАЗНОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ГИПОКСИИ**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научные руководители

д.м.н., профессор О.В. Макарова

д.б.н. М.Е. Диатропов

Москва – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1 Гипоксия: определение, классификация, механизмы	15
1.1.1 Определение гипоксии.....	15
1.1.2 Классификация гипоксии.....	16
1.1.3 Метаболические механизмы гипоксии.....	21
1.1.4 Молекулярные механизмы гипоксии	24
1.1.5 Устойчивость к гипоксии	35
1.2 Воспаление	53
1.2.1 Ключевые молекулярные механизмы воспаления	53
1.2.2 Модель системной воспалительной реакции.....	55
1.3 Взаимосвязь гипоксии и воспаления	61
1.3.1 Индукция NF κ B воспалением.....	61
1.3.2 Индукция воспаления недостатком кислорода	64
1.3.3 Влияние активации NF κ B на воспалительный и иммунный ответ.....	68
1.3.4 Взаимосвязь полиморфизмов генов, отвечающих за адаптацию к гипоксии, с воспалительными процессами.....	78
Заключение к обзору литературы.....	81
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	83
2.1 Материалы исследования.....	83
2.1.1 Определение устойчивости к гипобарической гипоксии	83
2.1.2 Исследование взаимосвязи устойчивости к гипоксии и 4-суточного биоритма изменений концентрации кортикостерона	86
2.1.3 Исследование динамики молекулярно-биологических и биохимических показателей в ответ на острое гипоксическое воздействие у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар.....	88
2.1.4 Моделирование системной воспалительной реакции у крыс Вистар	88

2.2 Методы исследования	90
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	99
3.1 Взаимосвязь устойчивости к гипоксии крыс Вистар и Спрейг-Доули и 4-суточного биоритма изменений концентрации кортикостерона в сыворотке крови	99
3.1.1 Однократное и многократное (ежедневное) определение времени жизни крыс Вистар на критической «высоте».....	99
3.1.2 Определение устойчивости к гипоксии крыс Спрейг-Доули в акрофазу и батифазу инфрадианного биоритма содержания кортикостерона в сыворотке крови	104
3.2 Сравнительная характеристика динамики молекулярно-биологических и биохимических показателей у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс после гипоксического воздействия.....	108
3.2.1 Уровень экспрессии гена <i>Hif-1α</i> в печени и его содержание в сыворотке крови через 5 и 90 мин после гипоксического воздействия у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар.....	108
3.2.2 Уровень экспрессии гена <i>Vegf</i> в печени и содержание белка VEGF в сыворотке крови через 5 и 90 мин после гипоксического воздействия у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар.....	113
3.2.3 Содержание эритропоэтина в сыворотке крови через 5 и 90 мин после гипоксического воздействия у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар.....	117
3.2.4 Содержание 8-изопростана в сыворотке крови через 5 и 90 мин после гипоксического воздействия у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар.....	120
3.2.5 Уровень экспрессии гена <i>Nf-κb</i> в печени через 5 и 90 мин после гипоксического воздействия у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар.....	123
3.2.6 Содержание белка TGF- β в сыворотке крови через 5 и 90 мин после гипоксического воздействия у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар.....	126
3.3 Сравнительная характеристика морфологических изменений и молекулярно-биологических показателей у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар через один месяц после определения устойчивости к недостатку кислорода	129
3.3.1 Морфологическая характеристика легких и печени у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс через один месяц после определения устойчивости к недостатку кислорода	129

3.3.2 Показатели воспалительных маркеров у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс через один месяц после определения устойчивости к недостатку кислорода	132
3.3.3 Морфофункциональная характеристика тимуса и селезенки и субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс через один месяц после определения устойчивости к недостатку кислорода	134
3.4 Молекулярно-биологическая, биохимическая и морфологическая характеристика системной воспалительной реакции у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар	140
3.4.1 Морфологическое и морфометрическое исследование легких у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС	140
3.4.2 Морфологические изменения печени у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар контрольных групп и через 24 ч после введения ЛПС.....	144
3.4.3 Активность ферментов АСТ и АЛТ в сыворотке крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар контрольных групп и через 24 ч после введения ЛПС	147
3.4.4 Уровень эндотоксина в сыворотке крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС	148
3.4.5 Содержание С-реактивного белка в сыворотке крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар контрольных групп и через 24 ч после введения ЛПС	151
3.4.6 Уровень экспрессии гена <i>Nf-κb</i> в печени у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС	153
3.4.7 Уровень экспрессии гена <i>Hif-1α</i> в печени и содержание белка HIF-1α в сыворотке крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС.....	156
3.4.8 Уровень экспрессии гена <i>Vegf</i> в печени у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС	159
3.4.9 Содержание цитокинов IL-1β, IL-10, TGF-β у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС	161

3.4.10 Содержание кортикостерона в сыворотке крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС	168
3.5 Морфофункциональные различия иммунной системы у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС.....	171
3.5.1 Морфологическое исследование тимуса у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС	171
3.5.2 Морфометрическое исследование тимуса у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС	174
3.5.3 Определение числа апоптотически гибнущих клеток в тимусе у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС	178
3.5.4 Морфологическое исследование селезенки у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС	181
3.5.5 Морфометрическое исследование селезенки у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС	183
3.5.6 Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС	189
3.5.7 Содержание гранулоцитов в периферической крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар контрольных групп и через 24 ч после введения ЛПС	197
3.5.8 Определение фагоцитарной активности клеток периферической крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар контрольных групп и через 24 ч после введения ЛПС.....	198
3.5.9 Содержание неоптерина в сыворотке крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар контрольных групп и через 24 ч после введения ЛПС.....	201
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	204
4.1 Взаимосвязь устойчивости к гипоксии крыс Вистар и Спрейг-Доули и 4-суточного биоритма изменений концентрации кортикостерона в сыворотке крови	206

4.2 Сравнительная характеристика динамики молекулярно-биологических и биохимических показателей у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс после гипоксического воздействия.....	211
4.3 Сравнительная характеристика морфологических изменений и молекулярно-биологических показателей у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар через один месяц после определения устойчивости к недостатку кислорода	218
4.4 Молекулярно-биологические, биохимические показатели системной воспалительной и иммунной реакций, морфологические изменения легких, печени и органов лимфоидной системы у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар.....	223
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	243
ВЫВОДЫ.....	245
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	246
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	250

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Гипоксия, или кислородная недостаточность, играет важную роль в механизмах адаптации и многих патологических процессах – воспалении, опухолях, инфарктах и других. Адаптивная реакция организма на гипоксию определяется её выраженностью и скоростью развития, а также физиологическим состоянием организма и индивидуальной чувствительностью к кислородной недостаточности, которая во многом зависит от генотипа (Колчинская А.З., 1964; Березовский В.А., 1978; Казначеев В.П., 1980; Исхаки Ю.Б. и соавт., 1989; Burtscher M. et al., 2012; Serebrovskaya T.V. и Xi L., 2012; Azad P. et al., 2017; Luks A.M. et al., 2017). Генетическую детерминированность устойчивости к дефициту кислорода подтверждают данные о том, что существуют многочисленные полиморфизмы генов, регулирующих продукцию индуцируемого гипоксией фактора *HIF-1 α* (*Hypoxia-Inducible Factor-1 α*), фактора роста сосудистого эндотелия *VEGF* (*Vascular Endothelial Growth Factor*), супероксиддисмутазы *SOD2* (*Superoxide Dismutase 2*) и других (Lorenzo V.F. et al., 2009; De Carvalho Fraga C.A. et al., 2013; Kobayashi N. et al., 2013; Strauss E. et al., 2015; Koyasu S. et al., 2018). Чувствительность к гипоксии зависит от пола, возраста, наличия сопутствующих заболеваний и приема лекарственных средств, а также имеет сезонную и суточную ритмичность (Рафиков А.М. и Агаджанян Н.А., 1971; Чернобаева Г.Н. и Лукьянова Л.Д., 1989; Kwarecki K. et al., 1984; Masukawa T. и Tochino Y., 1993).

Проблема адаптации к кислородной недостаточности, ее роль в развитии заболеваний многие десятилетия изучается на моделях животных с разной устойчивостью к гипоксии. По данным многих авторов, как животные, так и люди отличаются по чувствительности к недостатку кислорода (Березовский В.А., 1978; Газенко О.Г., 1987; van Patot M.C. и Gassman M., 2011; Serebrovskaya T.V. и Xi L., 2012). Изучение гипоксии необходимо для понимания особенностей течения различных заболеваний, а также для профессионального отбора летчиков и космонавтов в авиационной и космической медицине. В биомедицинских исследованиях животные с разной устойчивостью к гипоксии используются при доклинической оценке эффективности лекарственных средств – антигипоксантов (Воронина Т.А., 2009; Зарубина И.В., 2011; Сосин Д.В. и соавт., 2015).

Гипоксия, с одной стороны, может инициировать развитие воспаления, а с другой – любой воспалительный процесс, особенно с выраженными системными проявлениями, сопровождается кислородной недостаточностью. Ключевой транскрипционный фактор, активирующийся при гипоксии – *HIF-1 α* , взаимосвязан с ядерным фактором *NF- κ B*, регулирующим воспаление (Kiers H.D. et al., 2016; Taylor C.T. и Colgan S.P., 2017; Fratantonio D. et al., 2018; Krzywinska E. и Stockmann C., 2018; Stothers C.L. et al., 2018). В проксимальной части промотера гена *HIF-1 α*

содержится NF-κB-связывающий сайт (Rius et al., 2008; van Uden et al., 2008). S. Frede et al. (2006) показали, что липополисахарид (ЛПС) вызывает NF-κB-зависимое повышение уровня мРНК и содержания белка HIF-1α (Frede S. et al., 2006), что, в свою очередь, может активировать NF-κB. Известно, что ингибиторы, способствующие убиквитин-зависимому разрушению HIF-1α, контролируют также активность киназного комплекса ИКК (IκB Kinase, киназа ингибитора NF-κB – IκB), отвечающего за регуляцию NF-κB (Cummins E.P. et al., 2006; Oliver K.M. et al., 2009; Hirota K., 2015).

Активация HIF-1α при воспалении в зависимости от типа клеток и тканей может оказывать как противовоспалительный, так и провоспалительный эффекты (Devraj G. et al., 2017). На модели острого колита у мышей показано, что повышение содержания белка HIF-1α снижает активность воспаления в толстой кишке. Дефицит HIF-1α у животных с колитом приводил к высокой смертности, а у выживших мышей – к его более тяжелым клиническим проявлениям (Karhausen J. et al., 2004). Напротив, при эндотоксинемии, индуцированной ЛПС, повышение продукции HIF-1α способствует увеличению содержания в сыворотке крови провоспалительных цитокинов (IL-1β, TNFα) и высокой смертности животных (Peyssonaux C. et al., 2007). J. Textoris et al. (2012) предполагают, что оценку уровня активации HIF-1α можно использовать в качестве потенциального прогностического маркера тяжести течения сепсиса (Textoris J. et al., 2012).

Известно, что в механизмах системной воспалительной реакции ключевую роль играет гипоксия, обусловленная, главным образом, нарушениями микроциркуляции и диссеминированным внутрисосудистым свертыванием (Муздубаева Б.Т., 2016; Cinel I. и Opal С.М., 2009). В связи с этим в отдельных исследованиях показано, что тяжесть течения системной воспалительной реакции и сепсиса зависит от устойчивости к гипоксии (Косырева А.М. и соавт., 2018; Holley H.S. et al., 2012). Поскольку молекулярно-биологические механизмы гипоксии и воспаления, реализуемые путями активации HIF-1α и NF-κB, тесно взаимосвязаны, устойчивость организма к кислородной недостаточности может быть одним из факторов, определяющим особенности механизмов развития и течения воспалительных и иммунных реакций.

Степень разработанности темы исследования

В течение многих десятилетий механизмы влияния недостатка кислорода на физиологические и биохимические процессы в организме изучались на животных с высокой и низкой устойчивостью к гипоксии (Колчинская А.З., 1964; Березовский В.А., 1978; Чернобаева Г.Н., Лукьянова Л.Д., 1989; Каркищенко Н.Н., 2017). Однако следует отметить, что существуют различия методических подходов к определению устойчивости животных к гипоксии (варьирует критическая «высота», критерий времени жизни на «высоте», вид и линия животных) и времени оценки показателей после гипоксического воздействия. По данным литературы, существует

суточная ритмичность чувствительности животных к недостатку кислорода: в вечерние и ночные часы время жизни в условиях гипобарической гипоксии меньше, чем в дневные (Рафиков А.М. и Агаджанян Н.А., 1971; Kwarecki K. et al., 1984; Masukawa T. и Tochino Y., 1993). Также известно, что существуют сезонные колебания устойчивости к гипоксии: минимальное количество низкоустойчивых особей зарегистрировано в осенне-зимний период, а максимальное – в летний (Чернобаева Г.Н. и Лукьянова Л.Д., 1989). М.Е. Диатроптовым и соавт. (2014) у млекопитающих и птиц был установлен инфрадианный 4-суточный биоритм концентрации глюкокортикоидных гормонов и связанные с ним колебания ряда физиологических показателей: двигательной активности, митотического индекса эпителия пищевода, субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови, морфофункционального состояния тимуса и селезенки (Диатроптов М.Е. и соавт., 2014). Показано, что *in vitro* глюкокортикоиды увеличивают экспрессию генов, ответственных за развитие адаптационных механизмов в ответ на гипоксию (Kodama T. et al., 2003). Однако в литературе отсутствуют данные о зависимости устойчивости к гипоксии от фазы инфрадианного 4-суточного биоритма кортикостерона. Вместе с тем изучение такой зависимости представляется актуальным, поскольку в исследованиях эффективности антигипоксантов и адаптации к гипоксии инфрадианные биоритмы не учитываются, что может влиять на результаты экспериментов.

В литературе отсутствуют сведения о каких-либо функциональных нарушениях у животных, подвергшихся воздействию критической гипоксии, поэтому срок проведения эксперимента после разделения животных на высокоустойчивых и низкоустойчивых варьирует: исследование проводят сразу (Ghosh D. et al., 2012; Jain K. et al., 2013), спустя час (Лукьянова Л.Д. и Богомолов В.И., 1992), неделю (Крыжановский Г.Н. и соавт., 1991; Kumar S. et al., 2014), две недели (Грек О.Р. и соавт., 2007) или месяц после воздействия (Свинов М.М. и соавт., 2001; Лукьянова Л.Д. и соавт., 2009; Лукьянова Л.Д. и Кирова Ю.И., 2011). Однако эти сроки авторами не обоснованы. В то же время, по данным О.В. Макаровой (1997), после многократного гипоксического воздействия газовой смесью, содержащей 10% O₂, у крыс Спрейг-Доули выявляется очаговая бронхопневмония. Поэтому вопрос о том, через какое время после определения устойчивости к гипоксии следует проводить экспериментальные исследования, остается открытым.

Известно, что высокоустойчивые и низкоустойчивые к гипоксии животные отличаются по многим параметрам, в частности, содержанию эритропоэтина, кортикостерона, норадреналина, ферментов антиоксидантной защиты и др. (Лукьянова Л.Д., 2003; Ghosh D. et al., 2012; Jain K. et al., 2013; Padhy G. et al., 2013; Jain K. et al., 2014). Данные об адаптивных возможностях животных, отличающихся по устойчивости к гипоксии, противоречивы, а исследования выполнены на разных линиях крыс и в разное время после гипоксической нагрузки, что

затрудняет возможность сравнительной оценки полученных авторами результатов. Поскольку по данным литературы низкоустойчивые к недостатку кислорода животные после гипоксического воздействия характеризуются большим уровнем окислительного повреждения клеток, можно предположить их высокую предрасположенность к развитию и тяжелому течению воспалительных заболеваний. Однако сведения об иммунных реакциях во многих аспектах – содержании в периферической крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии животных интерлейкинов, иммуноглобулинов и гормонов – противоречивы (Грек О.Р. и соавт., 2007; Кузина О.В. и соавт., 2014; Комелькова М.В., 2015; Сатурская А.С., 2015). Таким образом, в настоящее время установлены физиологические и биохимические различия, характеризующие высокоустойчивых и низкоустойчивых к кислородной недостаточности животных. Однако морфологические и молекулярно-биологические особенности течения воспалительных и иммунных реакций у животных с разной устойчивостью к гипоксии не изучены.

Цель исследования – охарактеризовать морфологические и молекулярно-биологические особенности индуцированной введением липополисахарида системной воспалительной реакции у половозрелых самцов крыс с разной устойчивостью к гипоксии.

Задачи исследования

1. Установить связь 4-суточного инфрадианного биоритма содержания кортикостерона в сыворотке крови с временем жизни крыс Вистар на критической «высоте» и с устойчивостью к гипоксии крыс Спрейг-Доули.
2. Определить динамику экспрессии генов индуцируемого гипоксией фактора *Hif-1 α* , транскрипционного фактора *Nf- κ b* и фактора роста эндотелия сосудов *Vegf* в печени у крыс Вистар в разные сроки после острого гипоксического воздействия.
3. Оценить в динамике изменения биохимических показателей – содержания 8-изопростана, эритропоетина, белков HIF-1 α , VEGF и TGF- β – в сыворотке крови у крыс Вистар в разные сроки после острого гипоксического воздействия.
4. Определить через месяц после острого гипоксического воздействия выраженность провоспалительных, противовоспалительных и иммунных реакций по морфологическим изменениям легких, печени, тимуса и селезенки, молекулярно-биологическим и биохимическим параметрам.
5. Выявить в динамике выраженность системной воспалительной реакции, индуцированной введением липополисахарида, по морфологическим изменениям легких и печени, молекулярно-биологическим и биохимическим параметрам у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар.

б. Исследовать морфологические изменения тимуса и селезенки, субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови при системной воспалительной реакции, индуцированной введением липополисахарида, у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар.

Объект и предмет исследования – животные с разной устойчивостью к гипоксии; оценка взаимосвязи устойчивости к гипоксии и инфранианного биоритма концентрации кортикостерона в сыворотке крови; молекулярно-биологические и биохимические изменения в организме у крыс с разной устойчивостью к гипоксии в динамике в ранние и отдаленные сроки после гипоксического воздействия; динамика изменений системных воспалительных и иммунных реакций у животных с разной устойчивостью к гипоксии.

Теоретической и методологической базой диссертации являются научные работы отечественных и зарубежных авторов в области изучения молекулярно-биологических механизмов взаимосвязи гипоксии и воспаления, физиологических, биохимических и молекулярно-биологических характеристик высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии животных, а также методические разработки определения устойчивости к гипоксии, инфраниантных биоритмов, моделирования системной воспалительной реакции с помощью введения липополисахарида.

Информационной базой исследования являются научные статьи в рецензируемых журналах, монографии, материалы конференций соответствующей научной тематики.

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология согласно пунктам 5, 6, 7.

Научная новизна

Впервые выявлена зависимость устойчивости к гипоксии от инфранианного биоритма содержания кортикостерона – в акрофазу его 4-суточного биоритма время жизни животных на критической «высоте» больше, чем в батифазу.

В ранние сроки после гипоксического воздействия только у низкоустойчивых к гипоксии крыс выявлены провоспалительные реакции, характеризующиеся увеличением содержания в сыворотке крови маркера окислительного стресса 8-изопростана и TGF- β , а через месяц после гипоксической нагрузки отмечается повышенная экспрессия генов *Hif-1 α* и *Vegf* в печени и функциональная активация иммунной системы.

В ответ на введение ЛПС высокоустойчивые и низкоустойчивые к гипоксии животные характеризуются разнонаправленными провоспалительными, противовоспалительными и иммунными реакциями:

– низкоустойчивые к гипоксии крысы по сравнению с высокоустойчивыми демонстрируют более выраженные провоспалительные реакции, характеризующиеся повышенной экспрессией *Hif-1 α* и *Nf- κ b*, большей площадью некрозов в печени и количеством нейтрофилов в легких, а также повышенным содержанием в сыворотке крови IL-1 β и эндотоксина;

– противовоспалительные реакции у низкоустойчивых к гипоксии крыс реализуются за счет повышения содержания кортикостерона в сыворотке крови, а у высокоустойчивых – снижения продукции цитокинов IL-10 и TGF- β ;

– в исследованные сроки у высокоустойчивых к гипоксии животных отмечается активация преимущественного врожденного и клеточного иммунитета – у них выявлены увеличение содержания в периферической крови цитотоксических Т-лимфоцитов и NK клеток, но снижение – В-лимфоцитов. У низкоустойчивых к гипоксии крыс баланс иммунных реакций смещается в сторону гуморальных, что характеризуется сужением коркового вещества тимуса, активацией В-зоны селезенки, увеличением содержания В-лимфоцитов в периферической крови.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Полученные в исследовании данные расширяют представления о молекулярно-биологических механизмах развития системной воспалительной реакции у крыс с разной устойчивостью к гипоксии: у низкоустойчивых животных выше число нейтрофилов в легких, экспрессия *Hif-1 α* и *Nf- κ b*, больше площадь некрозов в печени, содержание эндотоксина, IL-1 β и С-реактивного белка в сыворотке крови. В ответ на введение ЛПС у высокоустойчивых к гипоксии крыс наблюдается смещение баланса иммунных реакций в сторону клеточных, в то время как у низкоустойчивых – гуморальных. Важным методическим аспектом работы является выявление зависимости устойчивости к гипоксии от 4-суточного инфрадианного биоритма концентрации кортикостерона в сыворотке крови. Полученные данные о молекулярно-биологических и морфологических особенностях реакции на острое гипоксическое воздействие обосновывают сроки проведения экспериментальных исследований на животных после определения устойчивости к гипоксии.

Данные о структурных и молекулярно-биологических различиях в норме и при индуцированной ЛПС системной воспалительной реакции у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс послужат основой для разработки новых персонализированных подходов к профилактике и лечению инфекционных и воспалительных заболеваний человека. Полученные результаты по взаимосвязи устойчивости к гипоксии и инфрадианного биоритма концентрации кортикостерона, а также сроках проведения экспериментов после гипоксического воздействия необходимо учитывать при проведении исследований по изучению чувствительности к недостатку кислорода в авиационной и

космической медицине, доклинической оценке эффективности антигипоксантов и антиоксидантов.

Методология и методы исследования

Методологически работа построена на принципах системного анализа комплекса данных. В работе использованы следующие методы: определение устойчивости животных к гипоксии в барокамере, моделирование системной воспалительной реакции, проточная цитофлуориметрия, иммуноферментный анализ, полимеразная цепная реакция в реальном времени, гистологические, биохимические, культуральные, морфометрические и статистические методы.

Положения, выносимые на защиту

1. Установлено, что низкоустойчивые к гипоксии крысы по сравнению с высокоустойчивыми в ответ на введение липополисахарида демонстрируют более выраженные провоспалительные и противовоспалительные реакции. Системная воспалительная реакция у низкоустойчивых к гипоксии крыс сопровождается смещением баланса иммунных реакций в сторону гуморальных, а у высокоустойчивых – клеточных.
2. Выявлена зависимость устойчивости к гипоксии от инфрадианного биоритма кортикостерона: в акрофазу его 4-суточного биоритма время жизни животных на «высоте» больше, чем в батифазу.
3. В ранние сроки – через 90 мин после гипоксического воздействия – только у низкоустойчивых к гипоксии крыс увеличивается содержание в сыворотке крови TGF- β и маркера окислительного стресса 8-изопростана.
4. В отдаленный срок – через месяц после гипоксического воздействия – по данным морфологического исследования у животных отсутствуют воспалительные изменения в легких и печени, только у низкоустойчивых к гипоксии крыс по сравнению с высокоустойчивыми обнаружена повышенная экспрессия генов *Hif-1 α* и *Vegf* в печени и функциональная активация иммунной системы.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов обоснована достаточным количеством экспериментальных групп и объемом данных для каждой из них, воспроизводимостью результатов, использованием современных адекватных поставленной цели методов исследования, корректным применением статистических методов, критическим анализом полученных результатов в сопоставлении с актуальными литературными данными.

Материалы диссертации доложены на XXIII Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии и биохимии – 2017» (Санкт-Петербург, 2017), Международной конференции «PhD Scientific Days 2017» (Будапешт,

Венгрия, 2017), XXIII Съезде физиологического общества им. И.П. Павлова (Воронеж, 2017), Всероссийской конференции молодых специалистов «Актуальные вопросы фундаментальной, экспериментальной и клинической морфологии» (Рязань, 2017), XXIV Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2018» (Санкт-Петербург, 2018), научной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2018), XV Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2019» (Санкт-Петербург, 2019), XVIII Конференции молодых ученых, специалистов и студентов (Москва, 2019).

Личное участие автора заключалось в планировании и проведении экспериментов, обобщении и анализе полученных результатов, статистической обработке данных, подготовке публикаций.

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 13 научных работ, в том числе 5 статей в журналах, входящих в Перечень РФ рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и ученой степени доктора наук.

Внедрение результатов работы. Основные результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 295 страницах машинописного текста и состоит из глав: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов исследования, заключение, выводы, список сокращений и условных обозначений, список литературы, включающий 100 российских и 492 зарубежных источника. Работа иллюстрирована 65 таблицами и 58 рисунками.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Гипоксия: определение, классификация, механизмы

1.1.1 Определение гипоксии

Кислород, появившийся в атмосфере Земли примерно 2,5 миллиарда лет назад, играет жизненно важную роль в метаболизме эукариотических клеток как конечный акцептор электронов в митохондриальной электрон-транспортной цепи, которая ответственна за генерирование энергии в виде АТФ (Farquhar J. et al., 2000; Lyons T.W. et al., 2014; Fratantonio D. et al., 2018). Достаточное снабжение кислородом клеток и тканей является неотъемлемым условием для нормального функционирования организма. Нарушение баланса между потребностью в кислороде и его доставкой приводит к развитию гипоксии и, таким образом, представляет значительную угрозу биоэнергетическому гомеостазу и выживанию клеток. Термин «гипоксия» (*hypoxia*) происходит от греческого *hypo* – «ниже» и латинского *oxygenium* – «кислород» и означает недостаточное снабжение тканей организма O_2 или нарушение его утилизации в процессе биологического окисления.

Проблема недостатка кислорода является одной из фундаментальных в современной биологии и медицине. Интерес к гипоксии как типовому патологическому процессу, возникающему и сопровождающему животных и человека на протяжении всей жизни, существует уже сотни лет. Характерная особенность различных гипоксических состояний заключается в том, что они являются важным патогенетическим механизмом практически любого заболевания. Как известно, гипоксия определяет развитие ишемического поражения сердца, головного мозга, формирование полиорганной недостаточности при синдроме диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС-синдроме), является неизменным спутником шоковых и коллаптоидных состояний, заболеваний инфекционной и неинфекционной природы, а также стрессовых воздействий (Чеснокова Н.П. и соавт., 2006; Грек О.Р. и соавт., 2007; Semenza G.L., 2014; Luks A.M. et al., 2017). Следует отметить, что решение проблемы старения, стрессовых нагрузок, работоспособности, общей устойчивости организма связано с устранением гипоксических состояний и их последствий, со снижением чувствительности организма к этим состояниям.

На уровне моря атмосферное давление составляет 101,3 кПа, или 760 мм рт.ст. Это среднее теоретическое значение, которое не является постоянным, поскольку как незначительные изменения силы тяжести, так и, что более важно, фактические погодные условия могут немного влиять на это значение. Нормоксией называют условия, при которых 20,9%, или 159 мм рт.ст. общего атмосферного давления составляет парциальное давление O_2 (pO_2) (Hodkinson P.D., 2011;

Wenger R.H. et al., 2015; Avellanas Chavala M.L., 2018). С увеличением высоты барометрическое давление и pO_2 уменьшаются, что способствует возникновению гипобарической гипоксии (Burtscher M. et al., 2012). В организме нормоксией называют состояние, при котором концентрация (напряжение) кислорода в окружающей клетку среде достигает 85-90 мм рт.ст., при этом к гипоксии относят более низкие концентрации O_2 . Понятия эти условны, поскольку некоторые ткани в норме пребывают в условиях, так называемой, физиологической гипоксии, которая не рассматривается как патологическая (Солкин А.А. и соавт., 2012; Андреева Е.Р. и соавт., 2016; Carreau A. et al., 2011; Koh M.Y. и Powis G., 2012). Организм человека ежедневно испытывает воздействие физиологической гипоксии, которая может формироваться, например, в скелетной мускулатуре при интенсивной мышечной работе, в нервной ткани головного мозга при значительном умственном напряжении, а также в печени, почках, органах желудочно-кишечного тракта при чрезмерном усилении их физиологической активности (Березовский В.А., 1975; Лисянская О.Ю., 2016; Carreau A. et al., 2011). При физиологической гипоксии изменения активности органов и тканей носят кратковременный и обратимый характер. Патологическая гипоксия, которая вызывает развитие различных нарушений в функционировании организма, обусловлена воздействием нескольких факторов, и может быть классифицирована на множество типов.

1.1.2 Классификация гипоксии

Доставка кислорода в организм зависит от его содержания во вдыхаемом воздухе, диффузии через аэрогематический барьер, вентиляции альвеол и кровоснабжения их стенок, скорости насыщения гемоглобина кислородом, формы и положения кривой диссоциации оксигемоглобина, плотности сети микрососудов, потребления O_2 клеткой или тканью и других факторов. Изменение или нарушение любых из этих условий или их комбинаций может вызвать недостаток кислорода в тканях и стать причиной энергодефицита.

Классификация гипоксии основана на ее полиэтиологичности. В настоящее время существует несколько классификаций гипоксических состояний в зависимости от источника дефицита O_2 , однако следует отметить, что ключевыми особенностями гипоксии, вне зависимости от ее происхождения, являются недостаточность биологического окисления и энергии. Одну из первых классификаций гипоксии предложил J. Barcroft (1920), она основывалась на изменении свойств и структуры гемоглобина. Затем Н.Н. Сиротининым (1939) была создана этиопатогенетическая классификация. В 1941 г. К. Виггерс предложил различать два состояния – гипоксию (снижение содержания кислорода во вдыхаемом воздухе) и аноксию (чрезвычайно низкое напряжение O_2 – менее 80 мм рт.ст.). Большой популярностью долгое время также пользовалась предложенная J.P. Peters и D.D. van Slyke (1932) классификация, принятая на

конференции в Киеве в 1949 г.: гипоксические состояния разделили на 4 типа (гипоксическая гипоксия, гемическая гипоксия, циркуляторная гипоксия и тканевая гипоксия). Эти классификации были построены на едином принципе, однако не учитывали внешние экологические факторы антропогенного происхождения и патологические процессы (Колчинская А.З., 1964).

В настоящее время иностранные авторы различают 4 основных типа гипоксии (Carrier В., 2006):

1. Гипоксическая гипоксия возникает при дефиците кислородного обмена в легких: при уменьшении парциального давления кислорода, доступного на высоте, и при состояниях, когда блокируется обмен на уровне альвеолярных капилляров (пневмонии, отеке легких, бронхиальной астме и др.)
2. Анемическая гипоксия развивается при неспособности организма транспортировать доступный O_2 к тканям, например, при постгеморрагических анемиях, отравлении угарным газом и др.
3. Постоянная (хроническая) гипоксия обусловлена недостаточным током крови и уменьшением ее циркулирующего объема из-за сердечной недостаточности и др.
4. Гистотоксическая гипоксия возникает при неспособности тканей использовать поступающий кислород. Такая гипоксия не является истинной, поскольку уровни оксигенации ткани могут быть выше нормальных. Этот тип гипоксии возникает при отравлениях цианидами, алкоголем и наркотиками.

В России наиболее широко распространена классификация гипоксии, предложенная Н.А. Агаджаняном и А.Я. Чижовым в 2003 г. Она основывается на фундаментальных исследованиях в области физиологии гипоксических состояний, проведенных как отечественными, так и зарубежными исследователями. Согласно этой классификации различают 3 вида гипоксии: экзогенная, эндогенная и тканевая (биоэнергетическая). Экзогенная гипоксия развивается в результате действия различных факторов внешней среды, эндогенная – при физиологических и патологических изменениях в функциональных системах организма. Биоэнергетическая (тканевая) гипоксия является конечным звеном любого вида гипоксии и возникает при нарушениях способности тканей утилизировать кислород крови.

Существует множество подвидов этих трех гипоксических состояний. Экзогенную гипоксию разделяют на несколько типов.

1. Гипоксическая гипоксия – возникает при уменьшении содержания кислорода в окружающем воздухе, затруднении его поступления в легкие, а также при нарушении альвеолярной вентиляции. Это приводит к снижению содержания O_2 в крови, недостаточному насыщению

кислородом гемоглобина и тканей, и как следствие, к нарушению биологического окисления. В зависимости от давления, гипоксическая гипоксия может быть:

А) нормобарической, когда при нормальном барометрическом давлении понижено содержание кислорода, возникает при работе в шахтах и длительном пребывании в помещениях малого объема (Burtscher M. et al., 2012). Патогенетической основой нормобарической гипоксической гипоксии является умеренное увеличение напряжения углекислого газа (CO_2) в артериальной крови (гиперкапния) и снижение pO_2 в ней (гипоксемия);

Б) гипербарической, развивающейся при длительных глубоководных погружениях, когда атмосферное давление повышено, но снижено pO_2 во вдыхаемом воздухе;

В) гипобарической, при общем снижении барометрического давления, в частности:

1) барокамерной, которая развивается в горах (горная болезнь), а также при «подъеме» в барокамере на «высоту» около 2500 м и выше в результате разряжения атмосферного воздуха и снижения в нем pO_2 ,

2) высотной гипоксией, которая возникает при подъеме на высоту в летательных аппаратах без специального оборудования (высотная болезнь).

Гипобарическая гипоксия, которая возникает при увеличении высоты и характеризуется уменьшением pO_2 , что, в свою очередь, приводит к меньшей доступности кислорода в атмосфере, оказывает существенное влияние на функциональное состояние организма людей, живущих на высоте постоянно или путешествующих в горы. Такая гипоксия часто является причиной различных патофизиологических состояний: ишемии, острой горной болезни, отека легких, мозга и других (Зарубина И.В., 2011; Hodkinson P.D., 2011; Burtscher M. et al., 2012; Luks A.M. et al., 2017). Большинство исследований, посвященных изучению недостатка O_2 , проводится на моделях, воспроизводящих условия гипобарической гипоксической гипоксии, путем управляемого откачивания воздуха из барокамер, в которые помещают добровольцев, пилотов, космонавтов или экспериментальных животных (Газенко О.Г., 1987; Почуев В.И., 2007; Каркищенко Н.Н., 2017; Jain K. et al., 2013, 2014; Coppel J. et al., 2015). В ее патогенезе важную роль играет снижение pO_2 в артериальной крови (гипоксемия) и напряжения в ней углекислого газа (гипокапния) вследствие компенсаторной гипервентиляции легких. Она возникает рефлекторно в ответ на раздражение дефицитом кислорода хеморецепторов аорты и каротидных синусов. При гипервентиляции возникает дыхательный алкалоз вследствие усиленного выведения углекислого газа. Снижение напряжения CO_2 в альвеолярном воздухе резко повышает чувствительность к нему дыхательного центра, в результате чего гипервентиляция сохраняется даже при значительном снижении его содержания в крови (Ainslie P.N. et al., 2007; Lopez-Barneo J. et al., 2016).

Важное практическое значение для понимания процессов адаптации в горах имеет их высота, так как с этим тесно связано влияние на организм факторов высокогорья и, в первую очередь, pO_2 воздуха. Если на уровне моря атмосферное давление равно 760 мм рт.ст., а pO_2 в атмосферном воздухе – 159 мм рт.ст., то на уровне 1000-1500 м эти показатели составляют 674 и 140, а на 4000 м – 460 и 96 мм рт.ст., соответственно (Avellanas Chavala M.L., 2018). Реакция организма на уменьшение барометрического давления определяется скоростью, степенью и продолжительностью его снижения, а также физиологическим состоянием организма и индивидуальной чувствительностью к кислородной недостаточности, которая во многом определяется генотипом (Исхаки Ю.Б. и соавт., 1989; Patel S. и Peacock A., 2001; Burtcher M. et al., 2012; Serebrovskaya T.V. и Xi L., 2012; Azad P. et al., 2017; Luks A.M. et al., 2017).

Выделяют несколько степеней гипоксической гипоксии: латентную (скрытую), компенсированную, субкомпенсированную, декомпенсированную, терминальную (Чеснокова Н.П. и соавт., 2006).

Латентная (скрытая) гипоксия развивается при снижении pO_2 во вдыхаемом воздухе не более чем на 35 мм рт.ст. (высота над уровнем моря 600-900 м), напряжения кислорода в артериальной крови не более чем на 15-20 мм рт.ст., при этом насыщение артериальной крови кислородом составляет не менее 90-98%. Заметных изменений состояния организма не наблюдается, отмечается лишь ускоренный темп речи и движений, некоторые признаки возбуждения (эйфория).

Компенсированная гипоксия наблюдается при остром снижении pO_2 во вдыхаемом воздухе до 140-100 мм рт.ст. (высота над уровнем моря 1500-3500 м). Скорость поступления кислорода в легкие и альвеолы, доставки его артериальной кровью к тканям и потребления не снижаются. Функции компенсаторных механизмов при такой гипоксии эффективны, она считается безопасной для организма (Burtcher M. et al., 2012; Avellanas Chavala M.L., 2018).

Субкомпенсированная гипоксия наблюдается у неадаптированных лиц при снижении pO_2 во вдыхаемом воздухе до 90-70 мм рт.ст. (высота более 3500, но менее 4800 м над уровнем моря). Уменьшается скорость поступления кислорода в легкие и альвеолы, но возрастает скорость его транспорта артериальной и венозной кровью вследствие увеличения минутного объема кровообращения.

Декомпенсированная гипоксия наблюдается при снижении pO_2 во вдыхаемом воздухе до 60 мм рт.ст. (высота над уровнем моря более 5000 м). Нарушаются функции приспособительных механизмов, тканевая гипоксия становится генерализованной, дыхание и пульс редкими, возможны судороги с потерей сознания (гипоксическая кома).

Терминальная гипоксия развивается при снижении pO_2 во вдыхаемом воздухе ниже 40 мм рт.ст. («высота» в барокамере 9000-11000 м), появляются патологические типы дыхания,

нарушается сердечная деятельность, выражена генерализованная тканевая гипоксия, наступает агония.

2. Гипероксическая гипоксия – возникает при повышенном содержании O_2 , но его пониженном транспорте кровью и скорости потребления тканями. Она может быть:

А) гипербарической – при продолжительном вдыхании чистого O_2 в условиях повышенного барометрического давления (при гипербарической оксигенации);

Б) гипобарической – возникает у людей, находящихся в обитаемых отсеках космических станций, подводных лодок при снижении барометрического давления воздуха в условиях поддержания высокого процентного содержания в нем O_2 ;

В) нормобарической – как осложнение кислородной терапии при длительном использовании высоких концентраций O_2 , особенно у пожилых людей.

Патогенетической основой развития гипоксии экзогенного типа является артериальная гипоксемия, а иногда и гипокапния, образующаяся в результате компенсаторной гипервентиляции легких, приводящая к нарушениям кислотно-щелочного баланса и развитию газового алкалоза.

Эндогенная гипоксия развивается при нарушении доставки кислорода и его утилизации тканями организма. Такие гипоксии классифицируют по этиологическому фактору на физиологическую, респираторную, гемическую, циркуляторную (сердечно-сосудистую), гиперметаболическую. Цитотоксическая (тканевая, биоэнергетическая) гипоксия возникает вследствие нарушения утилизации тканями кислорода при снижении активности ферментов дыхательной цепи (Лукьянова Л.Д., 1997). Данный вид является конечным этапом всех разновидностей гипоксии.

Помимо этого, по скорости развития гипоксию делят на:

– молниеносную (быстрая потеря сознания и прекращение жизненно важных функций организма, происходит при полном отсутствии O_2 в течение нескольких десятков секунд);

– острую, при которой гипоксические проявления возникают в течение нескольких минут. К такой гипоксии условно относят все случаи значительного и быстрого снижения pO_2 в окружающей газовой среде, в результате которого через относительно небольшой срок у здоровых, но ранее не адаптированных к гипоксии людей возникают патологические состояния различной тяжести. Такие ситуации наблюдаются на высотах 4000–5000 м и выше после быстрых подъемов или после внезапного прекращения подачи O_2 во время высотных полетов.

Также выделяют подострую гипоксию, действующую в течение нескольких часов, и хроническую, когда организм дни, месяцы или годы находится в условиях дефицита кислорода. Вследствие острой гипоксии при подъеме в горы возникает высотная болезнь, хронической – горная болезнь.

В биомедицинских исследованиях обычно моделируются несколько видов гипоксии: гипобарическая (связанная с изменением барометрического давления вдыхаемого воздуха); нормобарическая (связанная с понижением процентного содержания O_2 во вдыхаемом воздухе за счет изменения его газового состава при нормальном давлении), изоляционная гиперкапническая (связанная со снижением содержания кислорода в рециркулирующей воздушной смеси из-за его поглощения при дыхании и с повышением парциального давления CO_2 за счет накопления во вдыхаемом воздухе), анемическая (вызванная массивным кровотечением) и цитотоксическая (связанная с блокадой работы цитохромового каскада переноса электронов). Наиболее часто используется моделирование в барокамере экзогенной гипобарической гипоксии у мелких лабораторных животных (Каркищенко Н.Н., 2017).

Выделение отдельных типов гипоксии весьма условно, поскольку любое гипоксическое состояние – сложный комплекс ответных реакций на гипоксический стимул, в который включены все функциональные системы организма, и в медицине наиболее часто встречаются сочетания различных форм гипоксии, которые формируют смешанный тип, приводящий к тяжелым последствиям. В каждом конкретном случае необходимо учитывать возрастные, половые, индивидуальные особенности организма, а также пространственно-временные и климатические характеристики (Агаджанян Н.А. и Чижов А.Я., 2003; Burtcher M. et al., 2012).

Таким образом, реакция организма на гипоксию представляет собой комплекс процессов и зависит от ее продолжительности и тяжести, но при различных типах гипоксии патогенетические последствия для органов и систем сходны и зависят от индивидуальной устойчивости к дефициту O_2 . Независимо от причины, развитие гипоксии происходит следующим образом: снижение содержания кислорода в окружающей среде приводит к уменьшению pO_2 в альвеолярном воздухе и артериальной крови, а при недостаточности компенсаторных механизмов – к снижению скорости переноса O_2 кровью. Уменьшение скорости поэтапного переноса кислорода к тканям обуславливает падение его напряжения в крови и тканях до уровней ниже критических, то есть таких, при которых начинает снижаться скорость потребления O_2 в тканях и развивается вторичная тканевая гипоксия. Экзогенная гипобарическая гипоксия, в зависимости от степени снижения барометрического давления, может приводить к нарушениям функциональных систем организма различной выраженности. Состояние острой гипобарической гипоксии искусственно инициируют путем управляемого откачивания воздуха из барокамер, при этом индивидуальный порог чувствительности к недостатку O_2 варьирует у разных организмов.

1.1.3 Метаболические механизмы гипоксии

Исследованию механизмов гипоксии посвящено большое количество работ, описано её влияние на различные системы и органы: головной мозг, сердце, легкие, почки и другие (West

J.B., 2006; Hodkinson P.D., 2011; Netzer N. et al., 2013; Bhagi S. et al., 2014; Semenza G.L., 2014; Azad P. et al., 2017; Luks A.M. et al., 2017).

Главным патогенетическим звеном при кислородном голодании тканей любой природы является дефицит энергии в клетках. В основе энергообеспечения клеток лежит тканевое дыхание, происходящее на внутренней мембране митохондрий и заключающееся в многоэтапном переносе электронов от субстрата к кислороду, который восстанавливается до воды. Одновременно транспортируются протоны, что способствует формированию разности потенциалов на мембране и синтезу АТФ (окислительное фосфорилирование). Таким образом, митохондрии являются главной мишенью гипоксии в клетках, поскольку их цитохромоксидаза обеспечивает восстановление более 90% всего потребляемого O_2 в организме человека (Скулачев В.П., 2001; Лукьянова Л.Д., 2003; Lukyanova L.D. и Kirova Y.I., 2015). Дефицит кислорода – акцептора электронов в дыхательной цепи, приводит к глубокому подавлению биоэнергетической функции митохондрий. Недостаточность систем энергообразования в клетке составляет патогенетическое звено многих заболеваний. Поддержание жизнедеятельности в экстремальных условиях возможно до тех пор, пока дефицит энергии не достигнет критических величин. Истощение энергетических резервов ниже допустимого уровня сопровождается развитием необратимых процессов в клетке и гибелью организма (Michiels C., 2004; Kumar H. и Choi D.K., 2015; McGarry T. et al., 2018).

Недостаток кислорода, блокада дыхательной цепи и разобщение окислительного фосфорилирования приводят к формированию дефицита АТФ и креатинфосфата. В качестве компенсаторного механизма индуцируется гликолиз, однако это не ликвидирует возникший энергетический дефицит. Активация гликолиза – временный процесс, который прекращается в связи с накоплением лактата и снижением pH. Соответственно, недостаток АТФ приобретает более выраженный и прогрессирующий характер (Фролов Б.А., 2012; Palmer V.F. и Clegg D.J., 2014; McGarry T. et al., 2018).

Помимо угнетения гликолиза после его временной активации в клетке происходит ингибирование и других метаболических путей из-за накопления в митохондриях восстановленных кофакторов (НАДН и ФАДН), поскольку их переход в окисленную форму (НАД и ФАД) в условиях блокады транспорта электронов в дыхательной цепи оказывается невозможным. Снижение содержания окисленных форм данных кофакторов определяет угнетение активности митохондриальных дегидрогеназ, что тормозит цикл трикарбоновых кислот и β -окисление жирных кислот. Этот ранний и еще обратимый этап патологических изменений клеток определяется как «стадия ингибирования основных метаболических путей» (Меерсон Ф.З., 1984; Palmer V.F. и Clegg D.J., 2014).

Эти процессы приводят к нарушениям мембранного транспорта, процессов биосинтеза, избытку кальция в клетке, что представляет для нее опасность и рассматривается как один из ключевых механизмов клеточной гибели (Сороковой В.И., 1984; Чеснокова Н.П. и соавт., 2006; Michiels C., 2004). Патогенетические последствия выраженного избытка кальция в цитоплазме проявляются повреждением клеточных мембран, которое регулируется различными механизмами, в частности, активацией перекисного окисления липидов (ПОЛ), инициируемого накоплением в гипоксической клетке активных форм кислорода (АФК). Генерация АФК происходит из-за кальций-зависимого повреждения митохондрий и формирования избытка доноров электронов – восстановленных кофакторов (Wheaton W.W. и Chandel N.S., 2011; Lukyanova L.D. и Kirova Y.I., 2015; Fratantonio D. et al., 2018). Таким образом, повреждающее действие гипоксии усугубляется лавинообразным накоплением недоокисленных продуктов с появлением высокотоксичных свободных радикалов. Продукты ПОЛ, разрушая мембраны (в том числе – митохондриальные), усугубляют нарушения энергетического обмена, создавая тем самым порочный круг гипоксического повреждения (Avellanas Chavala M.L., 2018).

Иницируемые активными формами кислорода свободнорадикальные реакции приводят к повреждению клеточных и субклеточных структур, включая митохондрии, молекулы ДНК и белков. Активация ПОЛ приводит к дезорганизации липидного бислоя мембран, что характеризуется нарастающей утратой их барьерной и матричной функций, вплоть до разрушения лизосом, и определяет переход обратимых изменений в клетке в необратимые (Tafari M. et al., 2016). Одним из маркеров окислительного стресса является изомер простагландина F₂-8-изопростан, образование которого происходит при гипоксии и свободнорадикальном окислении фосфолипидов клеточных мембран (Czacowski J.L. et al., 2000; Wang J.-S. и Liu H.-S., 2009; van't Erve T.J et al., 2017). Являясь продуктом метаболизма арахидоновой кислоты, 8-изопростан может служить надежным маркером уровня окислительного стресса в организме. Его содержание повышается при различных заболеваниях, связанных с окислительным повреждением, и у курильщиков (Morrow J.D. et al., 1990; Roberts L.J. и Morrow J.D., 2002). Далее формируются нарушения клеточных структур, непосредственно приводящие к гибели клетки и развитию повреждения тканей и органов (Слепнева Л.В. и Хмылова Г.А., 2013).

Таким образом, гипоксия, независимо от механизмов ее развития, обеспечивает запуск каскада последовательных реакций: 1) уменьшение содержания O₂ в тканях, 2) снижение внутриклеточного АТФ и формирование энергодифицита; 3) ингибирование основных метаболических путей, увеличение содержания внутриклеточного кальция; 4) активация мембранных фосфолипаз и ПОЛ; 5) снижение электрической стабильности мембран; 6) увеличение ионной проницаемости мембран; 7) разобщение тканевого дыхания и фосфорилирования; 8) гибель клеток от недостатка энергии (Чеснокова Н.П. и соавт., 2006;

Фролов Б.А., 2012). Центральным звеном патогенеза этих процессов является повышение внутриклеточной концентрации ионов кальция, а главной мишенью – клеточные мембраны и митохондрии (McGarry T. et al., 2018). Последовательность этих изменений при гипоксии одинакова для различных тканей. Различие состоит лишь в скорости протекания этих процессов: с наибольшей быстротой они происходят в ткани мозга, с меньшей – в печени, с еще более низкой скоростью – в мышечной ткани. Степень повреждения митохондриального метаболизма в условиях выраженной гипоксии определяет тяжесть многих патологических состояний, и может приводить к гибели организма (Слепнева Л.В. и Хмылова Г.А., 2013; Seppet E. et al., 2009; Lukyanova L.D. и Kirova Y.I., 2015).

Для коррекции доставки O_2 тканям и его утилизации клетками организма в условиях его дефицита, применяют антигипоксанты – лекарственные средства, основные эффекты и механизмы действия которых направлены на повышение переносимости гипоксии. При этом в организме существуют механизмы, способствующие приспособлению к кислородной недостаточности разной степени выраженности и продолжительности (Воронина Т.А., 2009; Зарубина И.В., 2011; Левченкова О.С. и Новиков В.Е., 2011; Сосин Д.В. и соавт., 2015).

Адаптация к недостатку кислорода и питательных веществ – эволюционно консервативный процесс. Уровни O_2 в организме постоянно контролируются системой рецепторов газового состава, в ответ на изменение условий происходит перепрограммирование экспрессии генов таким образом, что активируются гены адаптации. В 1992 г. G.L. Semenza и G.L. Wang открыли индуцируемый гипоксией фактор HIF (Hypoxia-Inducible Factor), который регулирует ответ на недостаток кислорода (Semenza G.L. и Wang G.L., 1992).

1.1.4 Молекулярные механизмы гипоксии

1.1.4.1 Структура гена и белка фактора, индуцируемого гипоксией

Гипоксия, или недостаток кислорода, является важным физиологическим стимулом для многоклеточных организмов. На молекулярном уровне дефицит O_2 индуцирует транскрипционную программу, направленную на поддержание кислородного гомеостаза и выживание клеток. Адаптация к низкому содержанию O_2 в клетках и тканях требует активации генов, принимающих участие в ангиогенезе, клеточной пролиферации, метаболизме глюкозы и железа. В клетках эукариот ключевым компонентом, ответственным за регуляцию молекулярного ответа на гипоксию, является семейство транскрипционных факторов HIFs (Hypoxia-Inducible Factors, гипоксией-индуцируемые факторы, Bardos J.I. и Ashcroft M., 2005; Kenneth N.S. и Rocha S., 2008; Semenza G.L., 2012; Hashimoto T. и Shibasaki F., 2015; Ratcliffe P. et al., 2017; Chen R. et al., 2018; Koyasu S. et al., 2018). HIF-1 был впервые описан как фактор, регулирующий экспрессию эритропоэтина (Erythropoietin, EPO) в ответ на низкое содержание

кислорода в крови (Semenza G.L. и Wang G.L., 1992). Он представляет собой гетеродимер (рис. 1), состоящий из конститутивно экспрессирующейся HIF-1 β (ARNT, Aryl Hydrocarbon Nuclear Receptor Translocator, ядерный транслокатор арильного углеводородного рецептора) субъединицы и одной из регулируемых кислородом изоформ α -субъединиц (HIF-1 α , HIF-2 α или HIF-3 α) (Wang G.L. et al., 1995; Ratcliffe P. et al., 2017; Fratantonio D. et al., 2018; Stothers C.L. et al., 2018).

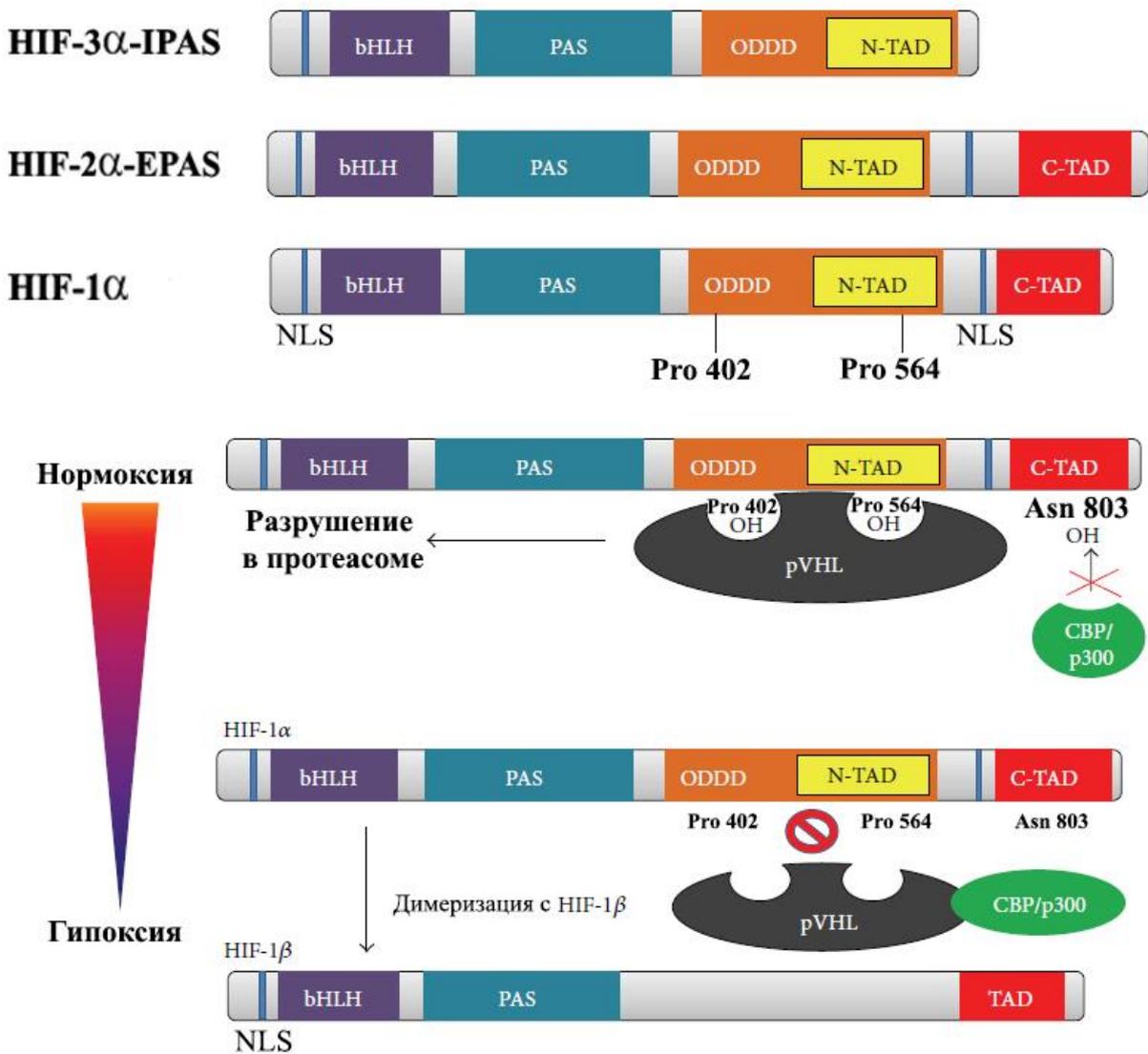


Рис. 1. Структура молекулы HIF-1 и его димеризация при гипоксии (по A. Zimna и M. Kurpisz, 2015, в модификации). Asn – остаток аспарагина, bHLH – Basic-Helix-Loop-Helix домен, CBP/p300 – CREB (cAMP-Response Element-Binding Protein)-Binding Protein/E1A Binding Protein p300, HIF – индуцируемый гипоксией фактор, NLS – сигнал ядерной локализации (Nuclear Localization Signal), N-TAD/C-TAD – N- и C-концевые домены транскрипционной активности (N- and C-terminal Transcriptional Activity Domains), ODDD – домен кислород-зависимой деградации (Oxygen-Dependent Degradation Domain), PAS – Per-Arnt-Sim домен, Pro – остаток пролина, pVHL – E3-убиквитин-лигазный комплекс Гиппеля-Линдау (von Hippel-Lindau (VHL) E3 Ligase Complex)

HIF-1 α или HIF-2 α субъединицы в сочетании с HIF-1 β формируют 2 главные активные изоформы HIF – HIF-1 и HIF-2, соответственно (Taylor C.T. et al., 2016). Все три изоформы α -субъединицы, а также β -субъединица содержат на N-конце bHLH (Basic-Helix-Loop-Helix) и PAS (Per-Arnt-Sim) домены (рис. 1), которые требуются для гетеродимеризации α - и β -субъединиц (Wang G.L. et al., 1995; Crews S.T., 1998). Помимо этого, bHLH домен HIF- α/β димера необходим для связывания консенсусной последовательности (G/ACGTG), содержащейся в отвечающих на гипоксию элементах (HREs, Hypoxia Response Elements), которые находятся в промотерах и/или энхансерах контролируемых HIF генов (Wenger R.H. et al., 2005). α -субъединицы также содержат C-концевые домены кислород-зависимой деградации ODDD (Oxygen-Dependent Degradation Domain), посредством гидроксилирования которых обеспечивается регуляция активности HIF в зависимости от концентрации кислорода (Koh M.Y. и Powis G., 2012). Домены транскрипционной активности C-TAD и N-TAD (Transcriptional Activity Domains), которые расположены на C-конце молекулы белка (рис. 1), обеспечивают взаимодействия HIF-1 с коактиваторами транскрипции, такими как CBP/p300 [CREB (cAMP-Response Element-Binding Protein)-Binding Protein/E1A Binding Protein p300] (Ruas J.L. et al., 2002).

HIF-1 и HIF-2 имеют дискретные профили тканевой экспрессии, которые перекрываются, но имеют и отдельные комплекты таргетных генов (Hashimoto T. и Shibasaki F., 2015; Watts E.R. и Walmsley S.R., 2019). HIF-1 α экспрессируется повсеместно, в то время как HIF-2 α (EPAS, Endothelial PAS) экспрессируется в эндотелии сосудов, легких, хрящах и имеет 48% аминокислот, идентичных HIF-1 α (Tian H. et al., 1997; Wiesener M.S. et al., 2003). HIF-3 α (IPAS, Inhibitory PAS) был описан относительно недавно, его мРНК существует в разных сплайс-вариантах и образует множество изоформ (Duan C., 2016). HIF-3 α является отрицательным регулятором HIF-1 α и 2 α субъединиц, так как димеризуется с ними и предотвращает их ДНК-связывающую способность (Yang S.L. et al., 2015; Duan C., 2016). Все α -субъединицы димеризуются с β и присоединяются к HREs. HIF-1 α в основном активируется в ранние сроки (2-24 ч) интенсивной гипоксии или аноксии, в то время как HIF-2 α – при более мягкой или физиологической гипоксии и его активация сохраняется в течение 48-72 ч после гипоксической нагрузки (Holmquist-Mengelbier L. et al., 2006). HIF-1 запускает первичный ответ на гипоксию, но при хронической кислородной недостаточности главную роль играет HIF-2 (Holmquist-Mengelbier L. et al., 2006; Koh M.Y. и Powis G., 2012).

1.1.4.2 Пути регуляции HIF

Регуляция через гидроксилирование

Экспрессия субъединиц HIF- α регулируется, главным образом, на пост-трансляционном уровне, через зависимую от гидроксилирования протеасомную деградацию. Однако были

описаны механизмы транскрипционной и трансляционной регуляции, включающие, соответственно, ядерный фактор «каппа-би» NF-κB (Nuclear Factor-κB) (Rius J. et al., 2008; van Uden P. et al., 2008, 2011) и мишень рапамицина у млекопитающих mTOR (Mammalian Target Of Rapamycin) (Linehan W.M. et al., 2010; Smolkova K. et al., 2011).

В условиях нормоксии *de novo* синтезирующийся цитоплазматический HIF-α регулируется несколькими путями (рис. 2). Три пролилгидроксилазы (Prolyl Hydroxylase Domain proteins, PHD1 (EGLN2), PHD2 (EGLN1) и PHD3 (EGLN3)) гидроксилируют пролиновые остатки, расположенные в ODDD домене HIF-α (Epstein A.C. et al., 2001; Watts E.R. и Walmsley S.R., 2019). Все три пролилгидроксилазы могут гидроксилировать HIF-1α, но PHD2 имеет более высокую аффинность к HIF-1α, в то время как PHD1 и PHD3 – к HIF-2α (Berra E. et al., 2003; Appelhoff R.J. et al., 2004). Для HIF-1α первичный сайт гидроксилирования – Pro402 и 564 (Kaelin W.G. и Ratcliffe P.J., 2008), HIF-2α – Pro405 и 531 (Haase V.H., 2012), HIF-3α – Pro490 (Moniz S. et al., 2014). Гидроксилирование вышеупомянутых пролиновых остатков – ключевой механизм негативной регуляции активности HIF-α, поскольку он способствует его протеасомной деградации с помощью E3-убиквитин-лигазного комплекса Гиппеля-Линдау (Von Hippel–Lindau (VHL) E3 Ligase Complex) (Ivan M. et al., 2001; Jaakkola P. et al., 2001; Koyasu S. et al., 2018; Stothers C.L. et al., 2018). Таким образом, при нормоксии белок HIF-α в большинстве тканей остается супрессированным и разрушается в течение 5 мин (Fratantonio D. et al., 2018).

Гидроксилазы – это 2-оксоглутарат и Fe(II)-зависимые диоксигеназы, активность которых полностью зависит от кислорода, и в его отсутствие она подавляется (Epstein A.C. et al., 2001; Frede S. et al., 2006; Koyasu S. et al., 2018). В условиях гипоксии (рис. 2) содержание субстратов и коактиваторов гидроксилирования – O₂, Fe(II) и 2-оксоглутарата, – снижается, что приводит к ослаблению гидроксилирования HIF-α (Schofield C.J. и Zhang Z., 1999). Он накапливается в цитоплазме и впоследствии транслоцируется в ядро, где димеризуется с HIF-β субъединицей (рис. 2). Димер HIF-α/β присоединяется к HREs, которые расположены в промотерах кислород-зависимых генов, вовлеченных в системную и клеточную адаптацию к гипоксии: глюкозных транспортеров, гликолитических ферментов, ангиогенных и гемопоэтических ростовых факторов (Ke Q. и Costa M., 2006; Schodel J. et al., 2011; Semenza G.L. et al., 2012; Koyasu S. et al., 2018). Связывание HIF-α/β с ДНК приводит к запуску согласованного транскрипционного ответа. HIF также напрямую взаимодействует с регуляторными белками, что позволяет скоординировать кислород-чувствительный сигнальный HIF путь с другими путями, такими как NF-κB, фосфатидилинозитол 3-киназным (PI3K)/АКТ и т.д. (Uniacke J. et al., 2012; Hubbi M.E. et al., 2015; Koyasu S. et al., 2018).

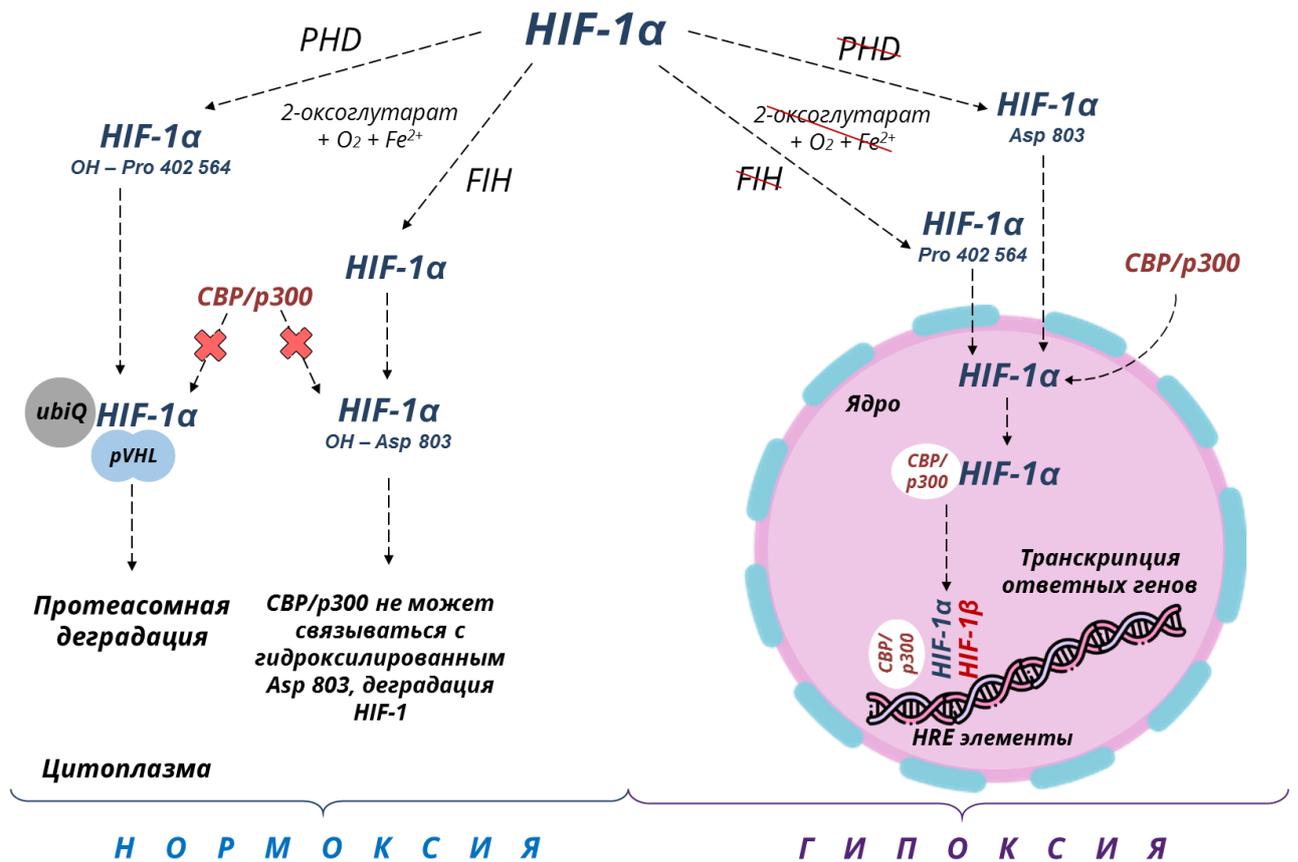


Рис. 2. HIF-1α в нормоксических и гипоксических условиях (по А. Zimna и М. Kurpisz, 2015, в модификации). Asn – остаток аспарагина, CBP/p300 – CREB (cAMP-Response Element-Binding Protein)-Binding Protein/E1A Binding Protein p300, FIH – фактор, ингибирующий HIF (Factor-Inhibiting HIF), HIF – индуцируемый гипоксией фактор, HREs – отвечающие на гипоксию элементы (Hypoxia Response Elements), PHD – пролилгидроксилаза (Prolyl Hydroxylase Domain Protein), Pro – остаток пролина, pVHL – E3-убиквитин-лигазный комплекс Гиппеля-Линдау (von Hippel-Lindau (VHL) E3 Ligase Complex), ubiQ – убиквитин (Ubiquitin)

Кроме регуляции путем стабилизации белка HIF-1α в некоторых *in vivo* исследованиях при воздействии гипоксии показано также увеличение уровня мРНК *Hif-1α* (Wiener С.М. et al., 1996; Chen R. et al., 2018). У крыс, которые дышали атмосферным воздухом, содержащим 21% O₂, мРНК *Hif-1α* обнаруживалась в легких, сердце, печени, селезенке, почках и мозге (Wiener С.М. et al., 1996). Показано, что в условиях нормоксии в крови и почках уровень экспрессии гена *Hif-1α* соответствует базовому уровню экспрессии генов «домашнего хозяйства» у лабораторных животных, а в других органах он выше: в сердце – в 3 раза, в печени – в 17 раз, и в тканях мозга – в 272 раза (Шустов Е.Б. и соавт., 2015; Каркищенко Н.Н., 2017).

При воздействии нормобарической гипоксии (7% O₂) в течение часа уровень мРНК *Hif-1α* увеличивался в мозге, легких и почках (Wiener С.М. et al., 1996). По данным ряда авторов, в ответ на двухчасовое воздействие острой нормобарической гипоксии (10% O₂) уровень мРНК *Hif-1α* в легких мышей повышался в течение 30 мин, достигал пика через час после воздействия и

возвращался к исходному уровню через 4 ч. При этом содержание белка HIF-1 α возрастало в ответ на гипоксию через 30 мин и оставалось повышенным в течение 8 ч после гипоксического воздействия (Stroka D.M. et al., 2001; Blouin C.C et al., 2004; BelAiba R.S. et al., 2007)

В условиях развития гипоксии происходит активация *Hif-1 α* и повышение уровня его экспрессии в крови (в 20-40 раз), что свидетельствует о развитии гипоксического состояния. Маркером выраженной гипоксии тканей является двух-трехкратный рост экспрессии этого фактора в печени, а при критическом уровне гипоксии – в сердце в 6-7 раз и почках в 20-30 раз (Шустов Е.Б. и соавт., 2015; Каркищенко Н.Н., 2017). В течение продолжающейся гипоксии HIF-1 α экспрессируется до тех пор, пока не будет достигнут баланс между поступающим кислородом и использованием его в тканях (Jiang V.H. et al., 1996).

Особый член семейства гидроксилаз – фактор, ингибирующий HIF (FIH, Factor-Inhibiting HIF) – обеспечивает еще один уровень регуляции HIF- α (Mahon P.C. et al., 2001). FIH специфично гидроксилирует аспарагиновые остатки в C-TAD домене транскрипционной активации HIF (Asn803 HIF-1 α и Asn847 HIF-2 α). В условиях нормоксии такая модификация предотвращает взаимодействие HIF- α с транскрипционными коактиваторами CBP/p300. FIH имеет меньшую чувствительность к молекулярному кислороду, чем PHD. В условиях гипоксии FIH ингибируется пероксидом (Masson N. et al., 2012), что обеспечивает функциональное взаимодействие HIF с коактиваторами и приводит к активации транскрипции (Mahon P.C. et al., 2001; Lando D. et al., 2002). Таким образом, гидроксилирование может влиять на активность HIF двумя отдельными механизмами: через стабилизацию белка и активацию транскрипции.

Гидроксилирование – ключевая модификация, регулирующая активность HIF в ответ на изменения концентрации O₂, однако и другие пост-трансляционные модификации, включая ацетилирование и фосфорилирование, могут влиять на активность HIF (Greer et al., 2012; Koyasu S. et al., 2018).

Субъединицы HIF- α могут стабилизироваться в негипоксических условиях – этот феномен получил название псевдогипоксия. Такое состояние возникает из-за того, что, для обеспечения прямой чувствительности к изменениям концентрации O₂, пролилгидроксилазы отвечают также на изменения в концентрациях АФК, железа, аскорбата и промежуточных продуктов цикла Кребса (Ratcliffe P.J., 2013; Halligan D.N. et al., 2016; Salminen A. et al., 2016; Chen R. et al., 2018). При мутациях в генах белков, вовлеченных в цикл Кребса, происходит стабилизация HIF- α с помощью ингибирования его гидроксилирования (Schonenberger M.J. и Kovacs W.J., 2015).

Таким образом, при гипоксии происходит активация транскрипции мРНК и синтеза белка HIF-1, главным образом, за счет инактивации нескольких гидроксилаз. Однако повышение его экспрессии может наблюдаться и в условиях нормоксии, особенно в органах, в наибольшей степени чувствительных к концентрации кислорода – мозге, сердце, легких, печени и почках.

Регуляция через трансформирующий фактор роста TGF- β

Показано, что, помимо гипоксии, существуют другие механизмы индукции HIF. Они включают усиление трансляции через mTOR-зависимый механизм (Nakamura H. et al., 2005), а также усиление транскрипции в STAT3-зависимом пути (Dang E.V. et al., 2011) или NF- κ B (Moniz S. et al., 2014; Koyasu S. et al., 2018). Показано, что гипоксия способствует быстрому, но временному увеличению уровня мРНК *Hif-1 α* . Этот ответ включает активацию фосфатидилинозитол 3-киназного (PI3K)/АКТ путей и NF- κ B, который по механизму положительной обратной связи активирует промотор *Hif-1 α* (BelAiba R.S. et al., 2007; Bonello S. et al., 2007).

Недавно был описан лизосомальный механизм разрушения HIF-1 α , включающий опосредованную шаперонами аутофагию. Этот механизм деградации, по-видимому, не зависит от кислорода (Hubbi et al., 2015; Taylor C.T. и Colgan S.P., 2017).

Несмотря на то, что основным регулятором HIF-1 α является дефицит кислорода, при нормоксии некоторые факторы воспалительной и опухолевой микросреды также могут влиять на его активность. Исследования показали, что трансформирующий фактор роста (TGF- β , Transforming Growth Factor- β) увеличивает экспрессию регуляторной субъединицы HIF-1 α и индуцирует ДНК-связывающую активность HIF в клетках фибросаркомы HT1080 (Shih S.C. и Claffey K.P., 2001). TGF- β – это полипептидный цитокин, который у млекопитающих имеет три изоформы: TGF- β 1, TGF- β 2 и TGF- β 3 (Poniatowski L.A. et al., 2015). TGF- β регулирует различные процессы в организме: клеточный рост, пролиферацию, миграцию, выживание, дифференцировку клеток, ангиогенез, воспалительные и иммунные реакции (Chambaz E.M. et al., 1996; Roberts A.B. 1998). В нормальных эпителиальных клетках TGF- β действует как потенциальный опухолевый супрессор посредством регуляции множества физиологических процессов, включающих ингибирование роста и стимуляцию апоптоза (Siegel P. и Massague J., 2003). Инактивация пути TGF- β или зависимых от него генов может приводить к развитию эпителиальных опухолей *de novo*.

Канонический путь TGF- β регулируется белками семейства SMAD (Similar to Mothers Against Decapentaplegic): SMAD2 и SMAD3, которые передают сигнал на медиатор SMAD4, и вместе транслоцируются в ядро для регуляции экспрессии генов. Ингибиторы – SMAD6 и 7 – могут конкурировать за связывание со SMAD2 и 3 и таким образом супрессировать путь TGF- β (Itoh S. и ten Dijke P., 2007; Yan X. et al. 2009; Macias M.J. et al., 2015; Poniatowski L.A. et al., 2015). Также существует альтернативный путь активации TGF- β , не зависящий от SMAD-белков. В целом, SMAD-зависимый путь супрессирует развитие опухолей (Hahn S.A. et al., 1996), в то

время как SMAD-независимый путь коррелирует с опухолевой прогрессией (Bhowmick N.A. et al., 2001).

Показано, что TGF- β тесно связан с HIF-1 α : он ингибирует PHD2, что, в свою очередь, активирует HIF-1 α (McMahon S. et al. 2006; Tug S. et al., 2009). S. McMahon et al. (2006) показали, что TGF- β влияет на накопление и активность белка HIF-1 α через повышение его стабильности. В частности, было показано, что TGF- β через SMAD-зависимый сигнальный путь уменьшает как уровни мРНК, так и белка PHD2. Как следствие, ингибируется разрушение HIF-1 α в протеасоме. Кроме того, ингибирование TGF- β приводит к увеличению экспрессии PHD2, и уменьшению уровней HIF-1 α и VEGF. Таким образом, некоторые ростовые факторы могут контролировать стабильность HIF-1 α через регуляцию PHD2 и, следовательно, запускать экспрессию специфических генов (McMahon S. et al., 2006; Ueno M. et al., 2011).

В свою очередь, HIF-1 α , также может инициировать транскрипцию TGF- β (Saed G. et al. 2002; Jiang Y. et al. 2007). Взаимосвязь HIF-1 α и TGF- β имеет важное значение для их кооперации в норме и при опухолевой прогрессии (Heikinen P., 2015).

Следует отметить, что сигнальные пути TGF- β и HIF регулируют одни и те же гены. Например, TGF- β обладает проангиогенным действием, в частности, за счет способности активировать экспрессию ангиогенных факторов VEGF и эритропоэтина, которые являются ключевыми генами, регулируемые HIF-1 (Forsythe J. et al., 1996; Ema M. et al. 1997; Sanchez-Elsner T. et al. 2001, 2004). Показано, что TGF- β регулирует эритроидную дифференцировку (Faquin W.C. et al., 1992; Krystal G. et al., 1994). Полная мутация гена TGF- β вызывает дефекты гемопоэза (Dickson M.C. et al., 1995). В то же время, блокирование HIF-1 у мышей уменьшает индуцированную гипоксией экспрессию VEGF, формирование и функционирование сосудов (Carmeliet P. et al., 1998). Показано, что существует взаимосвязь между HIF-1, TGF- β (через SMAD3/4) и геном эритропоэтина, которая обусловлена физическим взаимодействием между SMAD3/4 и HIF-1 α (Sanchez-Elsner T. et al., 2004). Также было установлено, что пути TGF- β и HIF-1 взаимодействуют для индукции экспрессии гена VEGF (Sanchez-Elsner T. et al., 2001). В эпителиальных клетках почки человека стимуляция TGF- β 1 в условиях нормоксии увеличивает экспрессию HIF-1 α через механизм, отличный от стабилизации при гипоксии. Блокирование активности HIF-1 α ингибирует путь SMAD3, и, напротив, блокирование SMAD3 ингибирует HIF-1 α -опосредованные ответы (Basu R.K. et al., 2011).

Более того, SMAD7 играет важную роль во взаимодействии TGF- β и NF- κ B путей. Известно, что активируемая TGF- β киназа 1 – TAK1 (Transforming Growth Factor Beta-Activated Kinase 1), опосредует ответ на цитокины TNF α (Tumor Necrosis Factor α , фактор некроза опухоли α) или IL-1 β (InterLeukin-1 β , интерлейкин 1 β), и фосфорилирует ИКК-комплекс (IkB Kinase, киназа ингибитора NF- κ B – IkB) (состоящий из ИКК α и β каталитических субъединиц, и основной

субъединицы IKK γ /NEMO (NF- κ B Essential Modulator)), который способствует активации NF- κ B (Sakurai H. et al., 1999) через фосфорилирование ингибитора- κ Ba (I κ Ba). IKK-опосредованное разрушение I κ B в протеасоме запускает ядерную транслокацию и связывание NF- κ B с ДНК. Субъединица NF- κ B p65 может активировать SMAD7 (Derynck R. и Zhang Y., 2003), что способствует отрицательной регуляции канонического TGF- β -SMAD пути (Bitzer M. et al., 2000; Solt L.A. и May M.J., 2008). SMAD7, в свою очередь, обратно индуцирует экспрессию I κ Ba, ингибируя активацию NF- κ B (Freudlsperger C. et al., 2013).

Таким образом, при недостаточном содержании кислорода в организме активируется транскрипционный фактор HIF-1, который способствует транскрипции адаптивных генов, таких как эритропоэтин, VEGF и др. Гипоксическая активация HIF-1 опосредуется гидроксилазами, ингибирование которых при недостаточном содержании кислорода препятствует разрушению HIF-1 α в протеасоме. Однако активация HIF-1 может наблюдаться и в условиях нормоксии, так как на него оказывают воздействие многие факторы, регулирующие процессы воспаления, в том числе NF- κ B и TGF- β .

1.1.4.3 Влияние HIF на адаптацию к гипоксии

По определению А.П. Авцына (1974) адаптация – процесс приобретения приспособительной выносливости. Его результатом является адаптированность, под которой понимается состояние, выражающееся в способности организма к выживанию и воспроизведению в новых экологических условиях. Адаптированность возникает на основе функциональных перестроек организма с использованием его пластических и энергетических ресурсов, а также последующей реорганизацией тканевых, клеточных и молекулярных структур (Казначеев В.П., 1980; Марачев А.Г., 1980; Меерсон Ф.З., 1993). Таким образом, адаптированность к экстремальным условиям достигается ценою определенных повреждений на всех уровнях организации организма.

Воздействие обедненной кислородом среды запускает множество физиологических и биохимических реакций, которые, прежде всего, способствуют повышению эффективности дыхательной, сердечно-сосудистой систем и системы утилизации O₂. Адаптация к высоте может вызывать немедленные эффекты, такие как гипервентиляция, потеря жидкости, увеличение частоты сердечных сокращений (ЧСС) и, в меньшей степени, уменьшение ударного объема. В свою очередь, длительные эффекты включают компенсаторное увеличение гематокрита (полицитемию), повышение плотности капилляров в скелетной мышечной ткани, увеличение количества миоглобина и гипоксическую легочную вазоконстрикцию (Bhagi S. et al., 2014; Azad P. et al., 2017; Murray A.J. et al., 2018).

С увеличением высоты наблюдается прогрессирующая гипервентиляция, приводящая к чрезмерному удалению из организма CO_2 , что вызывает гипокапнию, которая, в свою очередь, может приводить к вазоконстрикции для противодействия увеличенному току крови (Hodkinson P.D., 2011). Хотя за счет одышки происходит улучшение оксигенации артериальной крови, в последующем, в связи с развитием гипокапнии, происходит ухудшение кислородного обеспечения мозга и миокарда из-за спазма их сосудов, развития алкалоза и вызванного этим угнетения дыхательного центра (Burtscher M. et al., 2012). Этот комплекс вазорегуляторных взаимодействий объясняет различные симптомы, возникающие при острой гипоксии, такие как головная боль, потеря сознания, острая горная болезнь, высокогорный отек мозга, особенно у людей с предрасполагающими заболеваниями (Rimoldi S.F. et al., 2010; Hodkinson P.D., 2011).

Высотная болезнь – термин, используемый для клинических синдромов, развивающихся на высотах более 2500 м, она включает острую горную болезнь, высокогорный отек мозга и легких. Наиболее частыми осложнениями, возникающими при подъеме на большие высоты, являются высокогорный отек мозга и легких, острая коронарная недостаточность и потеря сознания (Bhagi S. et al., 2014; Luks A.M. et al., 2017). Темп подъема, достигнутая высота, предварительная акклиматизация и индивидуальная чувствительность к гипоксии – основные критерии устойчивости к высокогорным заболеваниям. Результаты исследований различных популяций людей выявили изменчивость в индивидуальной чувствительности к высотной болезни, зависящую от так называемого «генетического портрета» (Patel S. и Peacock A., 2001; Azad P. et al., 2017; Luks A.M. et al., 2017).

Адаптивный клеточный ответ на недостаток O_2 происходит после транскрипционной активации контролируемых димером HIF-1 α/β генов (Kallio P.J. et al., 1997). Например, гипоксия увеличивает экспрессию эритропоэтина, который является одним из основных стимуляторов продукции эритроцитов и в гене которого у человека были впервые обнаружены отвечающие на гипоксию элементы (HREs) (Semenza G.L. и Wang G.L., 1992; Wang G.L. et al., 1995; Ebert B.L. и Bunn F., 1999; Semenza G.L., 2011). В норме эритропоэз протекает на низком базальном уровне и обеспечивает компенсацию гибели старых эритроцитов. Однако при увеличении повреждения эритроцитов в таких патологических условиях, как гипоксия, анемии и кровотечения, продукция эритропоэтина повышается в 1000 раз, что стимулирует образование эритроцитов, которые увеличивают доставку O_2 к тканям (Semenza G.L. et al., 1991; Ebert B.L. и Bunn F., 1999; Fandrey J., 2004).

HREs также были найдены более чем в 1000 генах, активируемых недостатком кислорода, вовлеченных в ангиогенез, эритропоэз, метаболизм, аутофагию, апоптоз и другие физиологические реакции на гипоксию (Manalo D.J. et al., 2005). Продукты регулируемых HIF-1 генов-мишеней действуют на разных функциональных уровнях. Конечным результатом их

активации является увеличение поступления O_2 в клетку (Semenza G.L., 2011; Corcoran S.E. и O'Neill L.A., 2016).

Функционирование пути HIF – обязательное условие нормального эмбрионального развития. Исследования показали, что дефицитные по HIF-1 мыши не жизнеспособны (Wang G.L. et al. 1995; Ryan H.E. et al. 1998; Kotch L.E. et al. 1999). Этот ген – ключевой регулятор нормального развития и выживания клеток – также играет важную роль в опухолевой прогрессии (Ryan H.E. et al. 1998).

HIF-1 прямо или опосредованно регулирует более чем 2% генов в клетках сосудистого эндотелия (Manalo D.J. et al., 2005). В условиях гипоксии накопление HIF-1 прямо активирует транскрипцию VEGF через связывание с HREs (Flamme I. et al., 1997; Nizet V. и Johnson R.S., 2009). Инициированный гипоксией и HIF-1 ангиогенез – прежде всего VEGF-зависимый, так как в нем участвуют основные изоформы фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C и VEGF-D). В исследованиях последних лет показано, что гипоксия и экспрессия HIF-1 играют ключевую роль в ангиогенезе, и способствуют ему несколькими путями: в первую очередь, через активацию транскрипции генов, кодирующих ангиогенные факторы, включающие VEGF, ангиопоэтин 1 и 2, фактор роста плаценты (Placental Growth Factor – PGF) и фактор роста тромбоцитов В (Platelet-Derived Growth Factor В – PDGFB) (Semenza G.L., 2013; Hashimoto T. и Shibasaki F., 2015). Кроме того, недостаток O_2 стимулирует синтез и активацию проангиогенных хемокинов и рецепторов (SDF-1 α , CXCR4, C-X-C, SIP, SIPRs), что способствует миграции предшественников клеток эндотелия в зону гипоксии (Ceradini D.J. et al., 2004; Semenza G.L., 2013). Также при дефиците кислорода происходит усиление пролиферации клеток за счет регуляции генов, вовлеченных в клеточный цикл и репликацию ДНК (Manalo D.J. et al., 2005). Таким образом, HIF-1 контролирует ангиогенез и принимает участие в каждом его этапе.

Низкие уровни O_2 влияют на метаболизм глюкозы в клетках (Avellanas Chavala M.L., 2018). HIF регулирует большинство генов гликолитических ферментов, таких как глюкозный переносчик 1 GLUT1 (Glucose Transporter 1), активация которого может способствовать повышению пролиферации клеток в опухолях (Semenza G.L., 2013; Starska K. et al., 2015). В условиях нормоксии большинство клеток продуцируют АТФ посредством окислительного фосфорилирования. При низком содержании кислорода HIF-1 регулирует переход на гликолиз и анаэробный метаболизм, а также подавляет потребление O_2 митохондриями (Parandreou I. et al., 2006; Corcoran S.E. и O'Neill L.A., 2016). В условиях гипоксии клетки генерируют только 2 молекулы АТФ через независимый от O_2 гликолиз вместо 38 молекул АТФ через кислород-зависимый цикл трикарбоновых кислот в нормоксических условиях (Seagroves T.N. et al., 2001). Для поддержания энергетического баланса в условиях гипоксии способность клеток продуцировать АТФ увеличивается за счет усиления экспрессии гликолитических ферментов и

транспортеров, что способствует большему поглощению глюкозы (Semenza G.L. et al., 1994; Avellanas Chavala M.L., 2018).

Роль HIF-1 в механизмах клеточной гибели противоречива: он может запускать апоптоз (Carmeliet P. et al., 1998; Zhou C.H. et al., 2015), предотвращать гибель клеток или стимулировать их пролиферацию (Akakura N. et al., 2001). Определяющим фактором при этом является концентрация кислорода: при 0-0,5% O₂ индуцируется апоптоз, в то время как при более высоком его содержании гибель не происходит (Santore M.T. et al., 2002). Более того, выживание и пролиферация клеток могут усиливаться в условиях гипоксии, поскольку активация HIF-1 увеличивает экспрессию таких факторов, как инсулино-подобный фактор роста 2 – IGF-2 (Insulin-Like Growth Factor-2) и TGF-β (Feldser D. et al., 1999; Saed G. et al. 2002; Jiang Y. et al. 2007; Heikinen P., 2015). В нормальных клетках TGF-β рассматривается как ограничивающий рост клеток фактор, однако в опухолях он, напротив, способствует их росту (Akhurst R.J. и Derynck R., 2001).

HIF-1 и HIF-2 часто действуют однонаправленно, например, оба они способны активировать VEGF-A. Однако они могут иметь и антагонистические эффекты в различных физиологических процессах (например, эмбриональном развитии) и по-разному функционировать в патофизиологических условиях, таких как опухоли и ишемические болезни (Semenza G.L., 2012). Например, HIF-1α способствует остановке клеточного цикла, в то время как HIF-2α, напротив, обеспечивает его прогрессию. В мышинных макрофагах, кератиноцитах и эндотелиальных клетках, HIF-1α запускает продукцию NO через активацию гена индуцируемой NO-синтазы (NOS2), в то время как HIF-2α ингибирует продукцию NO через индукцию гена аргиназы.

Таким образом, кислородная недостаточность способствует активации множества генов, в первую очередь, эритропоэза и ангиогенеза, а также метаболизма железа, глюкозных переносчиков и апоптоза. Активация HIF является ключевым событием, изменяющим метаболизм клеток и способствующим переходу с окислительного форфорилирования на гликолиз.

1.1.5 Устойчивость к гипоксии

Высокогорье с его экстремальными условиями обитания до сих пор сравнительно мало осваивается. Исследования, преимущественно клинического и патофизиологического характера, по изучению влияния условий высокогорья на организм, позволили выделить две полярные группы лиц по способности адаптироваться. Способность к быстрой и полноценной адаптации определяется индивидуальными возможностями организма (Березовский В.А., 1978; Nelson M., 1982).

Сведения о том, что в пределах каждого вида, как среди животных, так и среди людей, встречаются индивидуумы, значительно отличающиеся по своим реакциям на недостаток кислорода, приводятся многими исследователями (Петров И.Р., 1949; Березовский В.А., 1978; Газенко О.Г., 1987; Зиновьев Ю.В. и соавт., 1988; Лукьянова Л.Д., 2003; Keys A. et al., 1938; Brooks J.T. et al., 2008; van Patot M.C. и Gassman M., 2011; Serebrovskaya T.V. и Xi L., 2012). Еще в 1971-1978 гг. при изучении реакции животных на дефицит O_2 было замечено, что в любой группе интактных животных (в частности, белых крыс) одного возраста и пола, выращенных в одинаковых условиях, при помещении их на критическую «высоту» (11000-12000 м) можно выявить особей, сохраняющих жизнеспособность при гибели 95% подопытных животных (Березовский В.А., 1975, 1978). Такие естественно устойчивые к гипоксии особи способны длительное время выживать в газовых средах, содержащих всего 2-3% O_2 . Эти животные сохраняют ритмичные дыхательные движения в условиях резкого разрежения (эквивалентного высоте 12000 м над уровнем моря) на протяжении 5-6 мин, а некоторые – даже свыше 10 мин, тогда как у большей части животных через 5-60 сек возникают агональное дыхание и судороги, заканчивающиеся гибелью. Высокоустойчивые (ВУ) к острой гипобарической гипоксии животные обнаружены среди лабораторных мышей, крыс, кроликов и морских свинок (Березовский В.А., 1978; Зиновьев Ю.В. и соавт., 1988). Из данных, приведенных в работе Г.И. Гуревича и К.С. Шадурского, можно заключить, что время остановки дыхания при создании в барокамере разрежения, эквивалентного высоте 11000 м, для различных особей белых мышей варьирует от 3 до 28 мин, т.е. отличается в 9 раз (Гуревич Г.И. и Шадурский К.С., 1963). Установлены достоверные межвидовые различия в чувствительности животных к гипобарической гипоксии («высота» 10000 м): наименее устойчивыми являются кролики, наиболее – морские свинки, крысы же более устойчивы к недостатку кислорода, чем кролики, но менее, чем морские свинки (Зиновьев Ю.В. и соавт., 1988).

Показано, что организмы с высоким уровнем организации центральной нервной системы (ЦНС) острее реагируют на экстремальные воздействия, включая гипоксию, в сравнении с организмами, имеющими более низкий уровень ее организации (Bert P., 1878; Hochachka P.W. и Somero G.N., 2001; Bickler P.E., 2004; Larson J. et al., 2014). Так, показано, что ЦНС человека в целом, и, в особенности, кора головного мозга, обладают повышенной чувствительностью к недостатку O_2 , в то время как мелкие млекопитающие, такие как грызуны, и, в частности, лабораторные животные, имеют гораздо большую плотность капилляров в тканях, что обеспечивает их большую устойчивость к гипоксии (Jain K. et al., 2013; Larson J. et al., 2014). Увеличение плотности сосудов, которое наблюдается при адаптации к гипобарической гипоксии во многих органах и обусловлено выраженной активацией фактора HIF-1, способствует

улучшению кровообращения и тем самым является одним из важных защитных эффектов адаптации к гипоксии (Манухина Е.Б. и соавт., 2007; LaManna J.C. et al., 2004).

Внутривидовые различия реакции особей на острую гипоксию также существенно варьируют, и они обусловлены фенотипическими особенностями индивидов (Березовский В.А., 1975). Жизненно важные органы различаются по чувствительности к гипоксии, что, в конечном итоге, определяет устойчивость к недостатку O_2 всего организма (Burtscher M. et al., 2012). Раньше других проявляются изменения со стороны ЦНС, которые связаны с дефицитом энергии и высоким потреблением кислорода головным мозгом (Silver I. и Erecinka M., 1998; Garbarino V.R. et al., 2015; Lukyanova L.D. и Kirova Y.I., 2015). Различные структуры мозга отличаются разной устойчивостью к кислородной недостаточности одинаковой степени и длительности. Наиболее чувствительными к гипоксии являются филогенетически более молодые отделы головного мозга – кора больших полушарий, а также кора мозжечка (Зарубина И.В., 2011). Показано, что в нейронах неокортекса, гранулярном слое зубчатого ядра и в гиппокампе содержится наибольшее количество HIF-1 α , который отвечает за реакцию на гипоксию. Он также был обнаружен в клетках Пуркинье мозжечка (Кирова Ю.И. и соавт., 2012; Stroka D.M. et al., 2001). Предполагается, что интенсивная экспрессия HIF-1 α в мозге даже в условиях нормоксии связана с его высокой чувствительностью к гипоксическому воздействию и необходимостью создания определенного «резерва» генной регуляции на случай экстремального воздействия (Шустов Е.Б. и соавт., 2015). В последнюю очередь при воздействии гипоксии нарушаются функции продолговатого мозга. Последствия дефицита O_2 для организма в целом определяются степенью повреждения нейронов коры больших полушарий и сроками их развития (Зарубина И.В., 2011). Полное прекращение оксигенации коры мозга вызывает необратимые структурные и функциональные изменения в ней уже через 2-3 мин, в продолговатом мозге через 8-12 мин, а в ганглиях вегетативной нервной системы – через 50-60 мин (Рябов Г.А., 1994).

Кроме головного мозга к высокочувствительным к гипоксии органам относят сердце, легкие, почки и печень. Сердце и печень в норме отличаются высоким потреблением O_2 , а также имеют повышенный уровень экспрессии HIF-1 α (Кирова Ю.И. и соавт., 2012; Шустов Е.Б. и соавт., 2015). В сердечной мышце мелкие очаги некроза появляются через 3-5 мин тяжелой гипоксии, а крупноочаговый инфаркт миокарда формируется уже через 20-30 мин (Окороков А.И., 2002). В силу поступления венозной крови из системы воротной вены около 20% гепатоцитов имеют низкое (0-10 мм рт.ст.) напряжение O_2 и в печени в норме существуют гипоксические зоны (Зарубина И.В. и Юнусов И.А., 2009). Показано, что через 20-30 мин после начала гипоксии в печени, как и в почках, обнаруживаются морфологические и функциональные нарушения. В частности, снижается детоксикационная функция печени, что приводит к накоплению токсичных метаболитов, возникают дистрофия и некрозы.

К органам со средней чувствительностью к гипоксии относят поджелудочную железу и надпочечники, а к низкочувствительным – кости, хрящи, сухожилия и связки. В них даже в условиях тяжелой гипоксии не обнаруживаются значительных морфологических изменений, а экспрессия HIF-1 α на 15-30% ниже, чем в миокарде и неокортексе. Также низкой экспрессией HIF-1 α отличаются тимус и селезенка (Кирова Ю.И. и соавт., 2012). В скелетной мускулатуре структурные изменения миофибрилл и их сократимости выявляются через 100-120 минут после действия гипоксии (Зарубина И.В., 2011).

Причины различий в устойчивости организмов к недостатку O₂ не подвергались специальному анализу и остаются не вполне ясными. Показано, что устойчивость к гипоксии зависит от интенсивности потребления кислорода, особенностей метаболизма, поведенческих реакций и ряда других, трудно поддающихся учету, индивидуальных отличий. М.А. Veloso (1981) в результате многопланового исследования адаптационных реакций организма животных и человека к факторам внешней среды пришел к заключению, что адаптационные реакции у населения разных регионов не связаны с его генетическими особенностями. В противоположность этим данным, Т.В. Серебровская (1988), обследовавшая 16 пар монозиготных и 14 пар дизиготных близнецов в возрасте 14-15 лет, пришла к заключению, что при острой гипоксической гипоксии генетическая индивидуальность предопределяет особенности реактивности организма. Дальнейшее длительное исследование (в течение 8 лет) монозиготных близнецов на уровне моря и высоте показало, что дыхательный ответ на гипоксический стимул – жесткая, генетически определенная, физиологическая характеристика, отражающая общую неспецифическую реактивность организма (Serebrovskaya T.V. и Xi L., 2012). В частности, показано, что способность людей поддерживать относительно постоянные уровни потребления кислорода в условиях гипоксии (11% O₂ 15 мин) определяются генетически (70-80%) и зависят от индивидуальной чувствительности к гипоксии и гиперкапнии. Генетическую детерминированность устойчивости к гипоксии подтверждают данные о том, что существуют многочисленные полиморфизмы гена HIF1A (Lorenzo V.F. et al., 2009; De Carvalho Fraga C.A. et al., 2013; Kobayashi N. et al., 2013; Strauss E. et al., 2015).

В ряде работ выявлены половые и возрастные различия в способности адаптироваться к высокогорью. В частности, показано, что женщины быстрее адаптируются и легче переносят острую горную болезнь по сравнению с мужчинами (Drinkwater B.L. et al., 1979). Также обнаружено, что среди самок крыс преобладают высокоустойчивые к гипоксии особи, в то время как самцы оказываются преимущественно низкоустойчивыми и среднеустойчивыми (Чернобаева Г.Н. и Лукьянова Л.Д., 1989). Р. Bert (1878), один из первых исследователей влияния гипоксии, обнаружил, что новорожденные животные по сравнению со взрослыми более устойчивы к недостатку O₂. Этот факт был подтвержден другими авторами (Домбровская Ю.Ф.,

1961; Колчинская А.З., 1964). Новорожденные животные выживают при часовом воздействии очень резких степеней гипоксии (13000 м), что обусловлено физиологической незрелостью нервной и эндокринной систем, и связанным с ней низким потреблением кислорода. Известно, что у крыс возрастом до 60 сут чувствительность к гипоксии подвержена резким колебаниям, а затем достигает уровня устойчивости взрослых животных (Корнеев А.А. и соавт., 1993). О меньшей устойчивости старых животных (крыс, собак) к гипоксии свидетельствуют эксперименты М.М. Середенко (1963).

Таким образом, существуют межвидовые, половые, возрастные и индивидуальные различия в устойчивости к недостатку кислорода. Внутренние органы также различаются по чувствительности к гипоксии: к высокоустойчивым относят кости, хрящи, сухожилия, связки, скелетные мышцы, тимус и селезенку, к среднеустойчивым – поджелудочную железу и надпочечники, к низкоустойчивым – головной мозг, сердце, почки, легкие и печень.

1.1.5.1 Методы определения устойчивости к гипоксии

В настоящее время проводятся многочисленные исследования биохимических, функционально-метаболических и других особенностей животных с разной устойчивостью к гипоксии. В биомедицинских исследованиях такие животные используются при доклинической оценке эффективности лекарственных средств – антигипоксантов (Воронина Т.А., 2009; Зарубина И.В., 2011; Левченкова О.С. и Новиков В.Е., 2011; Семенов Х.Х. и соавт., 2013; Сосин Д.В. и соавт., 2015). Однако до сих пор не существует общепринятой методики, характеризующейся одинаковыми параметрами скорости «подъема» в барокамере, «высоты» для каждого вида животных, а также учитывающей половые различия, возраст, влияние циркадианных, инфрадианных и сезонных биоритмов на устойчивость кислородной недостаточности.

Индивидуальные различия в чувствительности к гипоксии и ее переносимости определяются при «подъеме» животных в барокамере на критическую «высоту». Первая барокамера, позволившая в лабораторных условиях изучать действие гипоксии на организм, была сконструирована еще в середине XIX века (Junod V.T., 1835). Время жизни крайних по чувствительности к дефициту O_2 типов животных (высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии) на критической «высоте» должно различаться в 3 и более раз (Березовский В.А., 1978; Чернобаева Г.Н. и Лукьянова Л.Д., 1989; Каркищенко Н.Н., 2017). В связи с межвидовыми различиями устойчивости к гипоксии предельная для каждого вида «высота» подбирается эмпирически таким образом, чтобы обеспечить возможность выявления внутривидовых вариаций резистентности к недостатку кислорода.

Методика В.А. Березовского, предложенная в 1978 г. и заключающаяся в уменьшении барометрического давления до уровня, эквивалентного критической «высоте» (для белых мышей – 10000 м над уровнем моря, для крыс – 12000 м над уровнем моря), широко используется в настоящее время для разделения лабораторных животных по устойчивости к острой гипобарической гипоксии. При достижении критической «высоты» у животного появляются общее двигательное возбуждение, расстройства координации движения и обездвиживание. Ритм дыхания вначале учащен, затем постепенно замедляется, но остается регулярным. Нарушения ритма внешнего дыхания появляются позже, проявляются в неравномерности пауз и сменяются возникновением характерного для агонального состояния животного гаспинг-дыхания, развивающегося до паралича дыхательного центра. Гаспинг-дыхание (от англ. *gasp* – ловить воздух ртом, задыхаться) возникает в самой терминальной фазе асфиксии (при глубокой гипоксии или гиперкапнии). Оно встречается у недоношенных детей и при многих патологических состояниях (отравлениях, травмах, кровоизлияниях и тромбозах ствола головного мозга). Это единичные, редкие, убывающие по силе вдохи с длительными (по 10-20 сек) задержками дыхания на выдохе. В дыхательном акте при гаспинге участвуют не только диафрагма и дыхательные мышцы грудной клетки, но и мускулатура шеи и рта. Источником импульсов при данном виде дыхательных движений являются клетки каудальной части продолговатого мозга при прекращении функции вышележащих отделов мозга. Если не удастся восстановить оксигенацию, гаспинг-дыхание предшествует гибели организма (Новицкий В.В. и соавт., 2009; Guyenet P.G., 2014). При успешных оксигенирующих мероприятиях возможно обратное развитие нарушений дыхания до его полного восстановления. При появлении признаков асфиксии производится отсчет времени жизни (ВЖ) на «высоте» данной особи, и давление в барокамере постепенно нормализуют.

В некоторых исследованиях при «подъеме» в барокамере помимо ВЖ фиксируется несколько показателей, и индивидуальная устойчивость к гипоксии определяется путем их комплексной оценки: ВПП – время первого падения (переход в лежащее положение), характеризующее порог реакции организма на гипоксию при субкритических концентрациях O_2 , прежде всего отражающую состояние таких функций, как двигательная активность и дыхание, сек; ВЖ – время жизни на «высоте» (до появления агонального дыхания), сек; ВВП – время восстановления позы после спуска животного с «высоты», сек. Однако мерой оценки чувствительности животных к острой гипобарической гипоксии служит именно время жизни на «высоте». ВЖ характеризует способность животных к максимальной мобилизации защитных функций организма, ответственных за его жизнеспособность в экстремальной ситуации, несовместимой с жизнью (Лукьянова Л.Д. и соавт., 2009). Большинство исследователей значимость ВЖ на «высоте» оценивается выше других показателей (Шустов Е.Б. и соавт., 2013).

По результатам тестирования животных делят на две группы – высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии. Временная шкала, по которой определяется принадлежность особи к той или иной группе, варьирует в исследованиях разных авторов и зависит от вида, линии животного и типа барокамеры (Березовский В.А., 1978; Крыжановский Г.Н. и соавт., 1991; Лукьянова Л.Д., 2003, 2004; Семенов Х.Х., 2006; Грек О.Р. и соавт., 2007; Матюшин А.И. и соавт., 2007; Семенов Х.Х. и соавт., 2013). В работах иностранных авторов сходная методика определения устойчивости к гипоксии в барокамере была описана Bhatia V. et al. (1966) и Kugimiya T. et al. (1984).

Способ определения устойчивости к гипоксии в барокамере хотя и является общепринятым, но каждый автор в значительной мере его модифицирует (табл. 1), в частности, по критерию определения времени жизни (ВЖ) особи на «высоте», которое свидетельствует об индивидуальной чувствительности каждого животного к недостатку O₂.

Таблица 1

Критерии времени жизни животных на «высоте» по данным разных авторов

Животные	«Высота», м	Критерий времени жизни	Автор, год
Крысы Вистар	11500	Обратимая остановка дыхания	Агаджанян Н.А. и соавт., 1999; Хачатурьян М.Л., 2012
		Судороги или агональное дыхание	Грек О.Р. и соавт., 2007
		Появление второго агонального вдоха	Шарапов В.И., 1993; Грек О.Р. и соавт., 2002; Безруков В.В. и соавт., 2012
		Боковое положение и появление патологических типов дыхания	Tregub P. et al., 2013
Белые беспородные крысы	12000	Появление агональных судорог или второго агонального вдоха	Сатурская А.С. и соавт., 2015
	11500	Появление второго агонального вдоха, боковое положение	Лукьянова Л.Д. и соавт., 2009; Каркищенко Н.Н., 2017
		Резкое снижение мышечного тонуса и апнотическое дыхание	Свинов М.М. и соавт., 2001
		Асфиксия	Лукьянова Л.Д. и Кирова Ю.И., 2011
	11000	Появление второго агонального вдоха	Чернобаева Г.Н. и Лукьянова Л.Д., 1989; Ходорович Н.А. и Этеева Н.В., 2003
ВПП, время обратимой остановки дыхания, ВВП		Крыжановский Г.Н., 1991	
Крысы Спейг- Доули	10668	GT	Ghosh D. et al., 2012
	10668	GT и HST	Shrivastava K. et al., 2008
	9754	GT	Kumar S. et al., 2014; Jain K. et al., 2013, 2014
	9750	GT и HST	Purushothaman J. et al., 2008
	9250	GT	Jain K. et al., 2013
Мыши	10000-10500	Агональное состояние, появление второго агонального вдоха, потеря позы	Семенов Х.Х. и соавт., 2013; Ведунова М.В. и соавт., 2014; Kugimiya T. et al., 1984

Наиболее часто в качестве критерия ВЖ используют появление признаков нарушений дыхания и асфиксии, иностранные авторы определяют время, когда животное начинает задыхаться (Gasping Time, GT) (Ghosh D. et al., 2012; Jain K. et al., 2013, 2014; Kumar S. et al., 2014), а также время выживания (Hypoxic Survival Time, HST) (Kugimiya T. et al., 1984; Purushothaman J. et al., 2008; Shrivastava K. et al., 2008).

Известны и другие способы определения индивидуальной устойчивости к гипоксии: ступенчатый «подъем» животных в барокамере на площадки, соответствующие разным «высотам», до фиксирования агонального дыхания. Определяют индивидуальный высотный порог («высоту», на которой фиксируется агональное дыхание) (Шустов Е.Б. и соавт., 2013). Однако при таком исследовании разброс показателей среднеустойчивых крыс весьма значителен, что свидетельствует о недостаточной точности такого метода. При другом способе определения устойчивости к гипоксии проводят полуколичественную оценку угнетения и восстановления двигательной активности при «подъеме» на «высоту» 9000 м (Байбурина Г.А. и соавт., 2015). Способ обеспечивает повышение точности исследования при снижении вероятности гипоксического повреждения ЦНС в результате тестирования, однако не учитывает видовую и линейную специфичность устойчивости к гипоксии, поскольку максимальная «высота» в нем не является критической, например, для крыс Вистар (11500 м).

В целом, все перечисленные выше критерии времени жизни на «высоте» описывают реакции, происходящие при критическом нарушении оксигенации органов, которые приводят к появлению патологического дыхания, изменению двигательной активности и потере позы. Вероятно, поэтому многие авторы не определяют точный критерий, а используют либо их комбинацию, либо один из параметров. Таким образом, выбор адекватного показателя устойчивости животных к гипоксии является проблемным. В высотной физиологии (Газенко О.Г., 1987) таких показателей несколько: высотный порог, время жизни (для человека аналогом является резервное время пребывания на «высоте» до потери сознания), время поддержания позы (для человека аналогом является время сохранения деятельности). Дополнительным критерием устойчивости к гипоксии является стойкость гипоксических изменений в постгипоксическом периоде, которые отражаются таким показателем, как время восстановления позы животного при спуске с «высоты». Также в качестве дополнительного критерия могут использоваться некоторые биохимические показатели, в первую очередь, определение содержания лактата в крови (Bakker J. et al., 2013). Очевидно, что наиболее приемлемым критерием устойчивости к гипоксии следует считать асфиксию (или время, когда животное начинает задыхаться – GT (гаспинг-дыхание) в иностранной литературе), сопровождающуюся принятием бокового положения, т.е. потерей позы.

Определение устойчивости животных к гипоксии, как правило, проводят один раз, эксперимент выполняют «сразу» после воздействия (временной интервал в работах не указан) (Ghosh D. et al., 2012; Padhy G. et al., 2013; Jain K. et al., 2013, 2014), спустя час (Лукьянова Л.Д. и Богомоллов В.И., 1992), неделю (Крыжановский Г.Н. и соавт., 1991; Kumar S. et al., 2014), две недели (Лукьянова Л.Д. и Курлаев С.Н., 1992; Грек О.Р. и соавт., 2007) или месяц (Свинов М.М. и соавт., 2001; Лукьянова Л.Д. и соавт., 2009; Лукьянова Л.Д. и Кирова Ю.И., 2011). Некоторые авторы проводят тест дважды с интервалом в две недели (Сатурская А.С., 2015), а другие – трижды с интервалом в одну неделю (Padhy G. et al., 2013; Jain K. et al., 2013, 2014). Н.Н. Каркищенко (2017) рекомендует включать животных в эксперимент не ранее, чем через 12-15 дней после определения устойчивости к гипоксии, а Л.Д. Лукьянова и соавт. (2009, 2011) – через месяц, однако такое требование никак не обосновывается авторами.

Поскольку в литературе отсутствуют данные о каких-либо функциональных нарушениях у животных, подвергшихся воздействию гипоксии при определении устойчивости, срок проведения эксперимента после определения чувствительности к недостатку O_2 не является строго определенным. Однако по данным О.В. Макаровой (1997), у крыс Спрейг-Доули после многократного гипоксического воздействия газовой смесью, содержащей 10% O_2 (10 ежедневных воздействий), развивается бронхопневмония, поэтому целесообразно проводить эксперимент через какое-либо время после определения устойчивости к недостатку кислорода с целью нивелирования альтеративных и провоспалительных реакций.

Линии животных и критическая «высота»

В большинстве работ отечественных авторов, особенно посвященных изучению антигипоксантов, используются крысы Вистар (Шарапов В.И. и соавт., 1993; Соболева М.К. и соавт., 1993; Безруков В.В. и соавт., 2012; Tregub P. et al., 2013) или белые беспородные крысы (Крыжановский Г.Н. и соавт., 1991; Лукьянова Л.Д. и Богомоллов В.И., 1992; Свинов М.М. и соавт., 2001; Лукьянова Л.Д. и соавт., 2009; Лукьянова Л.Д. и Кирова Ю.И., 2011; Хачатурьян М.Л., 2012; Сатурская А.С., 2015). Животных помещают в барокамеру на «высоту», соответствующую 10000 или 198,3 мм рт.ст., 26,4 кПа (Зиновьев Ю.В. и соавт., 1988), 11000 (Чернобаева Г.Н. и Лукьянова Л.Д., 1989; Крыжановский Г.Н. и соавт., 1991; Лукьянова Л.Д. и Богомоллов В.И., 1992), 11500 или 157 мм рт.ст., 20,9 кПа (Шарапов В.И. и соавт., 1993; Агаджанян Н.А. и соавт., 1999; Свинов М.М. и соавт., 2001; Лукьянова Л.Д. и Кирова Ю.И., 2011; Hodkinson P.D., 2011; Tregub P. et al., 2013), 12000 м над уровнем моря или 145 мм рт.ст., 19,33 кПа (Сатурская А.С. и соавт., 2015). К группе высокоустойчивых относят тех животных, которые выдерживают в барокамере острую гипобарическую гипоксию не менее 1200 сек (ВЖ больше 1200 сек), к низкоустойчивым – животных, выдерживающих острую гипобарическую гипоксию

менее 150-180 сек (ВЖ меньше 150 сек) (Березовский В.А., 1978; Лукьянова Л.Д., 2003, 2004; Семенов Х.Х., 2006) или 180 сек (Каркищенко Н.Н., 2017). Другие авторы относят к низкоустойчивым животным тех особей, время жизни которых на «высоте» до 3 или 5 мин, а к высокоустойчивым – более 10 или 15 мин (Ходорович Н.А. и Эттева Н.В., 2003; Грек О.Р. и соавт., 2007; Безруков В.В. и соавт., 2012). При этом показатель времени жизни в барокамере у высокоустойчивых животных обязательно должен быть как минимум в три раза выше, чем у низкоустойчивых (Чернобаева Г.Н. и Лукьянова Л.Д., 1989; Каркищенко Н.Н., 2017).

Однако в большинстве иностранных работ исследователи используют крыс линии Спрейг-Доули, которых помещают в барокамеру на «высоту» 9250, 9754 м или 10668 м. Временная шкала, по которой определяется чувствительность, варьирует у разных авторов, но в большинстве исследований животных, начинающих задыхаться через 5-10 мин относят к низкоустойчивым или чувствительным к гипоксии, а через 25 и более мин – к высокоустойчивым или толерантным.

Поскольку крыс Вистар в экспериментах по определению устойчивости к гипоксии помещают на большую критическую «высоту», чем крыс линии Спрейг-Доули, и по данным О.В. Макаровой (1997) показано, что при воздействии гипоксической смеси (2,5% O₂) время жизни крыс Вистар в 1,7 раза больше, чем крыс Спрейг-Доули, представляется вероятным, что крысы Вистар в принципе являются более устойчивыми к кислородной недостаточности, чем Спрейг-Доули, что следует учитывать при выборе линии животных для конкретного исследования.

Скорость «подъема» на «высоту»

«Подъем» животных в барокамере осуществляется с определенной скоростью, значение которой варьирует в работах разных авторов. В некоторых исследованиях она составляет около 180 м/с или 165 м/с, то есть «подъем» осуществляется примерно за 1 мин (Свинов М.М. и соавт., 2001; Хачатурьян М.Л., 2012; Семенов Х.Х. и соавт., 2013; Ведунова М.В. и соавт., 2014; Сатурская А.С., 2015). Н.Н. Каркищенко (2017) рекомендует использовать скорость «подъема» 120-180 м/с, так как при такой скорости у животных практически не включаются срочные адаптационные реакции. В других работах скорость составляет 50 м/с, то есть «подъем» длится около 4 мин (Шарапов В.И. и соавт., 1993; Грек О.Р. и соавт., 2002; Безруков В.В. и соавт., 2012). В некоторых экспериментах животных «поднимают» на «высоту» 7 км за 3 мин, каждые следующие 0,5 км – за 30 сек с экспозицией на данной «высоте» в течение 2,5 мин (Зиновьев Ю.В. и соавт., 1988).

Таким образом, в настоящее время при исследовании как молекулярно-биологических, так и биохимических параметров у животных, различающихся по устойчивости к гипобарической гипоксии, не существует общепринятой методики. В работах разных авторов варьируют вид животных, критическая «высота», скорость «подъема» и критерий устойчивости к гипоксии. Методика дифференцировки на высокоустойчивых и низкоустойчивых к недостатку O₂

животных также различается, однако многие авторы указывают на необходимость трехкратного превышения показателя времени жизни на «высоте» у высокоустойчивых животных по сравнению с низкоустойчивыми (Чернобаева Г.Н. и Лукьянова Л.Д., 1989; Каркищенко Н.Н., 2017). Существующие методы определения устойчивости к гипоксии не учитывают половые и линейные различия (Ходорович Н.А. и Этгеева Н.В., 2003; Семенов Х.Х., 2006). В связи с этим, трудно сопоставить результаты исследований, полученные разными авторами. Кроме того, существует проблема сроков включения животных в эксперимент после определения устойчивости к дефициту O_2 : в литературе отсутствуют данные о каких-либо функциональных нарушениях у особей, подвергшихся воздействию гипоксии и разделению на высокоустойчивых и низкоустойчивых. Однако очевидно, что различной степени выраженности последствия пребывания на критической «высоте» могут проявляться в ранние сроки после воздействия. Рекомендованные Н.Н. Каркищенко (2017) и Л.Д. Лукьяновой и соавт. (2009, 2011) сроки (12-15 дней, месяц после тестирования) в литературе не обоснованы, а, по данным О.В. Макаровой (1997), у крыс Спрейг-Доули после многократного гипоксического воздействия газовой смесью, содержащей 10% O_2 (10 ежедневных воздействий), развивается бронхопневмония, поэтому необходимо проведение дополнительных исследований морфофункциональных изменений в органах крыс в отдаленные периоды после определения устойчивости к гипоксии.

1.1.5.2 Факторы, влияющие на устойчивость к гипоксии

Помимо индивидуальных особенностей, на устойчивость к гипоксии могут влиять различные факторы. Они вызывают у некоторых людей, находящихся на уровне моря, реакцию, которая соответствует пребыванию на физиологической высоте. К таким факторам относится анемия (анемическая гипоксия), курение и потребление алкоголя, которые приводят к повышению базальных уровней карбоксигемоглобина и гистотоксической гипоксии – 3 сигареты или 30 мл алкоголя эквивалентны 600 м физиологической высоты (Carrier B. et al., 2006). Существуют также возрастные, половые и индивидуально-типологические особенности устойчивости к кислородной недостаточности у людей (Кривошеков С.Г. и соавт., 2014).

Помимо этого, следующие факторы могут влиять на ответ организма при изменении высоты: лекарства, такие как аспирин, нитриты, сульфаты; наличие хронической обструктивной болезни легких, эмоциональный статус, исходный уровень метаболизма, температура тела (так, высокая температура способствует меньшему насыщению гемоглобина кислородом), высокий или низкий рН (низкий рН ухудшает связывание гемоглобина с кислородом, требуется более высокое pO_2).

Одним из важных, но не до конца изученных факторов, влияющих на устойчивость к гипоксии, являются биологические ритмы. Биоритмы – периодически повторяющиеся изменения

характера и интенсивности биологических процессов и явлений. В настоящее время общепризнано, что ритмичность биологических процессов является фундаментальным свойством всей живой материи. Биоритмы выявляются на всех уровнях ее организации – молекулярном, клеточном, организменном, популяционном и биосферном (Бродский В.Я. и соавт., 2014; Halberg F. et al., 2008). В зависимости от длины периода, биологические ритмы классифицируются на ультрадианные – с длиной периода менее 20 ч, циркадианные – от 20 до 28 ч, инфрадианные – от 28 ч до 30 сут, сезонные и многолетние (Halberg F. и Nelson W., 1978). По данным литературы, была установлена суточная ритмичность чувствительности животных к недостатку O_2 : в вечерние и ночные часы время жизни в условиях гипобарической гипоксии меньше, чем в дневные (Рафиков А.М. и Агаджанян Н.А., 1971; Kwarecki K. et al., 1984; Masukawa T. и Tochino Y., 1993). Также известно, что существуют сезонные колебания устойчивости к гипоксии. Минимальное количество низкоустойчивых особей зарегистрировано в осенне-зимний период, а максимальное – в летний. Доля высокоустойчивых животных была максимальной с ноября по январь и минимальной в мае-июне. Среднеустойчивые к гипоксии животные составляют большинство популяции с февраля по июнь (Чернобаева Г.Н. и Лукьянова Л.Д., 1989).

Таким образом, в настоящее время наиболее изучено влияние на устойчивость к гипоксии циркадианных биоритмов, сформировавшихся в результате адаптации организма к условиям периодической смены дня и ночи. Инфрадианные ритмы разной периодичности установлены в динамике многих физиологических параметров у человека и лабораторных животных: темпах роста, основного обмена, сердечно-сосудистой и дыхательной системы (Шабатура Н.Н., 1989). Диатроптовым М.Е. и соавт. (2014) у млекопитающих и птиц был установлен инфрадианный 4-суточный биоритм концентрации глюкокортикоидных гормонов и связанные с ним колебания ряда физиологических показателей: двигательной активности, митотического индекса эпителия пищевода, субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови, морфофункционального состояния тимуса и селезенки. Кроме того, показано, что выраженность системной воспалительной реакции, индуцированной введением липополисахарида (ЛПС), зависит от 4-суточного инфрадианного биоритма концентрации кортикостерона в сыворотке крови: проявления системной воспалительной реакции более выражены при введении ЛПС за сутки до батифазы биоритма (Диатроптов М.Е. и соавт., 2013).

Срочная адаптивная реакция в ответ на гипоксическое воздействие сопровождается поступлением в кровоток адреналина и норадреналина из мозгового вещества надпочечников, а затем глюкокортикоидных гормонов из коркового вещества (Меерсон Ф.З., 1993; Sapolsky R.M. et al., 2000). Известно, что глюкокортикоиды при стрессорных воздействиях обеспечивают комплекс адаптивных процессов: мобилизацию энергетических ресурсов, стабилизацию

клеточных мембран и снижение уровня ПОЛ, мощный противовоспалительный эффект и усиление эритропоеза (Sapolsky R.M. et al., 2000). Показано, что *in vitro* глюкокортикоиды увеличивают экспрессию генов, ответственных за развитие адаптационных механизмов в ответ на гипоксию (Kodama T. et al., 2003). Важная адаптивная роль глюкокортикоидов при гипоксии подтверждается тем, что профилактическое назначение синтетических глюкокортикоидов предотвращает развитие горной болезни (Johnson T.S. et al., 1984). А.М. Рафиковым и Н.А. Агаджаняном (1971) было показано, что, на фоне низкого суточного содержания кортикостерона, преднизолон значительно повышает устойчивость животных к острой гипоксии.

Однако в литературе отсутствуют данные о зависимости устойчивости к гипоксии от фазы инфрадианного 4-суточного биоритма кортикостерона. Вместе с тем изучение такой зависимости представляется актуальным, поскольку в исследованиях эффективности антигипоксантов и адаптации к гипоксии не учитываются инфрадианные биоритмы, что может повлиять на результаты экспериментов. В некоторых работах (Березовский В.А., 1978; Агаджанян Н.А. и соавт., 1999) показано, что при повторных определениях устойчивости к гипоксии структура распределения животных по группам высокоустойчивых (ВУ), среднеустойчивых (СУ) и низкоустойчивых (НУ) может меняться. В частности, В.А. Березовским (1978) показано, что при помещении крыс Вистар на «высоту» 12000 м над уровнем моря среди них выявляются как ВУ, так и СУ и НУ к гипоксии животные. Среднее время выживания для всей группы составляло 203 сек, но у пяти особей время выживания превышало 400 сек. Результаты повторных индивидуальных испытаний показали, что количество животных, которые стабильно воспроизводят принадлежность к ВУ или НУ группе, при втором испытании значительно уменьшается. Возможно, такие результаты объясняются не только способностью крыс адаптироваться после первого гипоксического воздействия, но и определяются, в частности, календарной датой, когда проводилось повторное тестирование – в акрофазу или батифазу инфрадианного 4-суточного биоритма кортикостерона.

В литературе при определении устойчивости к гипоксии лабораторных животных, как правило, время суток и сезон года не указываются. Вероятно, влияние циркадианных и сезонных, и, особенно, инфрадианных биоритмов, не учитывается при проведении исследований у высокоустойчивых и низкоустойчивых к кислородной недостаточности животных.

1.1.5.2 Физиологическая и биохимическая характеристика высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии животных

Поскольку проблема устойчивости к дефициту O_2 является актуальной, в настоящее время ведется активный поиск маркеров для скрининга особей на устойчивость или чувствительность к гипоксии и стрессу. В первую очередь, изучаются уровни активности различных ферментов, а

также содержание гормонов в крови, поскольку гипоксическое воздействие является стрессом и способствует изменению концентрации катехоламинов (адреналина и норадреналина) и кортикостерона. Адреналин и норадреналин выделяются почти сразу после ответа симпатической нервной системы на стресс. Проведены исследования содержания гормонов «сразу» после тестирования (временной интервал не указан) на «высоте» 10668 м у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Спрейг-Доули. В работе D. Ghosh и соавт. (2012) содержание норадреналина в плазме крови было значительно выше у высокоустойчивых животных, чем у низкоустойчивых. Значительное повышение концентрации норадреналина позволяет высокоустойчивым крысам справляться со стрессом более эффективно, чем низкоустойчивым животным. Очень чувствительным маркером стресса у млекопитающих считается выделение гипофизом пролактина (Gala R., 1990). Помимо его участия в репродуктивных процессах, пролактин играет роль в поддержании постоянства внутренней среды, регулируя функционирование иммунной системы, осмотический баланс и ангиогенез. Адаптация к стрессу связана с уменьшением содержания пролактина (Gala R., 1990; Richalet J.P. et al., 2010). Показано, что высокоустойчивые к гипоксии животные имеют значительно более низкое содержание пролактина в плазме, чем низкоустойчивые (Ghosh D. et al., 2012), что свидетельствует о более эффективной адаптации высокоустойчивых крыс к гипоксическому воздействию.

В ранние сроки после стрессорного воздействия повышается концентрация кортикостерона в плазме крови. Литературные сведения по содержанию кортикостерона у высокоустойчивых и низкоустойчивых крыс противоречивы: по данным D. Ghosh и соавт. (2012), не было выявлено значительных различий в уровне общего кортикостерона в плазме крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс сразу после тестирования, что согласуется с данными О.Р. Грека и соавт. (Грек О.Р. и соавт., 2007). Однако по данным K. Jain et al. (2014), в плазме крови у низкоустойчивых крыс Спрейг-Доули сразу после гипоксического воздействия содержание кортикостерона было выше, чем у высокоустойчивых животных.

Показано, что физическая выносливость организма, определяемая по продолжительности удерживания животных на вертикальной плоскости, у высокоустойчивых к гипоксии крыс значительно выше, чем у низкоустойчивых, что свидетельствует о ее прямой взаимосвязи с устойчивостью к гипоксии. Установлено, что продолжительность жизни высокоустойчивых к гипоксии крыс на 15% выше, чем низкоустойчивых (Безруков В.В. и соавт., 2012).

Низкоустойчивые к гипоксии – животные со слабым типом нервной системы, с повышенной эмоциональной реактивностью, с менее развитым внутренним торможением. Характеризуются повышенной возбудимостью и быстрой истощаемостью возбудительного процесса, судорожная готовность выражена гораздо сильнее. Они отвечают на гипоксическое

воздействие возбуждением и активацией двигательной реакции. Низкоустойчивые к гипоксии животные более предрасположены к развитию таких заболеваний, как сахарный диабет, ожирение, тиреотоксикоз, атеросклероз и др. (Лукьянова Л.Д., 2003).

Высокоустойчивые к гипоксии крысы обладают более выраженным внутренним торможением, более устойчивы к нембуталовому наркозу. Более высокая устойчивость таких крыс к воздействию острой гипоксии коррелирует с более низкой тревожностью, малой чувствительностью к любым провоцирующим воздействиям, склонностью к социальному доминированию и умеренной агрессивности. На острую гипоксию, ишемию мозга, отравление угарным газом они реагируют тормозной реакцией (Лукьянова Л.Д., 2003).

У высокоустойчивых и низкоустойчивых к экстремальной гипобарической гипоксии крыс обнаружены некоторые различия в исходном распределении сердечного выброса: высокоустойчивые животные отличались меньшим кровотоком в скелетных мышцах и более высоким кровотоком в мозге, сердце, почках и легких. Наиболее выражены эти различия между высокоустойчивыми и низкоустойчивыми крысами при стрессорных реакциях. У белых беспородных крыс-самцов, как у высокоустойчивых, так и у низкоустойчивых, при острой тяжелой гипоксии (3% O₂) всегда происходит снижение АД, однако степень снижения неодинакова: у высокоустойчивых животных при исходном среднем АД (110-120 мм рт.ст.) наблюдалось снижение до 50-60 мм рт.ст., у низкоустойчивых – до 30 и ниже. Снижение АД у крыс при гипоксии объясняется вазодилатацией в большей части органов и тканей, включая почки, скелетные мышцы, головной мозг. Также происходит снижение ЧСС: у высокоустойчивых животных на 10-20 ударов в мин, у низкоустойчивых – более чем на 40-50 ударов в мин. Следовательно, высокоустойчивые к недостатку кислорода животные характеризуются благоприятным кислородным режимом, имеют предпосылки для более длительного выживания в условиях тяжелой острой гипоксии по сравнению с низкоустойчивыми (Саноцкая Н.В. и соавт., 2004).

В последние десятилетия интенсивно изучаются молекулярно-биологические и метаболические различия высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии животных. Известно, что низкоустойчивые к недостатку O₂ крысы по сравнению с высокоустойчивыми характеризуются неэкономичным его расходом – на единицу массы ткани в единицу времени они тратят больше, чем высокоустойчивые (Лукьянова Л.Д., 2003). Особенности метаболизма сочетаются с различной стратегией адаптации клеток к воздействию физических факторов высокогорной среды. Экспрессия наиболее изученных белков теплового шока (Heat Shock Proteins) HSP60, HSP70 и HSP90 в миокарде у высокоустойчивых к гипоксии крыс была значительно повышена, что свидетельствует об их способности переносить длительное воздействие дефицита O₂ и более эффективной адаптации (Jain K. et al., 2013).

По данным литературы известно, что устойчивость к гипоксии связана с антиоксидантной защитой (Sinha S. et al., 2009). Показано, что в сердце у высокоустойчивых к гипоксии крыс Спрейг-Доули после гипоксического воздействия уровень таких ферментов, как супероксиддисмутаза и каталаза, которые защищают клетки от окислительного стресса, выше (Jain K. et al., 2013). Таким образом, активность этих ферментов повышена у высокоустойчивых животных, что позволяет уменьшить индуцированный гипоксией окислительный стресс.

Также проводились исследования маркеров окислительного стресса и оказалось, что в сердце у низкоустойчивых к гипоксии крыс почти в 8 раз выше содержание малонового диальдегида, который образуется при воздействии АФК и является одним из маркеров окислительного стресса (Jain K. et al., 2013). В работе G. Padhy и соавт. (2013) показано, что содержание карбонилированных белков, характеризующих окислительный стресс, повышалось в плазме крови у низкоустойчивых к гипоксии крыс Спрейг-Доули сразу после третьего гипоксического воздействия на «высоте» 9754 м более значительно, чем у высокоустойчивых.

В сердце и плазме крови крыс Спрейг-Доули сразу после тестирования на устойчивость к гипоксии было изучено содержание эритропоэтина и эндотелина-1, играющих важную роль в поддержании сосудистой целостности. Эндотелин регулирует тонус сосудов в легких при воздействии гипоксического стресса, у чувствительных к гипоксии животных его экспрессия повышалась в 30 раз в миокарде, что индуцирует его гипертрофию и нарушения функции сердца (Bupha-Intr T. et al., 2012; Jain K. et al., 2013). В крови его концентрация также была повышена у низкоустойчивых к гипоксии крыс (Jain K. et al., 2014). Содержание эритропоэтина, стимулирующего эритропоэз, повышалось в сердце и крови у высокоустойчивых к гипоксии крыс, а у низкоустойчивых, напротив, снижалось (Jain K. et al., 2013). Уровень NO в миокарде у высокоустойчивых к недостатку O₂ животных повышался в 2 раза, что увеличивает способность поддерживать нормальную дыхательную деятельность в течение длительного времени при острой гипоксии (Jain K. et al., 2013, 2014).

Показано, что люди отличаются значительной индивидуальной вариабельностью уровней экспрессии HIF-1 α и других HIF-зависимых генов в лейкоцитах, что свидетельствует о фенотипических различиях его регуляции (Brooks J.T. et al., 2008; van Patot M.C. и Gassman M., 2011). Выявлено наличие обратной зависимости между базовым содержанием HIF-1 α в неокортексе и устойчивостью беспородных самцов крыс к гипоксии: у низкоустойчивых особей в нормоксических условиях уровень HIF-1 α был в 1,7 раза выше, чем у высокоустойчивых (Кирова Ю.И. и соавт., 2012). Показано, что острая гипобарическая гипоксия (5486 м) индуцирует более сильную активацию HIF-1 в легких у более устойчивых к гипоксии крыс Хилтоп по сравнению с менее устойчивыми крысами Спрейг-Доули (Engelbretsen B.J. et al., 2006). В сердце у высокоустойчивых к гипоксии крыс Спрейг-Доули сразу после тестирования на

устойчивость к недостатку кислорода уровень синтеза белка HIF-1 α повышался в 2 раза, в то время как у низкоустойчивых повышение не было столь значительным (Jain K. et al., 2013).

Имеющиеся данные об особенностях реакции эндокринной системы крыс с различной устойчивостью к гипоксии позволяют предположить существование различий реакции других интегративных систем организма, в том числе иммунной системы и тесно связанных с ней воспалительных процессов у высокоустойчивых и низкоустойчивых к кислородной недостаточности животных.

Сведения о содержании в периферической крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии животных интерлейкинов, иммуноглобулинов и гормонов противоречивы (Грек О.Р. и соавт., 2007; Комелькова М.В., 2015; Кузина О.В. и соавт., 2014; Сатурская А.С., 2015). По данным А.С. Сатурской (2015), у высокоустойчивых к гипоксии крыс было выше содержание IL-10 в сыворотке крови по сравнению с низкоустойчивыми животными, а концентрация IL-1 β и TNF α не различалась. Содержание иммуноглобулинов М, G и А также не различалось у высокоустойчивых и низкоустойчивых к дефициту O₂ крыс. В литературе представлены данные об отсутствии различий лейкоцитарной формулы у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии животных, а также клеточного состава костного мозга и содержания лимфоцитов в тимусе (Комелькова М.В., 2015). Однако в работе М.В. Комельковой (2015) не учитывались половые различия, она проводила эксперименты на самцах и самках.

Поскольку известно, что гипоксия связана с воспалением (Hirota K., 2015; Kiers H.D. et al., 2016; Devraj G. et al., 2017), был исследован уровень экспрессии ядерного фактора NF- κ B, инициирующего воспаление, в цитозоле и ядрах кардиомиоцитов. В миокарде у низкоустойчивых к гипоксии крыс уменьшалась цитозольная экспрессия NF- κ B и увеличивалась ядерная, что свидетельствует об его активации. Экспрессия провоспалительного цитокина TNF α в миокарде у низкоустойчивых животных была выше, что также отражает активацию воспалительного ответа (Jain K. et al., 2014).

Отечественными авторами используются разные линии крыс обоего пола, при этом критическая «высота» и критерии определения устойчивости к гипоксии существенно варьируют, поэтому представленные в литературе данные трудно поддаются сопоставлению. Суммарные сведения о различиях высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Спрейг-Доули, выявленные при сходных методических подходах, представлены в таблице 2.

Различия высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Спрейг-Доули «сразу» после определения устойчивости к недостатку кислорода (по данным Ghosh D. et al., 2012; Jain K. et al., 2013; Padhy G. et al., 2013; Jain K. et al., 2014)

Самцы крыс Спрейг-Доули	Высокоустойчивые	Низкоустойчивые
Масса надпочечников	Больше	Меньше
В плазме крови		
Содержание кортикостерона	Меньше	Больше
Содержание норадреналина	Больше	Меньше
Содержание пролактина	Меньше	Больше
Содержание тестостерона	Больше	Меньше
Содержание карбонилированных белков	Меньше	Больше
Уровень NO	Больше	Меньше
Содержание эритропоэтина	Больше	Меньше
Содержание эндотелина-1	Меньше	Больше
В сердце		
Содержание малондиальдегида	Меньше	Больше
Уровень АФК	Меньше	Больше
Содержание карбонилированных белков	Меньше	Больше
Активность супероксиддисмутазы	Больше	Меньше
Активность каталазы	Больше	Меньше
Уровень NO	Больше	Меньше
Содержание эритропоэтина	Больше	Меньше
Содержание эндотелина-1	Меньше	Больше
Ядерная экспрессия NF-κB	Меньше	Больше
Цитозольная экспрессия NF-κB	Больше	Меньше
TNFα	Меньше	Больше
HSP60, 70, 90	Больше	Меньше

Таким образом, молекулярные механизмы гипоксии активно изучаются в настоящее время. Множество работ посвящено HIF-1 – фактору, индуцируемому гипоксией, изучено его влияние практически на все процессы в организме. Несмотря на то, что существование различий в устойчивости к гипоксии разных видов животных и человека хорошо известно, в настоящее время они остаются недостаточно изученными. Существующие методики определения устойчивости к недостатку кислорода в значительной мере различаются, не учитывают видовые, возрастные, половые различия, влияние внешних факторов, в частности, инфраничных биоритмов. Поэтому данные о высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии животных трудно сопоставимы. Однако можно заключить, что повышенные уровни активности ферментов антиоксидантной защиты у высокоустойчивых к гипоксии животных способствуют их большей продолжительности жизни, меньшей чувствительности к воздействию острой гипоксии и других факторов.

1.2 Воспаление

Воспаление – сложный иммунологически обусловленный патологический процесс, являющийся универсальным комплексом сосудисто-мезенхимальных реакций на повреждение, вызванное экзогенными и эндогенными агентами. Вследствие альтеративного и/или инфекционного воздействия в тканях развиваются локальные воспалительные реакции, которые в той или иной мере сопровождаются выраженной системной воспалительной реакцией (Косырева А.М., 2018; Vosmann M. и Ward P.A., 2013; Fang H. et al., 2015). Воспаление лежит в основе большинства заболеваний человека. В зависимости от длительности течения, различают острое и хроническое воспаление (Литвицкий П.Ф., 2006). В развитии воспаления ключевую роль играет активация фактора NF-κB, которая запускает реакции врожденного и адаптивного иммунитета.

1.2.1 Ключевые молекулярные механизмы воспаления

NF-κB (Nuclear Factor-κB, ядерный фактор «каппа-би») – общее название для семейства транскрипционных факторов, состоящего из белков RelA (p65), RelB, c-Rel, p50 (p105/NF-κB1) и p52 (p100/NF-κB2). Впервые был описан Ranjan Sen и David Baltimore в 1986 г. как ядерный фактор, необходимый для экспрессии гена, кодирующего легкую цепь иммуноглобулина κ в В-лимфоцитах (Sen R. и Baltimore D., 1986). Со времени его открытия в результате многих исследований показано, что NF-κB является одним из главных биологических регуляторов, он участвует в многочисленных клеточных реакциях и развитии воспалительных заболеваний человека (Courtois G. и Gilmore T.D., 2006; Hayden M.S. и Ghosh S., 2012; Hirota K., 2015; Liu T. et al., 2017). NF-κB является ключевым медиатором воспалительного ответа и его активация способствует увеличению продукции различных факторов, таких как цитокины и хемокины (TNFα, IL-1, 2, 6, 8, 12), белки острой фазы, молекулы адгезии (ICAM-1, Inter-Cellular Adhesion Molecule 1) и ферменты (индуцируемая NO-синтаза (iNOS, Inducible Nitric Oxide Synthase), циклооксигеназа-2 (COX-2, Cyclooxygenase-2)) (Kletsas D. et al., 2004; Hayden M.S. и Ghosh S., 2012; Liu T. et al., 2017). NF-κB активируется посредством фосфорилирования различных молекул, которое инициируется активацией клеточных поверхностных рецепторов (Толл-подобных рецепторов, Toll-Like Receptors, TLRs), распознающих специфические патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMP, Pathogen-Associated Molecular Patterns) и молекулы, связанные с повреждением (DAMP, Damage-Associated Molecular Patterns).

Все белки семейства NF-κB содержат Rel-домен – консервативную N-концевую последовательность из 300 аминокислот. Поскольку NF-κB является гетеро- или гомодимером, состоящим из двух субъединиц, Rel обеспечивает димеризацию, связывание с ДНК и белками

семейства IκB, которые ингибируют NF-κB (Ghosh S. et al., 1998; Hayden M.S. и Ghosh S., 2012). Таким образом, NF-κB находится в цитоплазме в неактивной форме, в комплексе с белками семейства IκB, которое состоит из 6 белков: IκB-α, IκB-β, IκB-γ (С-концевой домен белка p100 семейства Rel), IκB-δ (С-концевой домен белка p105 семейства Rel), IκB-ε и Bcl-3. Все они содержат анкириновый повтор, который обеспечивает взаимодействие с NF-κB и обуславливает его цитоплазматическую локализацию (Mitchell S. et al., 2016). Различные экзогенные и эндогенные молекулы и стимулы (цитокины, факторы роста, ЛПС, вирусы и гипоксия) активируют сигнальные пути, которые воздействуют на IκB (Ghosh S. et al., 1998; Karin M., 2006; Sakai J. et al., 2017), в частности, киназу IκB – ИКК. Комплекс ИКК фосфорилирует IκB, который разрушается в протеасоме, что способствует освобождению NF-κB. Затем NF-κB перемещается в ядро и связывается с промотерами контролируемых им генов (Oeckinghaus A. и Ghosh S., 2009; Liu T. et al., 2017).

Члены семейства NF-κB могут формировать несколько комбинаций гетеро- и гомодимеров, в соответствии с которыми активируется комплекс регуляторных механизмов, что приводит к активации или репрессии сотни генов (Pahl H.L., 1999; Perkins N.D. и Gilmore T.D., 2006; Perkins N.D., 2007). Многие из этих генов (например, гены цитокинов, хемокинов или мембранных рецепторов), вовлечены в иммунный ответ (Hayden M.S. et al., 2006; Liu T. et al., 2017). Репрессорами генной экспрессии являются гомодимеры p50 и p52, в то время как c-Rel, RelB и p65, в любых сочетаниях, в том числе с p50 и p52, играют роль активаторов транскрипции.

NF-κB может активироваться различными провоспалительными стимулами (такие как TNFα, IL-1β, ЛПС, лимфотоксин β, вирусные инфекции, лиганд CD40), посредством как минимум двух особых механизмов: канонического и неканонического (Karin M. и Greten F.R., 2005; Mitchell S. et al., 2016; Liu T. et al., 2017; Sun S.C., 2017). Они играют комплексную роль в контроле воспаления и могут регулировать, в зависимости от условий их активации, как провоспалительные, так и противовоспалительные процессы. Активация канонического пути происходит при воздействии множества различных стимулов, таких как провоспалительные цитокины (TNFα и IL-1β), она является кратковременной, не зависит от синтеза белка и имеет разнообразные функции. Напротив, активация неканонического пути происходит в ответ на определенные стимулы, главным образом, BAFF – B-cell Activating Factor (фактор, активирующий В-клетки), является длительной, зависит от синтеза белка и имеет специфические функции (Sun S.C., 2017).

Канонический путь, опосредующий реакции врожденного и адаптивного иммунитета, зависит от активации киназы ИККβ, которая фосфорилирует IκBα по Ser32 и Ser36, что приводит к его протеасомной деградации, транслокации RelA/p50 димеров NF-κB в ядро и индукции транскрипции ответных генов (Hayden M.S. и Ghosh S., 2012). Неканонический путь,

контролирующий развитие и функционирование первичных и вторичных лимфоидных органов и адаптивный иммунный ответ, зависит от активности NF-κB-индуцирующей киназы (NIK, NF-κB-Inducing Kinase). Далее происходит активация IKKα, фосфорилирующей p100, которая убиквитинируется и деградирует в p52, формируются гетеродимеры из RelB/p52, которые транслоцируются в ядро (Sun S.C., 2017).

Активация NF-κB и иммунной системы в ответ на введение ЛПС реализуется, главным образом, с помощью канонического пути через TLR4 за счет повышения синтеза таких цитокинов, как TNFα и IL-1β (Sakai J. et al., 2017). NF-κB – ключевой фактор иммунного ответа, который регулирует клеточные иммунные функции в макрофагах, эпителиальных клетках, нейтрофилах, дендритных клетках, Т- и В-лимфоцитах (Liu T. et al., 2017).

Таким образом, ядерный фактор NF-κB является ключевым медиатором воспалительного ответа. Активируясь под влиянием таких молекул, как ЛПС, он способствует увеличению продукции провоспалительных цитокинов и хемокинов, синтезу белков острой фазы, молекул адгезии и развитию выраженной воспалительной реакции.

1.2.2 Модель системной воспалительной реакции

Компонент клеточной стенки грамотрицательных бактерий – липополисахарид (ЛПС, «эндотоксин») – играет ключевую роль в развитии бактериальной инфекции и сепсиса (Rietschel E.T. и Brade H., 1992; Heine H. et al., 2001). ЛПС вызывает множество патофизиологических реакций, таких как лихорадка, лейкопения, тахикардия, гипотензия, ДВС-синдром и полиорганная недостаточность, которые могут приводить к септическому шоку и летальному исходу у 20-50% больных (Nogare D., 1991; Rangel-Frausto M.S., 1999).

Хотя существует множество вариаций состава эндотоксинов у бактерий разных серотипов, они имеют общую структурную организацию. Эндотоксины – амфифильные молекулы, состоящие из гидрофильной полисахаридной части и ковалентно связанного гидрофобного липидного компонента – липида А. Полисахаридная часть может быть разделена на два домена – ядерную и О-специфичную цепь, состоящие из последовательности повторяющихся идентичных полисахаридов (Luderitz O. et al., 1982). Существует множество типов моносахаридов, из которых состоит О-цепь, и, таким образом, эта часть молекулы эндотоксина уникальна и обеспечивает его структуру и характеристики, зависящие от происхождения бактерии (то есть серотипа) (Rietschel E.T. et al., 1996). Липид А, напротив, высококонсервативен среди биологически активных эндотоксинов (Zahringer U. et al., 1994).

Наиболее широко изученной моделью системной воспалительной реакции является введение составной части эндотоксинового комплекса – ЛПС грызунам (мышам или крысам). При внутривенной или внутрибрюшинной инъекции ЛПС индуцируется системная

воспалительная реакция, которая имеет некоторое сходство с системным воспалительным ответом у пациентов с сепсисом. Например, циркулирующие концентрации некоторых цитокинов, таких как TNF α , IL-1, 6 и 10, которые способны индуцировать патологические изменения в органах, обычно увеличиваются как при введении ЛПС у грызунов, так и у больных сепсисом (Kellum J.A. et al., 2007; Mannel D.N., 2007; Cinel I. и Opal S.M., 2009; Kosyreva A.M. et al., 2012; Fang H. et al., 2015). В развитии системной воспалительной реакции ключевую роль играет кислородная недостаточность, возникающая в результате микроциркуляторных нарушений, обусловленных диссеминированным внутрисосудистым свертыванием (Муздубаева Б.Т., 2016; Cinel I. и Opal S.M., 2009). Устойчивость к развитию системной воспалительной реакции определяется многими факторами, такими как пол и возраст, но также зависит от индивидуальных особенностей организма (Косырева А.М. и соавт., 2018; Holley H.S. et al., 2012; Kosyreva A.M. et al., 2018).

Введение лабораторным животным очищенного ЛПС («эндотоксина») внутрибрюшинно или внутривенно приводит к системной воспалительной реакции и активации врожденного и адаптивного иммунитета. При введении достаточно большой дозы ЛПС у животных возникают физиологические и биохимические изменения, сходные с граммотрицательным сепсисом у людей (Fink M.P., 2014). По сравнению с людьми, мыши менее чувствительны к токсическим или летальным эффектам ЛПС. Доза ЛПС, которая приводит к гибели примерно половины мышей (то есть летальная доза 50, ЛД50) – около 1-25 мг/кг (McCuskey R.S. et al., 1984; Reynolds K. et al., 2002). Эта доза примерно в 1 000 000 раз выше, чем стандартная доза ЛПС (2-4 нг/кг), которая используется в исследованиях на волонтерах для индукции симптомов (лихорадки или боли в мышцах) и продукции провоспалительных цитокинов, таких как TNF α (Barber A.E. et al., 1995; Suffredini A.F. et al., 1995). ЛД50 для мышей примерно от 1000 до 10000 раз выше, чем доза ЛПС, которая проявляется системной воспалительной реакцией у людей (Taveira da Silva A.M. et al., 1993; Fink M.P., 2014).

Развивающаяся при введении эндотоксина граммотрицательных бактерий системная воспалительная реакция опосредуется взаимодействием бактериальных продуктов с TLR4-рецептором (Palsson-McDermott E.M. и O'Neill L.A., 2004; Liu S.F. и Malik A.B., 2006). Он экспрессируется на поверхности как иммунокомпетентных клеток, таких как моноциты и макрофаги, так и многих других типов клеток, включая альвеолоциты и кардиомиоциты. Внутриклеточные сигнальные пути, которые запускаются взаимодействием ЛПС с TLR4, детально изучены (рис. 3) и включают активацию адаптерных белков, таких как TRAF6 (TNF Receptor-Associated Factor 6, фактор 6, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухолей) и MyD88 (Myeloid Differentiation Primary Response Gene-88) (Parker L.C. et al., 2007; Yamamoto M. и Akira S., 2010; Rossol M. et al., 2011; Liu T. et al., 2017). Это взаимодействие

приводит к активации ИКК и разрушению в протеасоме IκB, что обуславливает повышение экспрессии ядерного фактора NF-κB, его стабилизацию и транслокацию в ядро (Blackwell T.S. et al., 2000; Cinel I. и Opal S.M., 2009; van der Poll T. et al., 2017).

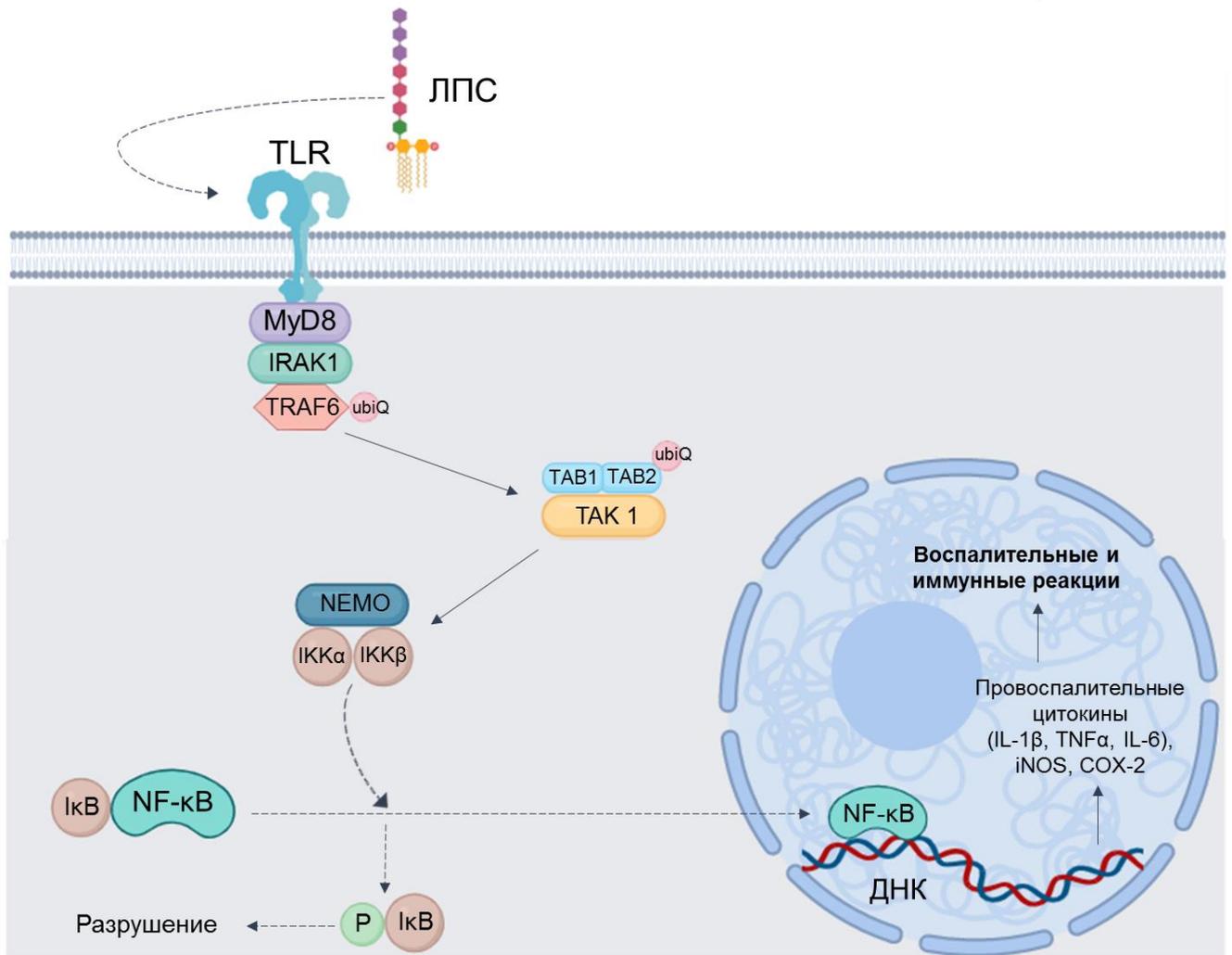


Рис. 3. Активация NF-κB пути липополисахаридом (по Liu et al., 2017, в модификации). ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота, ЛПС – липополисахарид, COX-2 – циклооксигеназа-2 (Cyclooxygenase-2), IL-1β – интерлейкин-1β, IL-6 – интерлейкин-6, IκB – ингибитор-κB (Inhibitor κB), IKK – киназа IκB (IκB Kinase), iNOS – индуцируемая синтаза оксида азота (Inducible Nitric Oxide Synthase), IRAK1 – киназа 1, ассоциированная с рецептором интерлейкина 1 (Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 1), TLR4 – Толл-подобный рецептор-4 (Toll-Like Receptor-4), MyD88 – адаптерный белок первичного ответа миелоидной дифференцировки (Myeloid Differentiation Primary Response Gene-88), NF-κB – ядерный фактор κB (Nuclear Factor-κB), NEMO – основной модулятор NF-κB (NF-κB Essential Modulator), TAK1 – активируемая TGF-β киназа 1 (Transforming Growth Factor Beta-Activated Kinase 1), ТАВ – ТАК1-связывающий белок (ТАК1-Binding Protein 1), TNFα – фактор некроза опухоли α (Tumor Necrosis Factor α), TRAF6 – фактор 6, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухоли (TNF Receptor-Associated Factor 6), P – фосфат, ubiQ – убиквитин (Ubiquitin)

NF-κB индуцирует продукцию провоспалительных цитокинов – IL-1β, TNFα, IL-6 (Cannon J.G. et al., 1990; Slaats J. et al., 2016), которые стимулируют в клетках печени синтез белков острой

фазы воспаления через 4-6 часов после воздействий, в том числе С-реактивного белка (Esteban E. et al., 2013). По данным литературы, в ответ на введение ЛПС содержание С-реактивного белка значительно повышается через 10-12 ч и достигает пика через 24-48 ч (Ng P.C. et al., 1997; Makhoul I.R. et al., 2006; Hofer N. et al., 2012; Slaats J. et al., 2016). Кроме того, ЛПС индуцирует синтез противовоспалительных цитокинов – IL-10, а также IL-4 и IL-13, которые блокируют активацию NF-κB по механизму отрицательной обратной связи (Wang P. et al., 1995). IL-10 ограничивает воспалительный ответ, а TGF-β играет важную роль в супрессии клеток врожденного иммунитета (Sanjabi S. et al., 2009).

Системная воспалительная реакция, помимо гиперпродукции провоспалительных цитокинов, сопровождается активацией и противовоспалительных механизмов для предотвращения повреждения тканей. При продолжительном и выраженном противовоспалительном ответе развивается иммуносупрессия, которая может привести к присоединению вторичных инфекций (Leentjens J. et al., 2013; Ono S. et al., 2018).

Гиперактивация продукции молекул воспаления приводит к нарушению гемодинамики, активации коагуляции с увеличением синтеза NO и развитию гипоксии, которой подвергаются и клетки иммунной системы (Cohen J., 2002). S. Frede et al. (2006) показали, что ЛПС может вызывать NF-κB-зависимое повышение уровней мРНК и белка HIF-1α в моноцитах человека (Frede S. et al., 2006). Показано, что при стимуляции ЛПС HIF-1α стабилизируется АФК (Chandel N.S. et al., 2000; Nishi K. et al., 2008). При системных инфекциях, таких как сепсис, активация HIF-1α приводит к большей смертности и повышению синтеза провоспалительных цитокинов (IL-1β, TNFα) в сыворотке крови, что способствует активации иммунных и воспалительных реакций (Peyssonaux C. et al., 2007). В литературе обсуждается возможность использования оценки активации HIF-1 как потенциального прогностического маркера сепсиса (Textoris J. et al., 2012).

Реакция на ЛПС опосредована иммуномодулирующими молекулами, такими как TNFα, некоторыми интерлейкинами – IL-1, 6, 8, 12, IFNα и другими (Vogel S.N. и Hogan M.M., 1990), которые продуцируются преимущественно моноцитами/макрофагами, но также и другими клетками – сосудистым эндотелием, гранулоцитами и Т-лимфоцитами (Белоцкий С.М. и Авталион Р.Р., 2008; Galanos C. et al., 1992; Loppnow H., 1994; Beutler B. и Cerami A., 1998). Большая часть клеток организма активируется этими цитокинами, что инициирует типичную реакцию острой фазы воспаления – лейкоцитоз, лихорадку, миграцию клеток в очаг инфекции и продукцию ими бактерицидных молекул, что, в конечном счете, обеспечивает элиминацию микроорганизмов. Высвобождение огромного количества цитокинов, однако, является опасным для организма, так как вызывает шок, повреждение клеток и недостаточность всех регуляторных систем и различных органов. Гиперпродукция провоспалительных цитокинов приводит к

развитию сепсиса, полиорганной недостаточности и смертельного синдрома септического шока (Rietschel E.T. et al., 1996).

Клеточный метаболизм является ключевым механизмом, регулирующим воспалительный ответ (Corcoran S.E. и O'Neill L.A., 2016; O'Neill L.A. и Pearce E.J., 2016). Переключение с окислительного фосфорилирования на гликолиз, или так называемый эффект Варбурга, приводит к накоплению сукцината, который активирует HIF-1 и увеличивает транскрипцию IL-1 β (Tannahill G.M. et al., 2013). Увеличение окисления сукцината митохондриями с помощью сукцинатдегидрогеназы приводит к повышению мембранного потенциала митохондрий и индуцирует продукцию АФК, что вызывает продукцию провоспалительных цитокинов (Mills E.L. et al., 2016). Поэтому активация HIF-1 играет одну из ключевых ролей в развитии системной воспалительной реакции при сепсисе.

Наиболее выраженная ЛПС-чувствительная популяция – клетки моноцитарно/макрофагального ряда. В ответ на воздействие эндотоксина макрофаги образуют не только цитокины, но и АФК – супероксид анион, перекись водорода, гидроксильные радикалы и NO; биоактивные метаболиты арахидоновой кислоты – простагландины, тромбоксаны и лейкотриены; фактор активации тромбоцитов. Все эти медиаторы также участвуют в патофизиологических механизмах сепсиса. Миелоидные клетки содержат протеолитические ферменты, и способны быстро генерировать АФК для разрушения патогенов, тем самым участвуя в формировании первого защитного барьера против микроорганизмов. Гранулоциты содержат ферменты, которые способны нейтрализовать (деацилировать и дефосфорилировать) ЛПС и липид А в нетоксичные молекулы (Luchi M. и Munford R.S., 1993). Более того, они продуцируют антимикробные белки с высокой аффинностью к ЛПС и, таким образом, нейтрализуют его биологическую активность. Один из этих белков – катионный 55 кДа бактерицидный увеличивающий проницаемость белок (Bactericidal/Permeability-Increasing Protein, BPI), который способен уничтожать бактерии, связываясь с их поверхностью. Несмотря на то, что нейтрофилы важны для уничтожения патогенов, их активация может вызывать гипериммунный ответ и повреждение клеток организма при воспалении, сепсисе и других процессах (Brown K. et al., 2006; Fang H. et al., 2015). При сепсисе наблюдается опосредованное нейтрофилами повреждение тканей легких, печени и других органов (Kabay V. et al., 2007; Stehr S.N. et al., 2008). Миграция и активация нейтрофилов – основной механизм развития острого воспаления, в том числе острого респираторного дистресс-синдрома (Kruger P. et al., 2015).

Показано, что в ответе на ЛПС участвуют и клетки адаптивного иммунитета. Поликлональная активация В-лимфоцитов у мышей в ответ на ЛПС, по-видимому, является ранним защитным механизмом, поскольку приводит к их пролиферации, дифференцировке и усиленной продукции антител с разной антибактериальной специфичностью (Andersson J. et al.,

1973). Т-лимфоциты человека (как CD3+CD4+, так и CD3+CD8+) способны пролиферировать в ответ на ЛПС, но их активация зависит от костимулирующих сигналов макрофагов (Mattern T. et al., 1998). Мышиные Т-лимфоциты также пролиферируют в ответ на ЛПС *in vitro* (Milner E.C. et al., 1983; Vogel S.N. et al., 1983) и стимулированные им CD8+/CD4- Т-лимфоциты способны подавлять гуморальный иммунный ответ на бактериальные полисахариды (Baker P.J., 1993).

Таким образом, модель системной воспалительной реакции, индуцированной введением ЛПС лабораторным животным, является адекватной для изучения инфекционно-воспалительных заболеваний человека, включая сепсис. Развитие системной воспалительной реакции зависит от многих факторов, таких как пол и возраст, а также определяется индивидуальными особенностями организма. Поскольку ключевую роль в развитии системной воспалительной реакции играет развивающийся на фоне сосудистых нарушений недостаток кислорода, одним из факторов, определяющим устойчивость к ней, может являться чувствительность к гипоксии.

1.3 Взаимосвязь гипоксии и воспаления

В последние годы появляется все больше данных о взаимосвязи HIF, активирующегося при гипоксии, с ключевым фактором, регулирующим процессы воспаления – NF-κB (Hirota K., 2015; Kiers H.D. et al., 2016; Devraj G. et al., 2017).

1.3.1 Индукция HIF воспалением

Множество исследований показало, что микросреда в очаге воспаления становится глубоко гипоксической под воздействием нескольких факторов: синтез провоспалительных цитокинов и хемокинов вызывает сужение кровеносных сосудов или другие микроциркуляторные нарушения, что уменьшает снабжение ткани кровью и кислородом; в то время как инфильтрированным иммунными клетками тканям требуется больше O₂ и других метаболических субстратов (Муздубаева Б.Т., 2016; Hirota K., 2015; Schaffer K. и Taylor C.T., 2015). Воспалительные заболевания, при которых была выявлена тканевая гипоксия, включают атеросклероз, ревматоидные артриты, ожирение, инфекции, ишемическую болезнь, опухоли и воспалительные заболевания кишечника (Eltzschig H.K. и Carmeliet P., 2011).

Потребление O₂ в очаге воспаления повышается из-за высокого метаболизма, который необходим для поддержания синтеза воспалительных медиаторов, ферментов и цитокинов (Eltzschig H.K. и Carmeliet P., 2011). Кроме того, гипоксии способствует инфильтрация нейтрофилов, так как окислительный взрыв, необходимый этим клеткам для эндогенной стратегии антимикробной борьбы, требует высоких уровней O₂ (Campbell E.L. et al., 2014; Campbell E.L. и Colgan S.P., 2015). Другая причина гипоксии при воспалении – нарушение доставки кислорода. В очаге воспаления, помимо недостатка кислорода, обычно наблюдается гипогликемия, ацидоз, а также увеличение продукции свободных радикалов и АФК (Eltzschig H.K. и Carmeliet P., 2011). В нормальных тканях давление O₂ составляет от 2,5 до 9%, однако, в области повреждения и некроза оно может быть ниже 1% (Vogelberg K.H. и Konig M., 1993). Таким образом, в очаге воспаления изменения метаболизма O₂ посредством индуцированной гипоксией генной экспрессии модулирует дальнейшее развитие или прекращение воспалительной реакции через активацию или подавление экспрессии зависимых генов (Eltzschig H.K. и Carmeliet P., 2011).

Взаимосвязь между молекулярными механизмами бактериальных инфекций и гипоксическими путями была впервые показана в 2001 г: VEGF, который регулируется HIF-1 и гипоксией, был значительно повышен в спинномозговой жидкости у пациентов с менингитом (van der Flier M. et al., 2001). Позднее было показано, что HIF-1 играет важную роль в бактериальных инфекциях (Cramer T. et al., 2003; Charpentier T. et al., 2016). Исследования

механизмов активации HIF-1 при бактериальных инфекциях были проведены сначала с использованием патогенных для человека бактерий *Bartonella henselae* (Riess T. et al., 2004; Kempf V.A. et al., 2005). Оказалось, что активация HIF-1 – это общий механизм для бактериальных, вирусных, грибковых и паразитарных инфекций (Kempf V.A. et al., 2005; Hartmann H. et al., 2008; Werth N. et al., 2010). Индукция HIF-1 бактериями опосредуется различными процессами: увеличением потребления O₂ инфицированными клетками, конкуренцией за железо между бактериями и клетками организма в течение инфекции, бактериальными компонентами (такими как ЛПС), активирующими HIF-1 через воспалительные и другие пути и воспалительной средой (Riess T. et al., 2004; Kempf V.A. et al., 2005; Frede S. et al., 2006; Dehne N. и Brune B., 2009; Cane G. et al., 2010).

Клеточные ответы на гипоксию сопровождаются значительными изменениями функциональной активности многих генов (Cummins E.P. и Taylor C.T., 2005; Ke Q. и Costa M., 2006; Mole D.R. et al., 2009; Semenza G.L., 2012). Пока остаются не изученными факторы, контролирующие репрессию генов при гипоксии, однако известно, что как HIF, так и NF-κB являются отвечающими на гипоксию транскрипционными активаторами. Ключевой фактор, регулирующий процессы воспаления – NF-κB, непосредственно влияет на экспрессию HIF-1α, как в условиях нормоксии и гипоксии, так и в ответ на воспалительные стимулы (Rius J. et al., 2008; van Uden P. et al., 2008, 2011), а также контролирует уровни мРНК и белка HIF-1β (van Uden P. et al., 2011). Воспалительные стимулы, такие как TNFα и ЛПС, приводят к активации HIF-1α через NF-κB-зависимый путь в клетках опухолевых линий (Nishi K. et al., 2008; van Uden P. et al., 2008). S. Frede et al. в 2006 г. показали, что бактериальный ЛПС вызывает NF-κB-зависимое повышение уровней мРНК и белка HIF-1α (Frede S. et al., 2006). Эти результаты свидетельствуют о том, что NF-κB может прямо изменять путь HIF-1α и что этой модуляции достаточно для изменения экспрессии HIF-зависимых генов (van Uden P. et al., 2008), то есть NF-κB – один из ключевых регуляторов экспрессии и функциональной активности HIF (Bandarra D. и Rocha S., 2015; Charpentier T. et al., 2016).

Известно, что в проксимальной части промотера гена HIF-1α, на -197/-188 парах оснований, содержится активный κB-связывающий сайт, в частности, для субъединиц p50 и p65 NF-κB (Bonello S. et al., 2007; Rius J. et al., 2008; van Uden P. et al., 2008). Мутации этого сайта нарушают ответы, опосредованные HIF, что подтверждает его вовлеченность в связь между активацией воспалительного и отвечающего на гипоксию путей (BelAiba R.S. et al., 2007; Bonello S. et al., 2007; Rius J. et al., 2008; Gorchach A. и Bonello S., 2008). NF-κB-связывающий элемент консервативен, что свидетельствует о том, что связь между этими двумя путями широко распространена среди различных видов организмов (BelAiba R.S. et al., 2007). С помощью РНК-интерференции было показано, что NF-κB регулирует уровень экспрессии HIF-1α: блокирование

NF-κB приводит к уменьшению базальных уровней мРНК HIF-1α. TNFα-индуцированная активация NF-κB увеличивает уровни мРНК и белка HIF-1α, приводя к трансактивации зависимых генов при нормоксии через NF-κB-зависимый путь (рис. 4) (Halligan D.N. et al., 2016; Taylor C.T. и Colgan S.P., 2017).

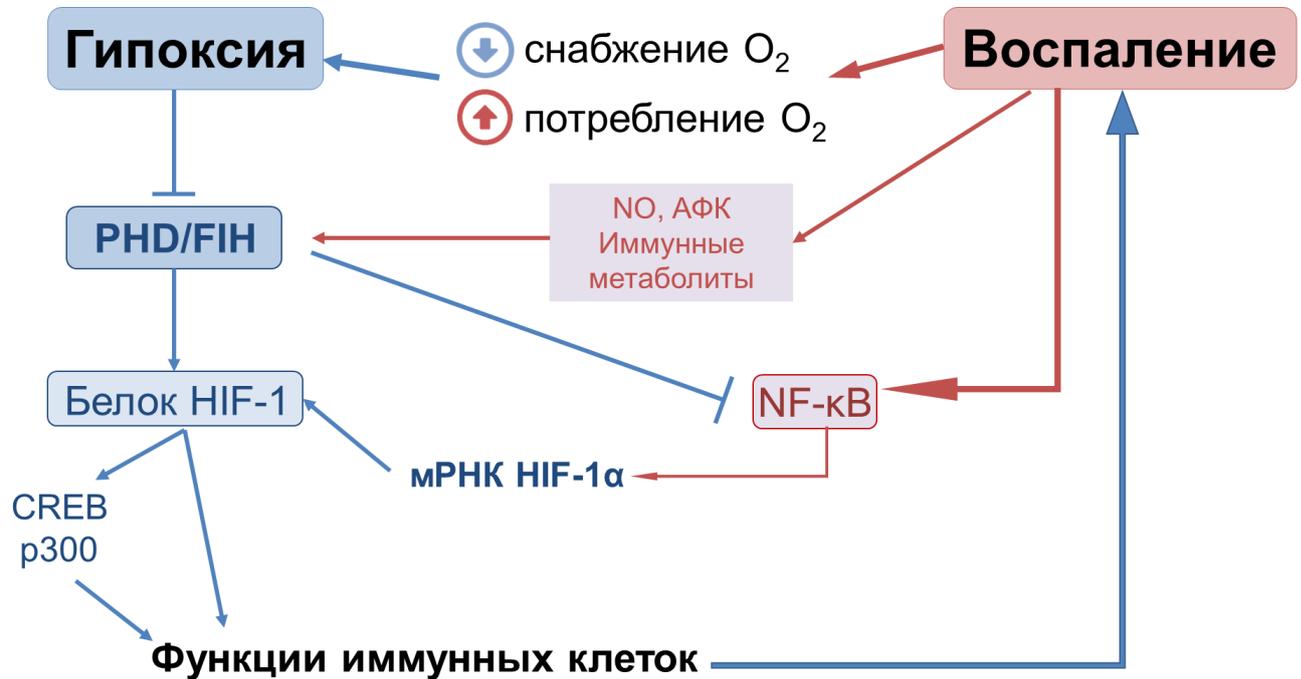


Рис. 4. Взаимосвязь гипоксии и воспаления (по Halligan D.N. et al., 2016; Taylor C.T. и Colgan S.P., 2017, в модификации). АФК – активные формы кислорода, CREB – cAMP-Response Element-Binding Protein, p300 – E1A Binding Protein p300, HIF-1α – индуцируемый гипоксией фактор-1α (Hypoxia-Inducible Factor-1α), NF-κB – ядерный фактор κB (Nuclear Factor-κB), NO – оксид азота (Nitric Oxide), PHD/FIN – пролилгидроксилаза (Prolyl Hydroxylase Domain protein)/фактор, ингибирующий HIF (factor-inhibiting HIF)

Кроме индукции через NF-κB-зависимый путь, при воспалении функциональная активация HIF-1 осуществляется двумя ключевыми провоспалительными цитокинами – IL-1β и TNFα, а также другими факторами – АФК, NO и PI3K (Hellwig-Burgel T. et al., 1999). Установлен регуляторный механизм, связанный с ингибированием PHD продукцией АФК: они окисляют Fe (II) на каталитическом сайте, что блокирует активность PHD (Gerald D. et al., 2004; Chen R. et al., 2018). Увеличение уровней АФК при воспалении приводит к активации HIF-1α. Кроме того, экзогенный H₂O₂ также индуцирует экспрессию HIF-1α (Tannahill G.M. et al., 2013; Hirota K., 2015). Более того, медиаторы воспалительной среды, такие как аденозин, также активируют HIF-1. Экспрессия HIF-1α индуцируется после стимуляции рецептора аденозина и TLR4 по PI3K-зависимому, АФК-зависимому или АФК-независимому путям (Richard D.E. et al., 2000; Nishi K. et al., 2008; Dehne N. и Brune B., 2009).

Следует отметить, что условия, при которых индуцируется HIF-1 (гипоксия или воспаление) влияют на результат его активации. При активации HIF-1 гипоксией усиливается

транскрипция различных таргетных генов, позволяющих адаптироваться к недостатку кислорода. При индукции через NF-κB-зависимый путь активируются гены провоспалительных цитокинов (Jantsch J. et al., 2011).

Таким образом, в условиях воспаления под воздействием множества стимулов, характерных для воспалительной микросреды, активируется ключевой фактор ответа на гипоксию – HIF.

1.3.2 Индукция воспаления недостатком кислорода

Системная гипоксия может вызывать воспалительные изменения в органах и тканях. Концепция, что гипоксия сама по себе может вызывать воспаление, была принята после ряда исследований, показавших, что сигнальные пути, индуцируемые гипоксией, связаны с активацией провоспалительного фактора NF-κB (Semenza G.L., 2007; Oliver K.M. et al., 2009; Eltzschig H.K. и Carmeliet P., 2011; Hirota K., 2015). Развитие воспаления в ответ на тканевую гипоксию было показано у больных при трансплантации органов: ишемия органов донора увеличивает риск воспаления и их отторжения у реципиента (Kruger V. et al., 2009). Взаимосвязь гипоксии и воспаления также обнаружена при остром респираторном дистресс-синдроме, при котором, как правило, тканевая гипоксия и воспалительные реакции потенцируют друг друга (Ferguson N.D. et al., 2012). При ожирении дисбаланс между доставкой и потреблением кислорода вызывает гипоксию и увеличивает содержание провоспалительных адипокинов в жировой ткани (Suganami T. и Ogawa Y., 2010). У здоровых волонтеров, подвергавшихся двухчасовой нормобарической гипоксии (12% O₂) *in vivo*, усиливался хемотаксис нейтрофилов, фагоцитоз и продукция АФК (Wang J.-S. и Liu H.-S., 2009). Кроме того, при воздействии гипоксии, эквивалентной высоте 5500 м, в клетках периферической крови здоровых людей повышалась активность факторов HIF-1α и NF-κB (Fritzenwanger M. et al., 2011). Воздействие гипоксии при подъеме в горы у некоторых людей, связано с развитием горной болезни и характеризуется гипоксическим отеком легких и мозга (Grocott M. et al., 2007; Richard N.A. et al., 2014). Аналогичные эффекты наблюдаются при кратковременном и хроническом гипоксическом воздействии у мышей, что приводит к увеличению концентрации провоспалительных цитокинов и хемокинов, а также отеку легких (Peacock A.J., 1998; Grocott M. et al., 2007; Lee E.J. et al., 2017). По данным литературы, кратковременное (до 4 дней) пребывание животных и человека в условиях гипоксии (на высоте более 3400 м над уровнем моря) способствует увеличению в сыворотке крови содержания маркеров воспаления – IL-6 и С-реактивного белка (Klausen T. et al., 1997; Hartmann G. et al., 2000). При длительной гипоксии у адаптируемых к «высоте» животных резистентность к бактериальной и протозойной инфекции уменьшается

(Капланский А.С., 1974). Таким образом, существуют доказательства того, что гипоксия способствует развитию воспаления.

По данным недавно проведенных исследований, длительная гипоксия приводит, главным образом, к активации HIF пути, в то время как временная прерывистая гипоксия – к развитию NF-κB-зависимого воспалительного ответа как результату окислительного стресса (Ryan S. et al., 2005; Prabhakar N.R. и Semenza G.L., 2012; Taylor C.T. et al., 2014; Nanduri J. et al., 2015). Следует отметить, что воздействие антиоксидантов супрессирует активацию HIF-1α, индуцированную временной гипоксией (Prabhakar N.R. et al., 2007).

В настоящее время существует все больше доказательств того, что гипоксия активирует NF-κB-зависимую транскрипцию генов и увеличивает чувствительность этого пути к провоспалительным стимулам, таким как цитокины (Cummins E.P. and Taylor C.T., 2005; Cummins E.P. et al., 2006). Прямая связь между гипоксией и активностью NF-κB была показана в исследованиях, посвященных регуляции как NF-κB пути, так и HIF, пролилгидроксилазами (Cummins E.P. et al., 2006). Авторы продемонстрировали, что гипоксия модулирует NF-κB-зависимый путь через уменьшение гидроксилирования его ключевых регуляторов – ИКК (рис. 5). Как ИКК α , так и ИКК β содержат в своих киназных доменах эволюционно консервативный консенсусный мотив, сходный с мотивом LxxLAP в HIF, который гидроксилируется PHD. Таким образом, одни и те же гидроксилазы, которые регулируют чувствительный к кислороду путь и способствуют убиквитин-зависимому разрушению HIF-1α, контролируют активность киназного комплекса, отвечающего за регуляцию NF-κB, и играют определяющую роль в его реакции на гипоксию (Cummins E.P. et al., 2006; Eltzschig H.K. and Carmeliet P., 2011). При нормоксии ИКК β (или другой промежуточный регулятор), по-видимому, гидроксилируется PHD1 и PHD2, что приводит к супрессии его ферментативной активности и подавлению канонического пути NF-κB. При гипоксии гидроксилирование пролилгидроксилазами подавляется, что вызывает увеличение как базальной, так и цитокин-стимулированной активности ИКК β . Это, в свою очередь, имеет значительное влияние на активацию NF-κB-зависимой экспрессии провоспалительных и антиапоптотических генов. Подавление PHD1 или 2 ингибитором приводит к активации NF-κB, напротив, гиперэкспрессия PHD1 уменьшает его цитокин-стимулированную активность, что свидетельствует о репрессивной роли PHD1 в контроле активности этого пути (Cummins E.P. et al., 2006; Rius J. et al., 2008). Отдельные работы подтверждают PHD1-зависимое гидроксилирование белка ИКК β (Zheng X. et al., 2014), а также чувствительность канонического NF-κB пути (но не неканонического) к гипоксии (Oliver K.M. et al., 2009). Кроме того, было показано, что аспарагиновая гидроксилаза FIH гидроксилирует p105 (предшественник p50) и ИκBα (Cockman M.E. et al., 2006; Scholz C.C. и Taylor C.T., 2013). Таким образом, при гипоксии происходит гидроксилазное ингибирование компонентов NF-κB пути, которое может

непосредственно влиять на него и представляет собой критическую точку взаимосвязи между гипоксическим и воспалительным сигнальными путями (Cummins E.P. et al., 2006).

Показано, что гипоксия способствует дополнительному повышению транскрипции HIF-1 через NF-κB-зависимый механизм. Гипоксическое воздействие в течение 30 мин индуцирует активацию NF-κB, который транслоцируется в ядро, где взаимодействует с NF-κB-связывающим сайтом в промоторе HIF-1α, что еще больше увеличивает экспрессию HIF-1α (BelAiba R.S. et al., 2007). Некоторые киназные пути, включая PI3K, АКТ, ERK1/2 активируются при гипоксии и также дополнительно регулируют HIF-1 (Berra E. et al., 2000; Kietzmann T. et al., 2003; Mottet D. et al., 2003). Гиперэкспрессия HIF-1 приводит к увеличению активности NF-κB и увеличивает воспалительный ответ (Scortegagna M. et al., 2008).

Роль HIF в активации NF-κB изучена недостаточно. Показано, что HIF-1α может ограничивать транскрипционную активность NF-κB *in vitro* и *in vivo* в условиях воспаления (Хуе Х. et al., 2013; Bandarra D. et al., 2015). С использованием опухолевых клеточных линий млекопитающих показано, что в отсутствие HIF-1α активность NF-κB повышена. Обнаружено существование эволюционно консервативного механизма отрицательной обратной связи, посредством которой HIF может регулировать NF-κB через IKK-TAK1- и CDK6 (Cell Division Protein Kinase б)-зависимые способы (Bandarra D. et al., 2015). Более того, при нокдауне HIF-1α с помощью миРНК в ответ на TNFα уровни экспрессии некоторых NF-κB-зависимых генов, таких как *Cyld*, *A20*, *IκB-α* были повышены. Эти результаты свидетельствуют в пользу того, что активация HIF может оказывать противовоспалительный эффект. В таком случае, HIF является одним из компонентов отрицательной обратной связи, которая важна для ограничения активности NF-κB, и опосредует ответ на инфекцию (Bandarra D. et al., 2015). По-видимому, HIF-1α может быть как провоспалительным, так и противовоспалительным фактором.

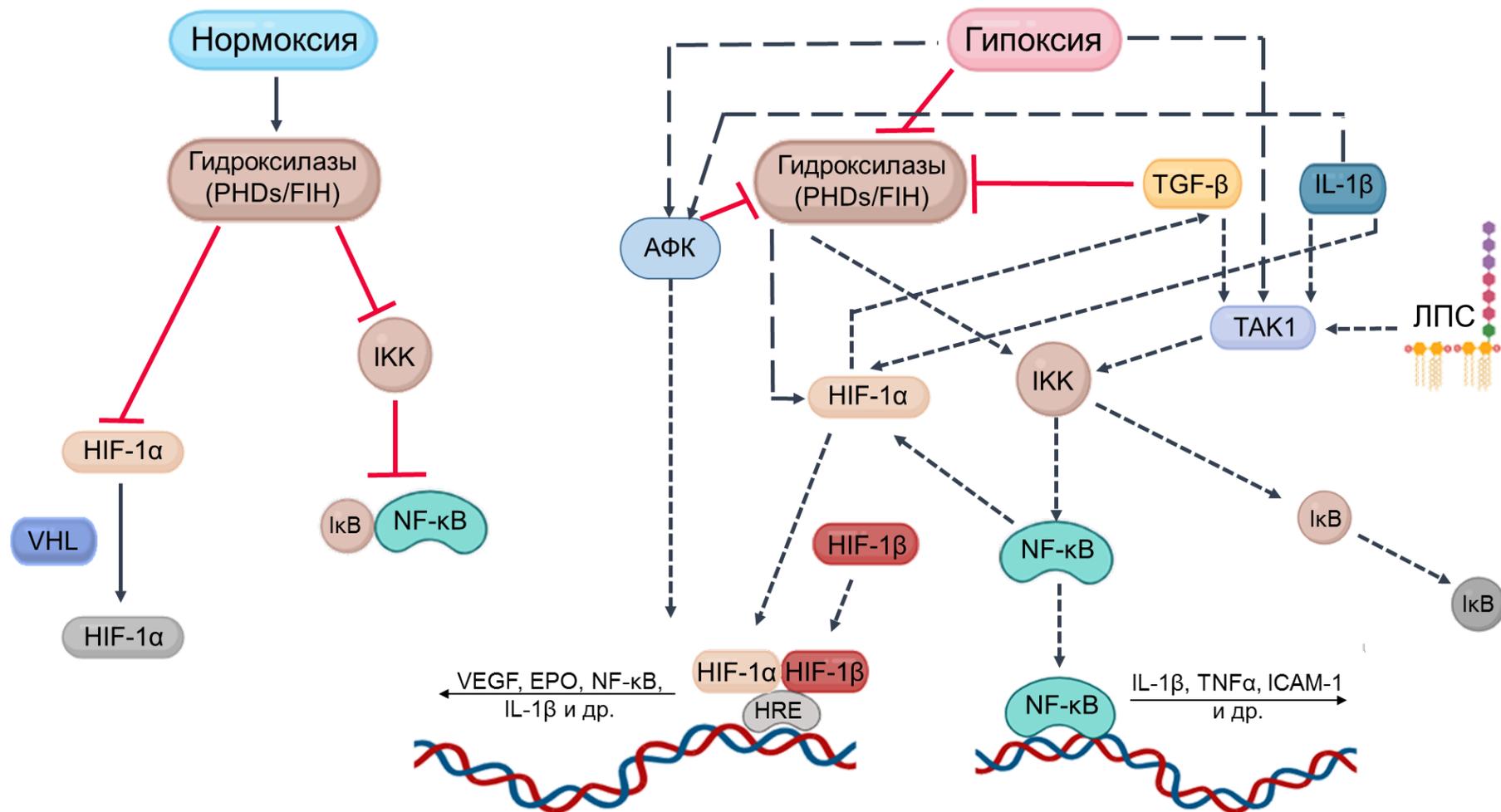


Рис. 5. Основные молекулярные пути, активирующиеся при гипоксии и воспалении. АФК – активные формы кислорода, ЛПС – липополисахарид, HIF – индуцируемый гипоксией фактор (Hypoxia-Inducible Factor), HREs – отвечающие на гипоксию элементы (Hypoxia Response Elements), IL-1β – интерлейкин-1β, IκB – ингибитор-κB (Inhibitor κB), IKK – киназа IκB (IκB Kinase), NF-κB – ядерный фактор κB (Nuclear Factor-κB), PHD/FIH –пролилгидроксилаза (Prolyl Hydroxylase Domain protein)/фактор, ингибирующий HIF (factor-inhibiting HIF), TAK1 – активируемая TGF-β киназа 1 (Transforming Growth Factor Beta-Activated Kinase 1), TGF-β – трансформирующий фактор роста β (Transforming Growth Factor Beta), VHL – E3-убиквитин-лигазный комплекс Гиппеля-Линдау (von Hippel-Lindau (VHL) E3 Ligase Complex)

1.3.3 Влияние активации HIF на воспалительный и иммунный ответ

HIF в условиях воспаления может выполнять как противовоспалительную, так и провоспалительную функцию, реализуемые реакциями врожденного и адаптивного иммунитета (Kiers H.D. et al., 2016; Devraj G. et al., 2017).

1.3.3.1 HIF и иммунные клетки

Кислородная недостаточность влияет на функционирование клеток врожденного и адаптивного иммунитета: ингибирует апоптоз нейтрофилов (Walmsley S.R. et al., 2005), увеличивает миграцию нейтрофилов и макрофагов (Cramer T. et al., 2003; Peyssonnaud C. et al., 2005; Stothers C.L. et al., 2018), стимулирует дифференцировку Th2 (Т-helper, Т-хелпер) и T-регуляторных клеток (Ben-Shoshan J. et al., 2009; Clambey E.T. et al., 2012). Иммунные клетки – нейтрофилы, моноциты, лимфоциты – мигрируют из биологической среды кровеносных сосудов, богатой O₂, в гипоксические очаги воспаления. Метаболический статус иммунных клеток тесно связан с их фенотипом и функциями (Campbell E.L. et al., 2014; Galvan-Pena S. и O'Neill L.A., 2014; Barbi J. et al., 2013; Hirota K., 2015; Stothers C.L. et al., 2018; Sadiku P. и Walmsley S.R., 2019). В регуляции метаболических процессов иммунных клеток ключевую роль играет HIF, стабилизирующийся при уменьшении активности PHD, являющийся сильнейшим активатором экспрессии гликолитических генов и репрессором окислительного фосфорилирования (Semenza G.L., 2013). При системной воспалительной реакции ЛПС-зависимая активация макрофагов приводит к перепрограммированию метаболизма, освобождению сукцината и повышению продукции IL-1 β вслед за активацией HIF-1 α (Tannahill G.M. et al., 2013). Таким образом, HIF связывает метаболические, воспалительные и иммунные процессы. После активации HIF увеличивается экспрессия генов врожденного иммунитета, содержащих реагирующие на гипоксию HREs в промотерах. Они достигают максимальной экспрессии при активации NF- κ B после прямого контакта с патогеном, что дополнительно усиливает транскрипцию HIF. Активация HIF вовлечена в серию событий, запускающих секрецию провоспалительных цитокинов и антибактериальных пептидов, продукцию NO, реакции фагоцитоза, увеличение длительности жизни фагоцитов за счет ингибирования их апоптоза (Nizet V. и Johnson R.S., 2009).

Защитная роль HIF-1 в очаге воспаления опосредуется регуляцией бактерицидных свойств фагоцитов (увеличением их адгезии, подвижности, способности к инвазии), которые являются эффекторными клетками врожденного иммунитета (Cramer T. et al., 2003; Peyssonnaud C. et al., 2005; Anand R.J. et al., 2007; McInturff A.M. et al., 2012). HIF-1 α способствует секреции антимикробных молекул, продукции NO (Peyssonnaud C. et al., 2005, 2008) и увеличению

экспрессии TLR4 (Kim S.Y. et al., 2010). Показана специфичная для разных типов клеток роль HIF в регуляции множества процессов активации иммунных клеток (Cummins E.P. et al., 2016).

HIF-1 экспрессируется во всех типах иммунных клеток, в то время как HIF-2 в условиях гипоксии экспрессируется только в некоторых, таких как нейтрофилы, НК клетки (Natural Killer – естественные киллеры), макрофаги и активированные Т-лимфоциты (Palazon A. et al., 2014). В частности, макрофаги могут дифференцироваться в M1 или M2 фенотипы, которые, соответственно, связаны с первой линией (провоспалительной) антибактериальной защиты и заживлением ран (противовоспалительной). Эти фенотипы макрофагов используют определенные метаболические стратегии для продукции АТФ: M1 в большей степени зависят от гликолиза, в то время как M2 – от окислительного фосфорилирования (Mills E. и O'Neill L.A., 2014; Sadiku P. и Walmsley S.R., 2019). Как HIF-1, так и HIF-2 имеют важные регуляторные функциональные роли в контроле подвижности, бактерицидной активности и опухолевого потенциала в макрофагах (Cramer T. et al., 2003; Imtiyaz H.Z. et al., 2010). Однако остается неясным, как HIF-1 и HIF-2 участвуют в поляризации макрофагов в направлении M1 или M2 (Galvan-Pena S. и O'Neill L.A., 2014; Palazon A. et al., 2014). HIF-1-зависимая стимуляция гликолиза (рис. 6) способствует поляризации макрофагов в M1 фенотип, однако M2 поляризация не зависит от изоформы HIF, что было показано на модели асептического воспаления (Gondin J. et al., 2015). Макрофаги, нокаутные по гену VHL, активация которого способствует разрушению HIF-1 α , благодаря его стабилизации, уничтожают бактерии более эффективно, чем обычные (Peyssonaux C. et al., 2005; D'Ignazio et al., 2015). Таким образом, активация HIF, в зависимости от изоформы, вызывает разнонаправленную поляризацию макрофагов.

Прямое доказательство, что HIF-1 α /VHL пути регулируют врожденный иммунный ответ у человека было установлено в серии экспериментов с использованием нейтрофилов, полученных от пациентов с болезнью Гиппеля-Линдау (Walmsley S.R. et al., 2005). Нейтрофилы этих больных являются гетерозиготными по экспрессии VHL и, следовательно, имеют более высокую экспрессию HIF из-за неэффективной VHL-опосредованной протеасомной деградации. В соответствии с этим, циркулирующие нейтрофилы у этих пациентов в условиях нормоксии имеют частично гипоксический фенотип с замедленными апоптотическими процессами и усиленным фагоцитозом (Walmsley S.R. et al., 2005). HIF-1 α контролирует некоторые ключевые эффекторные функции нейтрофилов (рис. 6): способствует их выживанию и стимулирует бактерицидную активность (Peyssonaux C. et al., 2005; Walmsley S.R. et al., 2005; Sadiku P. и Walmsley S.R., 2019). Отсутствие HIF-1 α в нейтрофилах ингибирует продукцию АТФ и уменьшает их способность проникать в ткани и уничтожать бактерии (Cramer T. et al., 2003; Peyssonaux C. et al., 2005). В нейтрофилах HIF-1 и HIF-2 контролируют их выживание и апоптоз. Таким образом, активация HIF-1/2 в нейтрофилах является провоспалительной.

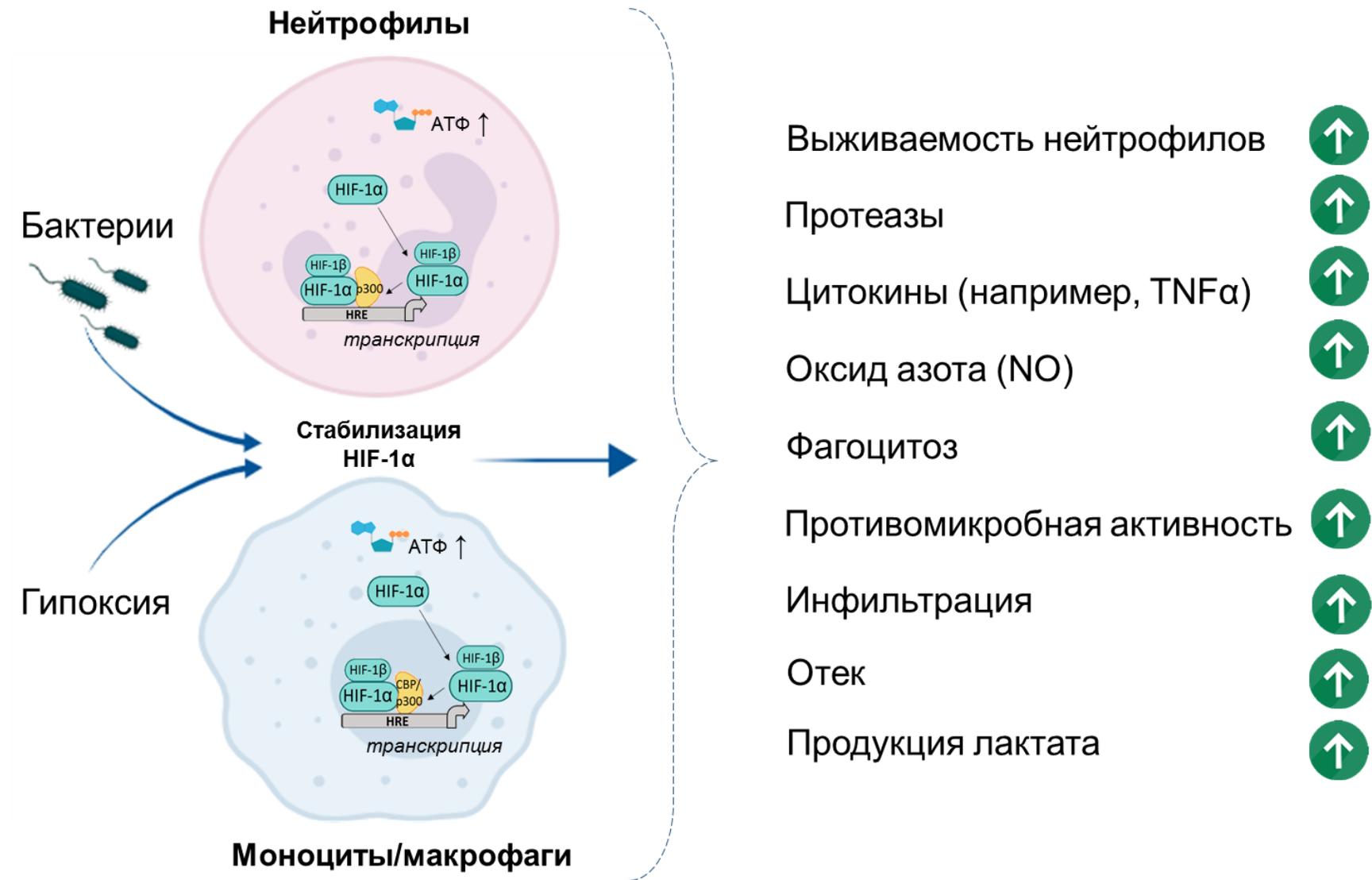


Рис. 6. Влияние HIF-1 на функциональную активность нейтрофилов и макрофагов (по А.А. Thompson et al., 2013, в модификации)

Активация HIF-1 в дендритных клетках способствует их выживанию, дифференцировке, миграции и синтезу интерферонов (Kohler T. et al., 2012; Naldini A. et al., 2012; Wobben R. et al., 2013). Более того, исследования последних лет предполагают роль HIF-1 α в определении антиген-презентирующей функции дендритных клеток. Показано, что HIF-1 стимулирует T-регуляторные клетки, в то же время ограничивая пролиферацию CD8⁺ T-клеток (Hammami A. et al., 2015; Fluck K. et al., 2016). Эти исследования свидетельствуют в пользу преимущественно противовоспалительной функции HIF-1 в дендритных клетках. Таким образом, HIF играет важную роль в пролиферации, дифференцировке и функционировании клеток врожденного иммунитета.

Роль HIF в регуляции адаптивного иммунного ответа при воспалении и развитии опухолей относительно хорошо изучена. Известно, что в процессе иммунного ответа CD4⁺ T-клетки могут дифференцироваться в Th1, Th2, Th17 или T-регуляторные клетки, которые имеют разные иммунологические функции. HIF-1 регулирует выживание, пролиферацию и дифференцировку T-клеток (Biju M.P. et al., 2004). В активированных T-клетках HIF-1 способствует их цитолитическим, миграционным и ко-стимулирующим свойствам, хотя в некоторых условиях HIF-1 может негативно регулировать функции Th1 (Palazon A. et al., 2014; Shehade et al., 2015). Активация HIF-1 приводит к метаболическому сдвигу в сторону гликолиза и изменяет транскрипционные ответы, создавая условия для дифференцировки Th17 клеток в большей мере, чем T-регуляторных (Dang E.V. et al., 2011; Barbi J. et al., 2013). Влияние HIF-1 на T-регуляторные клетки недостаточно изучено. В одном исследовании показано, что запускаемая HIF-1 экспрессия FOXP3 требуется для функционирования T-регуляторных клеток, и клетки без HIF-1 теряют свою противовоспалительную способность (Clambey E.T. et al., 2012). Индукция HIF-1 α приводит к увеличению числа T-регуляторных клеток, оказывающих супрессорный и противовоспалительный эффекты. E.T. Clambey et al. (2012) предполагают, что конечная судьба T-регуляторных клеток при гипоксии зависит от интегрированного действия HIF-1 α и TGF- β (ростового фактора, который регулирует и регулируется HIF-1 α и вовлечен в образование как T-регуляторных, так и Th17 клеток) и присутствия цитокинов в локальном микроокружении (Clambey E.T. et al., 2012). Таким образом, HIF-1 играет ключевую роль в дифференцировке и функционировании T-клеток.

HIF-1 играет также важную роль в функционировании B-лимфоцитов. У мутантных по *Hif-1 α* мышей были обнаружены дефекты B-клеточной линии, включая ненормальные B1-подобные лимфоциты и развитие активных аутоиммунных процессов (Kojima H. et al., 2004). HIF-1 α важен для экспрессии TASK-2 калиевых каналов в B-клетках, которые необходимы для пролиферации, выживания клеток и продукции цитокинов (Shin D.H. et al., 2014). Ингибирование PHD с

помощью диметилноксалил глицина DMOG (Dimethyloxallyl Glycine) приводило к увеличению продукции IL-10 B1-клетками мышей (Hams E. et al., 2011).

Таким образом, HIF – важный регулятор клеток как врожденного, так и адаптивного иммунитета (рис. 7) и воспалительных процессов. В целом, множество других факторов, например, цитокины и хемокины, комбинируются с гипоксией, что позволяет контролировать развитие иммунных клеток и их функции, поэтому окончательные эффекты недостатка O_2 зависят того, какой из костимулов присутствует.

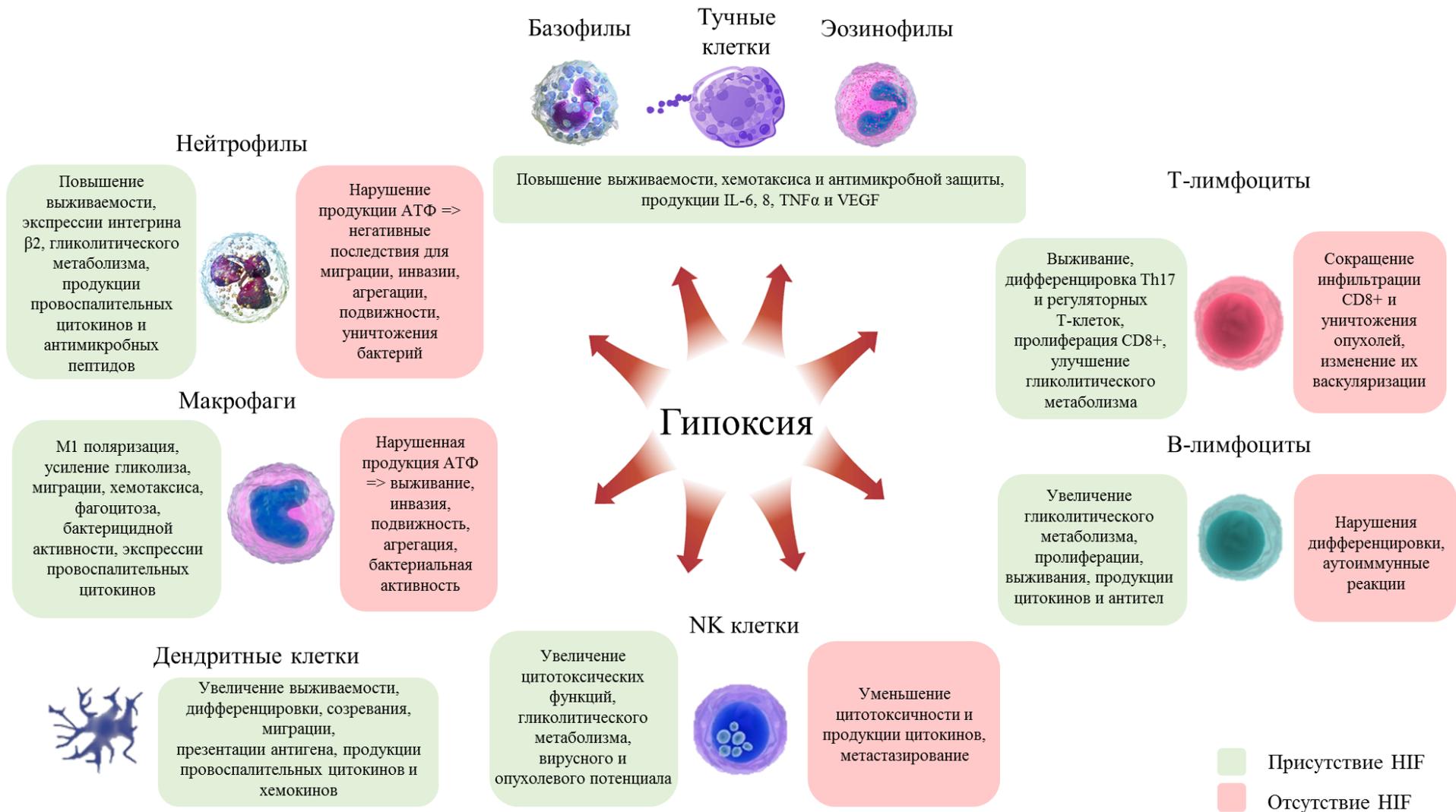


Рис. 7. Регуляция врожденного и адаптивного иммунитета гипоксией и HIF (по E. Krzywinska и C. Stockmann, 2018, в модификации)

При локальном воспалении активация HIF приводит, главным образом, к противовоспалительным эффектам, напротив, при системной воспалительной реакции – к провоспалительным (табл. 3).

1.3.3.2 Противовоспалительная функция HIF-1

В экспериментах показана защитная роль HIF-1 в очагах инфекционного воспаления для разных типов клеток, например, кишечного эпителия и кератиноцитов (Hartmann H. et al., 2008; Peyssonnaud C. et al., 2008). Эпителиальные клетки функционируют в качестве первой линии защиты против микроорганизмов в таких тканях, как легкие, кожа и желудочно-кишечный тракт. В 2004 г. Karhausen J. et al. на модели колита, индуцированного 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислотой (ТНБС) и оксазолоном, показали, что у мутантных мышей без экспрессии HIF-1 α клетками эпителия течение заболевания более тяжелое. Дефицит HIF-1 α у таких животных приводил к высокой смертности, а у выживших мышей – к более тяжелым клиническим проявлениям: выраженной потере веса, уменьшению длины кишки и увеличению проницаемости эпителия, в то время как активная экспрессия HIF-1 клетками кишечного эпителия имела защитный эффект. Другие работы на мышах также показали защитную функцию HIF-1 в кишечнике (Taylor C.T. и Colgan S.P., 2007; Manresa M.C. и Taylor C.T., 2017; Sun M. et al., 2017). Мыши, нокаутные по HIF-1 α в клетках кишечного эпителия, были более чувствительны к инфекции *Y. enterocolitica* (Hartmann H. et al., 2008). HIF-1 α осуществляет регуляцию множества барьерно-протективных генов, контролирующих продукцию таких молекул, как муцины и β -дефензины (рис. 8), он уменьшает апоптоз эпителиальных клеток, способствует дифференцировке противовоспалительных Т-регуляторных лимфоцитов (Louis N.A. et al., 2006; Robinson A. et al., 2008; Fluck K. et al., 2016). На модели рака кишки, ассоциированного с хроническим колитом, было показано, что увеличение экспрессии HIF-1 в клетках кишечного эпителия не приводит к формированию опухолей или дальнейшему прогрессированию рака. Влияние HIF на развитие локального воспаления может зависеть от его изоформы и от используемой экспериментальной модели. Опосредованное HIF-2 α воспаление способствует развитию опухолей ободочной кишки, а активация HIF-2 α при остром колите обуславливает тяжелое течение воспаления (Biddlestone J. et al., 2015; Triner D. и Shah Y.M., 2016).

Таким образом, по данным исследований последних лет, HIF-1 α при воспалительных заболеваниях кишечника активирует противовоспалительные гены и имеет защитные эффекты (рис. 8), а HIF-2 α , напротив, способствует воспалению.

Биологические эффекты HIF-1 при различных типах инфекций

Модель инфекции	Опосредуемый HIF-1 эффект	Биологический эффект HIF-1	Ссылка
<i>In vivo</i> , орогастральная инфекция, <i>Y. enterocolitica</i>	У мышей с нокаутными по HIF-1 α эпителиальными клетками кишечника повышенная смертность	Защитный	Hartmann H. et al., 2008
<i>In vivo</i> , антибиотик-связанный псевдомембранозный колит, <i>C. difficile</i>	У мышей с нокаутными по HIF-1 α эпителиальными клетками кишечника повышенное повреждение кишечного эпителия, индуцированное токсинами	Защитный	Hirota S.A. et al., 2010
<i>In vivo</i> , инфекции кожи, <i>Streptococci</i> группы A	У мышей с нокаутными по HIF-1 α кератиноцитами большее повреждение и бактериальная нагрузка	Защитный	Peyssonaux C. et al., 2008
<i>In vitro, in vivo</i> , пневмония, <i>P. aeruginosa</i>	Гипоксия уменьшает интернализацию бактерии и гибель клеток. Активация HIF-1 α уменьшает гибель мышей	Защитный	Schaible B. et al., 2013
<i>In vivo</i> , острый ТНБС (оксазолон)-индуцированный колит	Отсутствие HIF-1 α приводит к более тяжелому течению колита, большей потере веса, уменьшению длины кишки и увеличению проницаемости эпителия	Защитный	Karhausen J. et al., 2004
<i>In vivo</i> Сепсис, индуцированный ЛПС <i>E. coli</i>	Мыши, дефицитные по HIF-1 α , имеют большую степень выживаемости и сниженную секрецию провоспалительных цитокинов	Провоспалительный	Peyssonaux C. et al., 2007
<i>In vivo</i> Перитонит, <i>S. aureus</i>	Лечение мышей ингибитором HIF-1 α увеличивает выживаемость	Провоспалительный	Werth N. et al., 2010

1.3.3.3 Провоспалительная функция HIF-1

Несмотря на защитную функцию HIF-1 в локальных процессах, он может играть негативную роль при воспалении с выраженными системными проявлениями, в частности, при сепсисе (табл. 3). При грамм-положительной инфекции, вызванной липотейхоевой кислотой и пептидогликаном, дефицитные по HIF-1 в миелоидных клетках мыши имели меньшее повреждение тканей и высокую выживаемость (Mahabeleshwar G.H. et al., 2012). При ЛПС-индуцированном сепсисе нокаут HIF-1 в миелоидных клетках приводил к повышению выживаемости мышей, уменьшению содержания в сыворотке крови провоспалительных цитокинов (TNF α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12) и увеличению синтеза защитного IL-10, который оказывает иммуносупрессорные и противовоспалительные эффекты (Peyssonaux C. et al., 2007; Ono S. et al., 2018). Используя полученные из костного мозга макрофаги TLR4-дефицитных мышей, C. Peyssonaux et al. (2007) показали, что активация TLR4 зависит от ЛПС-индуцированной стабилизации HIF-1 α , которая обусловлена ингибированием PHD2/3. Активация в иммунных клетках Толл-подобных рецепторов, в частности TLR4, приводит к переключению с окислительного фосфорилирования на гликолиз (Rodriguez-Prados J.C. et al., 2010). Ингибирование активности HIF-1 α блокирует развитие клинических проявлений сепсиса, таких как гипотензия и гипотермия, и может быть мишенью для разработки новой терапевтической стратегии лечения сепсиса (Peyssonaux C. et al., 2007). Показана прямая связь между повышенным уровнем мРНК HIF-1 и септическим шоком, что указывает на возможность использования оценки активации HIF-1 в качестве потенциального прогностического маркера сепсиса (Textoris J. et al., 2012).

Провоспалительный эффект HIF-1 при системной воспалительной реакции, возможно, опосредуется усилением продукции цитокинов (рис. 8), что приводит к увеличению проницаемости сосудов, полиорганной недостаточности и гибели организма. Показано, что индуцированная ЛПС экспрессия IL-1 β увеличивается при гипоксии, TNF α не изменяется, а IL-6 ингибируется (Pan H. и Wu X., 2012; Tannahill G.M. et al., 2013).

Установлено также, что активность VEGF, регулируемого HIF-1, была повышена в сыворотке крови больных сепсисом. Блокирование VEGF через его растворимые рецепторы увеличивает выживаемость животных с сепсисом, индуцированным ЛПС (Yano K. et al., 2006). Такой разрушительный эффект VEGF, возможно, опосредован усилением проницаемости сосудов, что было показано у пациентов с септическим шоком (Pickkers P. et al., 2005).

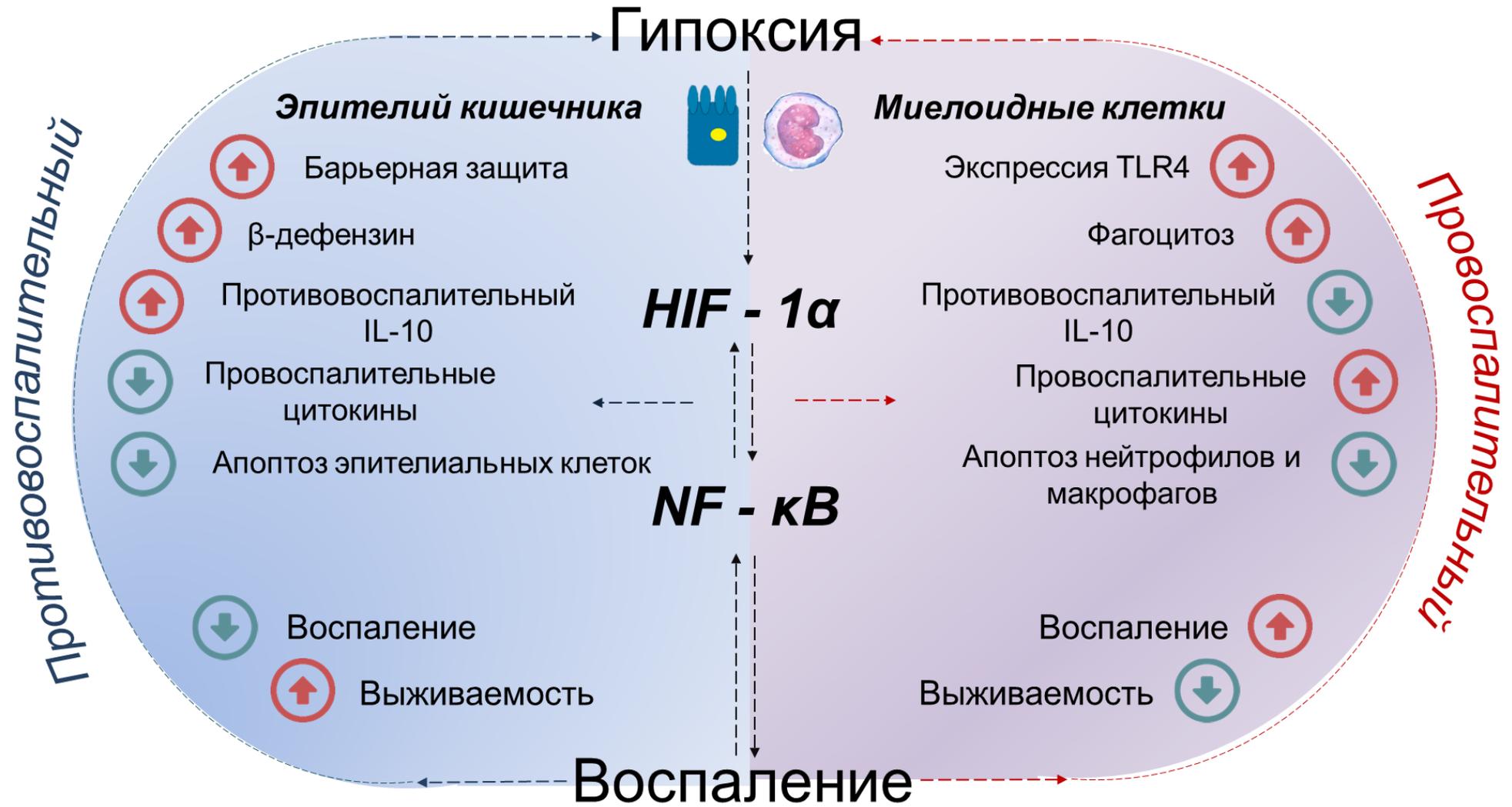


Рис. 8. Взаимосвязь между гипоксией и воспалением (по Kiers H.D. et al., 2016, в модификации)

Как упоминалось выше, HIF-1 способствует повышению выживания миелоидных клеток, таких как гранулоциты, моноциты и макрофаги, что приводит к развитию выраженной воспалительной реакции (Cramer T. et al., 2003). Таким образом, HIF-1 может также вносить провоспалительный вклад в гипоксический ответ, способствуя выживанию клеток, ответственных за развитие воспаления.

HIF-1 может быть потенциальной мишенью для терапии в ранние сроки сепсиса, но необходимо проведение дополнительных исследований. Возможное использование ингибиторов HIF-1 у септических пациентов может быть эффективным, однако, вероятно, должно осуществляться в ранние сроки развития заболевания. Исследований, посвященных функции HIF-1 в развитии сепсиса, недостаточно, и в них не учитывается индивидуальная устойчивость к гипоксии.

Таким образом, роль HIF-1 при воспалении может быть как провоспалительной, так и противовоспалительной. Гиперэкспрессия HIF-1 α в миелоидных клетках вовлечена в активацию иммунного ответа для элиминации патогенов, в то время как увеличение его экспрессии в лимфоцитах и эпителиальных клетках индуцирует противовоспалительные и защитные механизмы (рис. 8). HIF-1 контролирует воспалительный ответ через регуляцию NF- κ B и некоторых зависимых от него генов. Однако вклад HIF-1 в развитие воспаления остается малоизученным. Исследование взаимосвязи воспалительных реакций и гипоксии является важным не только для понимания степени влияния HIF-1 на NF- κ B, но также для создания потенциально новых терапевтических подходов к лечению воспалительных заболеваний и опухолей, поскольку HIF-1 играет важнейшую роль в их развитии.

1.3.4 Взаимосвязь полиморфизмов генов, отвечающих за адаптацию к гипоксии, с воспалительными процессами

Известно, что тяжесть течения инфекционно-воспалительных заболеваний, в том числе сепсиса, показатели смертности и выживаемости, зависят от многих факторов, в частности, этнической принадлежности, возраста и пола (Esper A.M. et al., 2006; Maug F.V. et al., 2014; Kosyreva A.M. et al., 2018). Однако остается неясным, почему тяжесть течения, исходы заболевания и вероятность присоединения вторичных инфекций в однородной популяции лиц одного возраста и пола различаются (Maug F.V. et al., 2014). Возможно, одним из факторов, определяющих эти различия, могут быть индивидуальные особенности устойчивости к недостатку кислорода. В литературе имеются данные о связи генных полиморфизмов молекул, участвующих в адаптации к гипоксии, с выраженностью или предрасположенностью к воспалительным заболеваниям. Как упоминалось выше, человеческая популяция, также как и другие виды организмов, гетерогенна по устойчивости к гипоксии (Lorenzo V.F. et al., 2009;

Kobayashi N. et al., 2013). Установлено, что полиморфизм гена HIF1A (1772T allele), определяющий высокий уровень его экспрессии, является фактором риска развития аневризма брюшной аорты и красного плоского лишая слизистой оболочки полости рта (De Carvalho Fraga S.A. et al., 2013; Strauss E. et al., 2015). Генетический полиморфизм rs12434439 GG HIF-1A играет защитную роль в развитии ревматоидного артрита (Paradowska-Gorycka A. et al., 2018). По данным литературы, генный полиморфизм HIF1A rs11549467 связан с риском развития хронической обструктивной болезни легких (Yu Z.G. et al., 2017). Таким образом, генетический полиморфизм гена HIF1A определяет тяжесть и прогноз инфекционно-воспалительных заболеваний. Полиморфизм RHD2 rs516651 (ТТ генотип) увеличивает риск гибели от острого респираторного дистресс-синдрома в 3,3 раза (Dotsch A. et al., 2017). Полиморфизм +896G TLR4, который взаимосвязан с HIF-1, обуславливает более тяжелое течение послеожогового сепсиса (Barber R.C. et al., 2006).

Устойчивость к гипоксии – это интегративный показатель, который определяется, помимо экспрессии HIF-1 α , уровнем других регуляторных молекул, зависящих от содержания кислорода, таких как: VEGF, ACE, NOS3, PAI-1, BDKRB2, EPO, ET-1 и других. Изменения в нуклеотидной последовательности данных генов могут приводить к повышению или понижению активности их продуктов, что повлияет на устойчивость клеток и всего организма к гипоксии.

Известно, что VEGF вовлечен в развитие воспаления: он повышает проницаемость сосудов, регулирует ангиогенез, пролиферацию эндотелиальных клеток, хемотаксис и миграцию нейтрофилов и макрофагов. Показано, что генный полиморфизм VEGF (-1154 A/G, -2578 A/C) определяет предрасположенность к развитию ревматоидного артрита (Paradowska-Gorycka A. et al., 2016). Также установлено, что значительно более высокое содержание VEGF в сыворотке крови больных возрастной макулярной дегенерацией определялось для генотипа ТТ с rs3025039 SNP (Ambreen F. et al., 2015). Риск возникновения неалкогольной жировой дистрофии печени повышен у курильщиков с генным полиморфизмом VEGF -460 Т/С (rs833061), и +936 С/Т (rs3025039) у населения Хубэй Хань (Wu P. et al., 2015). Установлена связь между полиморфизмом VEGF +936 СС генотипа и риском острого повреждения почек у пациентов с тяжелой формой сепсиса (Cardinal-Fernandez P. et al., 2013).

Другой важной молекулой, участвующей в процессе адаптации к гипоксии, является эндотелиальная NO-синтаза. Генный полиморфизм NOS3 rs1799983 связан с более высоким содержанием VEGF в плазме крови у здоровых доноров, что указывает на их функциональную связь (Saleh A. et al., 2015). Полиморфизм rs7830 гена NOS3 является фактором риска развития терминальной стадии хронической почечной недостаточности (Jimenez-Sousa M.A. et al., 2012). Аллель Т в положении rs2070744 гена NOS3 оказывает влияние на способность синтазы оксида азота вызывать вазодилатацию, что повышает риск развития острой горной болезни (Золотарева

А.Д. и соавт., 2017). Полиморфизм 27-bp VNTR в интроне 4 гена eNOS (эндотелиальная NO-синтаза, Endothelial Nitric Oxide Synthase) является высоким фактором риска развития системной красной волчанки у населения южной Индии (Katkam S.K. et al., 2018). Полиморфизм гена eNOS-T786C, PAI-1(4G/5G) связан с развитием болезни Бюргера, характеризующейся облитерирующим тромбангиитом (Masoudian M. et al., 2016).

Молекула эндотелина-1 (ET-1), экспрессирующаяся в ответ на гипоксию, имеет провоспалительные свойства и может вносить вклад в развитие системного воспаления. Установлено, что отдельный нуклеотидный полиморфизм SNP +138 insA/delA гена ET-1 увеличивает содержание эндотелина в крови и коррелирует с более выраженным системным воспалением при хронической обструктивной болезни легких (Karagianos A. et al., 2011).

Показано, что генотип 4G/4G гена ингибитора активатора плазминогена-1 связан с увеличением концентрации PAI-1 (ингибитор активации плазминогена 1 типа, Plasminogen Activator Inhibitor Type 1) в плазме крови больных сепсисом и с более высокой смертностью в первые 30 дней заболевания, чем у людей с генотипами 4G/5G или 5G/5G (Lorente L. et al., 2015).

По данным литературы, полиморфизм гена ангиотензин-1 превращающего фермента (АПФ, Angiotensin I-Converting Enzyme, ACE) rs4291 генотипа TT или rs4646994 генотипа DD является показателем повышенного риска развития и неблагоприятного прогноза септического шока (Dou X.M. et al., 2017). Связь полиморфизма АПФ с воспалением и клеточной цитотоксичностью была показана у больных с витилиго. У пациентов с DD генотипом уровень IL-6 в сыворотке был значительно выше (Rashed L. et al., 2015).

Установлено, что полиморфизм +9/-9 bp рецептора брадикинина B2 (BDKRB2), расширяющего сосуды, влияет на уровень его экспрессии и продукцию NO в крови, которые были связаны с тяжестью остеоартрита (Chen S. et al., 2017). Таким образом, полиморфизм +9/-9 bp рецептора брадикинина B2 играет существенную роль в воспалительном процессе при остеоартрите.

Таким образом, тяжесть течения воспалительных реакций зависит не только от уровней активации NIF-1 α и NF- κ B, но и определяется полиморфизмом множества генов, ответственных за синтез молекул, определяющих воспалительный и иммунный ответ.

Заключение к обзору литературы

Реакция организма на гипоксию определяется скоростью, степенью и продолжительностью ее развития, а также физиологическим состоянием организма и индивидуальной чувствительностью к кислородной недостаточности, которая во многом определяется генотипом. Генетическую детерминированность устойчивости к гипоксии подтверждают данные о том, что существуют многочисленные полиморфизмы гена фактора, индуцируемого гипоксией – HIF-1 α . Однако показано, что устойчивость к гипоксии зависит и от фенотипических особенностей организма: интенсивности потребления кислорода, метаболизма, поведенческих реакций и ряда других, трудно поддающихся учету, индивидуальных отличий. Кроме того, известно, что существует суточная и сезонная ритмичность устойчивости к гипоксии.

Установлено, что в механизмах системной воспалительной реакции ключевую роль играет гипоксия, обусловленная нарушениями микроциркуляции и диссеминированным внутрисосудистым свертыванием. В связи с этим в отдельных исследованиях показано, что тяжесть течения сепсиса зависит от устойчивости к кислородной недостаточности. В настоящее время молекулярные механизмы гипоксии интенсивно изучаются. Множество работ посвящено HIF-1 – фактору, индуцируемому гипоксией, изучено его влияние практически на все процессы в организме. Известно, что ключевой транскрипционный фактор, активирующийся при гипоксии – HIF-1, взаимосвязан с NF- κ B, регулирующим воспаление. Активация HIF-1 при воспалении в зависимости от типа клеток и тканей может оказывать провоспалительный и противовоспалительный эффекты.

В течение многих десятилетий механизмы влияния гипоксии на физиологические и биохимические процессы в организме изучались на моделях высокоустойчивых и низкоустойчивых к недостатку кислорода животных. Несмотря на то, что существование различий по индивидуальной устойчивости к гипоксии разных видов животных и человека хорошо известно, в настоящее время они остаются недостаточно изученными. Показано, что животные с разной устойчивостью к гипоксии отличаются по многим параметрам, в частности, содержанию эритропоэтина, кортикостерона, норадреналина, ферментов антиоксидантной защиты и др. Однако следует отметить, что в настоящее время при исследовании как молекулярно-биологических, так и биохимических характеристик животных, различающихся по чувствительности к гипобарической гипоксии, существуют различия методических подходов к определению устойчивости животных к недостатку кислорода и оценке показателей в разное время после гипоксического воздействия. В работах разных авторов могут варьировать как модель барокамеры, так и вид животных, критическая «высота», критерий устойчивости к гипоксии и скорость «подъема». Многие авторы указывают на необходимость трехкратного

превышения показателя времени жизни на «высоте» у высокоустойчивых животных по сравнению с низкоустойчивыми для разделения их на группы. Срок включения в эксперимент после определения устойчивости к гипоксии варьирует, рекомендуется включать животных в эксперимент не ранее, чем через 12-15 дней после тестирования, однако такое требование авторами не обосновывается. Существующие методы определения устойчивости к гипоксии животных не учитывают половые и линейные различия. В литературе при определении устойчивости к гипоксии лабораторных животных, как правило, время суток и сезон года не указывается. Установлено влияние на устойчивость к гипоксии циркадианных и сезонных биоритмов, однако инфрадианные биоритмы, которые также могут оказывать воздействие на устойчивость к гипоксии, при проведении исследований не учитываются.

Литературные данные, характеризующие высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии животных, во многих аспектах освещены противоречиво, а течение процессов воспаления у таких особей изучено недостаточно, что требует исследований в этой области, поскольку устойчивость к недостатку кислорода может быть одним из факторов, определяющих течение инфекционно-воспалительных заболеваний. Исследования, посвященные морфологическим и молекулярно-биологическим особенностям системных воспалительных реакций у животных с разной устойчивостью к гипоксии, в литературе отсутствуют. Поэтому необходимо проведение исследования особенностей морфологических проявлений и молекулярно-биологических механизмов развития системной воспалительной реакции у животных, отличающихся по устойчивости к недостатку кислорода, так как это позволит разработать новые подходы к эффективной профилактике и терапии инфекционно-воспалительных заболеваний человека с учетом индивидуальной устойчивости к гипоксии.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы исследования

Объект исследования. Работа выполнена на половозрелых самцах крыс Спрейг-Доули и Вистар в возрасте 10-12 недель, массой тела, соответственно, 210-250 и 220-280 г. (табл. 4).

Таблица 4

Общая характеристика животных

Вид	Линия	Количество	Масса тела, г	Возраст, недели	Питомник
Крысы	Спрейг-Доули	20	210-250	10-12	«Пушино»
	Вистар	180	220-280		«Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России

При поступлении экспериментальных животных в виварий ФГБНУ «НИИ морфологии человека» животных помещали на двухнедельный карантин, содержали по 6-7 особей в клетке при естественном освещении, температуре 20-22°C, относительной влажности 55-65%, свободном доступе к воде и комбикорму ПК-120-1 (ООО «Лабораторснаб», сертификат соответствия № РОССРУ.п081.В00113, ГОСТ Р50258-92).

При работе с экспериментальными животными руководствовались принципами Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов (ETS 123, Страсбург, 1986) и директивы Европейского парламента и Совета Европейского Союза (2010/63/EU, Страсбург, 2010). На проведение эксперимента получено разрешение биоэтической комиссии ФГБНУ «НИИ морфологии человека» (протокол № 16 от 11 ноября 2015 г.).

2.1.1 Определение устойчивости к гипобарической гипоксии

Устойчивость животных к гипоксии определяли в вентилируемой барокамере (рис. 9) с манометром ТВ5 («Росма», Россия) и вакуумным насосом 6MYT80A4 («Smet», Италия), конструкция которой по техническим характеристикам соответствует требованиям, представленным в работах В.А. Березовского (1978), Н.А. Агаджаняна и соавт., (1999), Л.Д. Лукьяновой и Ю.И. Кировой (2011), В. Bhatia et al. (1966), Т. Kugimiya et al. (1984), К. Jain et al. (2013). Крыс линии Спрейг-Доули помещали в барокамеру на критическую «высоту» 9500 м (223 мм рт.ст., 29,7 кПа) в соответствии с литературными данными (Padhy G. et al., 2013; Jain K. et al., 2014; Kumar S. et al., 2014), а крыс Вистар – 11500 м (157 мм рт.ст., 20,9 кПа) по рекомендациям Н.А. Агаджаняна и соавт. (1999), О.Р. Грека и соавт. (2007), В.В. Безрукова и соавт. (2012).

«Подъем» животных на «высоту» осуществляли со скоростью 80 м/с. В помещении, где проводилось исследование, поддерживали температуру 20–22°C.



Рис. 9. Экспериментальная установка для определения устойчивости животных к гипоксии

Устойчивость животных к гипоксии определяли по времени жизни на «высоте», соответствующему временному интервалу от момента «подъема» до признаков асфиксии – нарушения дыхания и бокового положения (Лукьянова Л.Д. и Кирова Ю.И., 2011). К высокоустойчивым к гипоксии относили крыс Спрейг-Доули, время жизни которых на «высоте» составляло более 20 мин (Ghosh D. et al., 2012; Jain K. et al., 2013, 2014; Kumar S. et al., 2014), крыс Вистар – более 4 мин (Каркищенко Н.Н., 2017). К низкоустойчивым к гипоксии животным относили крыс Спрейг-Доули, время жизни которых на «высоте» составляло менее 10 мин, крыс Вистар – 80 сек (рис. 10). Среднеустойчивых к гипоксии животных – время жизни от 10 до 20 мин для крыс Спрейг-Доули, от 80 сек до 4 мин для крыс Вистар – в экспериментах не использовали, кроме исследования взаимосвязи устойчивости к гипоксии и 4-суточного биоритма изменений концентрации кортикостерона в сыворотке крови. Поскольку «высота подъема» в барокамере является критической для животных, отмечалась их гибель: крыс Вистар – 3%, крыс Спрейг-Доули – 10%.

Определение устойчивости животных к недостатку кислорода проводили за месяц до включения их в эксперимент по моделированию системной воспалительной реакции в соответствии с рекомендациями Л.Д. Лукьяновой и соавт. (2009), Л.Д. Лукьяновой и Ю.И. Кировой (2011), Н.Н. Каркищенко (2017) для нивелирования возможного отрицательного воздействия на организм острого гипоксического воздействия.

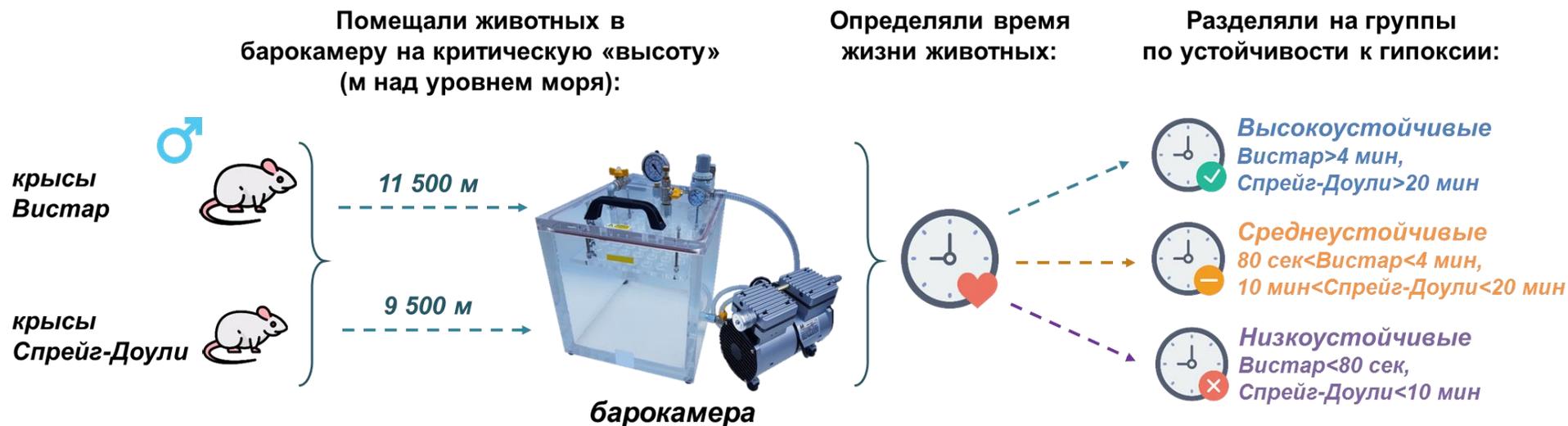


Рис. 10. Схема определения устойчивости к гипоксии крыс Вистар и Спрейг-Доули в барокамере на различной «высоте»

2.1.2 Исследование взаимосвязи устойчивости к гипоксии и 4-суточного биоритма изменений концентрации кортикостерона

Известно, что существует суточная и сезонная ритмичность устойчивости к недостатку кислорода (Рафиков А.М. и Агаджанян Н.А., 1971; Чернобаева Г.Н. и Лукьянова Л.Д., 1989; Kwarecki K. et al., 1984; Masukawa T. и Tochino Y., 1993). По данным В.А. Березовского (1978) и Н.А. Агаджаняна и соавт. (1999), при повторном определении устойчивости к гипоксии в отдаленные сроки процентное соотношение высокоустойчивых и низкоустойчивых животных варьирует. При этом происходит уменьшение численности высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии животных за счет перехода части из них в группу среднеустойчивых (Березовский В.А., 1978; Агаджанян Н.А. и соавт., 1999). Возможно, такие результаты объясняются не только способностью крыс адаптироваться после первого гипоксического воздействия, но и определяются инфрадианной ритмичностью устойчивости к кислородной недостаточности. Поскольку по данным литературы у млекопитающих существует инфрадианная 4-суточная ритмичность изменения концентрации глюкокортикоидных гормонов, влияющих в том числе и на устойчивость к гипоксии (Рафиков А.М. и Агаджанян Н.А., 1971; Диатроптов М.Е. и соавт., 2014), мы исследовали взаимосвязь этого биоритма с устойчивостью к недостатку кислорода. Определение устойчивости к гипоксии с учетом суточной, сезонной и инфрадианной ритмичности позволит минимизировать индивидуальную вариабельность показателей времени жизни, что, в свою очередь, снизит вероятность включения среднеустойчивых животных в группы высокоустойчивых и низкоустойчивых.

В экспериментах по изучению взаимосвязи устойчивости к гипоксии и 4-суточного биоритма содержания кортикостерона использовали крыс Вистар и Спрейг-Доули, которые по данным литературы отличаются по устойчивости к гипоксическому воздействию. С использованием газовой гипоксической смеси, содержащей 2,5% кислорода, показано, что время жизни крыс Вистар в 1,7 раза больше, чем крыс Спрейг-Доули, что указывает на более низкую устойчивость последних к гипоксии (Макарова О.В., 1997).

Определение времени жизни на «высоте» 11500 м самцов крыс Вистар (табл. 5) в одной серии экспериментов проводили однократно в акрофазу (n=13) и батифазу (n=16) инфрадианного 4-суточного биоритма концентрации кортикостерона, а в другой – ежедневно (n=10). Ежедневное определение времени жизни на «высоте» самцов крыс Вистар осуществляли в период с 17 по 28 апреля 2016 г. в 9:00–10:00 по местному времени (г. Москва). Забор крови из хвостовой вены для определения содержания кортикостерона проводили во временном интервале его максимальной суточной концентрации – в 16:00–17:00 (Диатроптов М.Е., 2015) ежедневно в период с 17 по 28 апреля 2016 г. у отдельной группы интактных самцов крыс Вистар (n=6) через 2 мин после

внутримышечного введения золетила («Virbac Sante Animale», Франция) в дозе 10 мг/кг. По данным Д.Ш. Джалиловой и соавт. (2018), ежедневное применение золетила не оказывает влияния на фазу и период 4-суточного биоритма.

Таблица 5

Схема экспериментов по изучению взаимосвязи устойчивости к гипоксии и 4-суточного биоритма содержания кортикостерона у крыс Вистар и Спрейг-Доули

Животные	Количество животных в группе	Время суток, ч	Эксперименты	Сроки проведения экспериментов	
Крысы Вистар 	13	9:00 – 10:00	Однократное определение времени жизни на «высоте»	Акрофаза	инфранианного биоритма кортикостерона
	16			Батифаза	
	10	9:00 – 10:00	Ежедневное определение времени жизни на «высоте»	В течение 12 суток	
	6	16:00 – 17:00	Определение содержания кортикостерона		
Крысы Спрейг-Доули 	9	9:00 – 10:00	Определение устойчивости к гипоксии	В акрофазу	Через 1 мес в батифазу
	9	9:00 – 10:00		В батифазу	Через 1 мес в акрофазу

Определение устойчивости к гипоксии самцов крыс Спрейг-Доули (n=18) в барокамере на «высоте» 9500 м проводили в августе-сентябре 2016 г., акрофазу и батифазу 4-суточного биоритма содержания кортикостерона определяли по календарному методу, описанному в статье М.Е. Диатроптова и соавт. (2014), учитывая, что акрофаза этого биоритма наступает на сутки раньше батифазы инфранианного биоритма пролиферативной активности эпителия пищевода. Животные были разделены на две подгруппы. Устойчивость к гипоксии у первой подгруппы крыс (n=9) оценивали однократно в акрофазу 4-суточного биоритма кортикостерона (табл. 5), через месяц проводили повторное тестирование в противоположную фазу биоритма – в батифазу. У второй подгруппы (n=9) устойчивость к гипоксии сначала определяли в батифазу, а через месяц – в акрофазу 4-суточного биоритма кортикостерона. Устойчивость к гипоксии в группе крыс Спрейг-Доули (n=4) определяли через день, соответственно, в акрофазу и батифазу 4-суточного биоритма содержания кортикостерона.

Поскольку по результатам работы оказалось, что в акрофазу и батифазу инфранианного биоритма кортикостерона возможно ложное включение среднеустойчивых животных в группу высокоустойчивых и низкоустойчивых, в последующих экспериментах определение устойчивости к гипоксии проводили в промежуточные дни между батифазой и акрофазой 4-суточного биоритма, которые определяли по календарному методу, описанному М.Е.

Диатроптовым и соавт. (2014). Все дальнейшие эксперименты были выполнены в осенние и зимние периоды в течение 2 лет с 2016 по 2018 гг.

2.1.3 Исследование динамики молекулярно-биологических и биохимических показателей в ответ на острое гипоксическое воздействие у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар

Оценку различий динамики реакции на острое гипоксическое воздействие высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии животных проводили на крысах Вистар (n=70). Через 5 и 90 мин после острой гипоксической нагрузки на «высоте» 11500 м в барокамере высокоустойчивых (n=14) и низкоустойчивых (n=30) к гипоксии крыс выводили из эксперимента передозировкой (15 мг/кг) золетила («Virbac Sante Animale», Франция). Определяли уровни экспрессии *Hif-1 α* , *Nf- κ b* и *Vegf* в печени, содержание HIF-1 α , эритропоэтина, VEGF, TGF- β и 8-изопростана в сыворотке крови. Выбор сроков исследования обоснован тем, что, по данным K. Jain et al. (2013), в сердце крыс Спрейг-Доули «сразу» после определения устойчивости к гипоксии на «высоте» 9250 м содержание белка HIF-1 α возрастало. Также, по данным ряда авторов, в ответ на двухчасовое воздействие острой нормобарической гипоксии (10% O₂) уровень мРНК *Hif-1 α* в легких мышей повышался в течение 30 мин, достигал пика через час после воздействия и возвращался к исходному уровню через 4 ч. При этом содержание белка HIF-1 α возрастало в ответ на гипоксию через 30 мин и оставалось повышенным в течение 8 ч после гипоксического воздействия (Stroka D.M. et al., 2001; Blouin C.C et al., 2004; BelAiba R.S. et al., 2007). Животных группы сравнения (n=8) гипоксическому воздействию не подвергали.

2.1.4 Моделирование системной воспалительной реакции у крыс Вистар

Исследование различий системной воспалительной реакции и иммунного ответа в разные сроки после введения липополисахарида (ЛПС) в зависимости от исходной устойчивости животных к гипоксии проводили на крысах Вистар (n=60). Через месяц после определения устойчивости к недостатку кислорода высокоустойчивым (n=20) и низкоустойчивым (n=18) к гипоксии животным вводили ЛПС *E. coli* O26:B6 («Sigma-Aldrich», США) в дозе 1,5 мг/кг (рис. 11), которая при внутрибрюшинном введении половозрелым крысам вызывает патологические изменения во внутренних органах (Мишнев О.Д. и соавт., 2003; Писарев В.Б. и др., 2008; Косырева А.М., 2018). Высокоустойчивым (n=5) и низкоустойчивым (n=5) к гипоксии крысам контрольной группы внутрибрюшинно вводили физиологический раствор. Животных выводили из эксперимента передозировкой (15 мг/кг) золетила («Virbac Sante Animale», Франция) через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС, так как известно, что продукция провоспалительных и

противовоспалительных цитокинов, а также экспрессия *Hif-1α* и *Nf-κb* повышаются через 1-3 и 6 ч после введения ЛПС (Blackwell T.S. et al., 2000; Blouin C.C. et al., 2004), а выраженные патологические изменения органов-мишеней – легких и печени – развиваются на первые сутки после введения ЛПС (Писарев В.Б. и соавт., 2008; Косырева А.М., 2018). В ходе эксперимента наблюдали за общим состоянием животных, их подвижностью, отмечали гибель. Оценивали морфологические изменения в легких, печени, тимусе и селезенке, определяли уровни экспрессии *Hif-1α*, *Nf-κb* и *Vegf* в печени, содержание эндотоксина, С-реактивного белка, IL-1β, TGF-β, кортикостерона, неоптерина в сыворотке крови, абсолютное и относительное количество гранулоцитов, субпопуляционный состав лимфоцитов и фагоцитарную активность клеток периферической крови, апоптотическую гибель клеток в тимусе, продукцию IL-10 клетками селезенки.

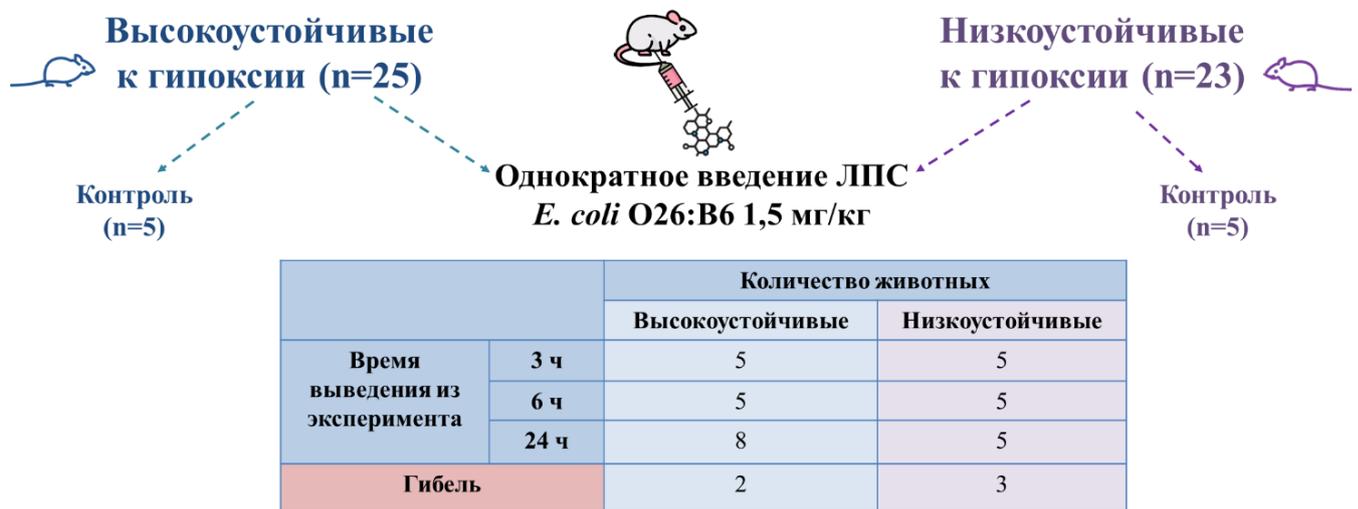


Рис. 11. Схема эксперимента по моделированию системной воспалительной реакции у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар

Материалы исследования. Для гистологического исследования проводили забор легких, печени, тимуса и селезенки. Кровь забирали из шейных вен.

2.2 Методы исследования

Гистологические

Печень и лимфоидные органы крыс – тимус и селезенку – фиксировали в жидкости Буэна (75 мл пикриновой кислоты, 25 мл формалина, 5 мл ледяной уксусной кислоты) в течение 24 ч, легкие – в жидкости Карнуа (60 мл этанола, 30 мл хлороформа, 10 мл ледяной уксусной кислоты) в течение 2 ч.

После гистологической проводки по спиртам восходящей концентрации (70°, 80°, 96°, 100°) и хлороформу в аппарате Tissue-Tek VIP5Jr («Sakura», США) фрагменты органов заливали в гистомикс на приборе Tissue-Tek TEC («Sakura», США), изготавливали гистологические срезы толщиной 5-8 мкм на микротоме Microm HM340E («Thermo Scientific», США). Полученные препараты окрашивали гематоксилином и эозином («БиоВитрум», Россия).

Морфометрические

На гистологических препаратах легких (ув. 400) с помощью микроскопа Leica DM2500 («Leica Microsystems», Германия) проводили подсчет количества нейтрофилов в межальвеолярных перегородках в стандартном поле зрения (25000 мкм²). Объемную плотность функциональных зон тимуса (ув. 200) и селезенки (ув. 200, 400) в гистологических срезах оценивали при световой микроскопии методом точечного счета с помощью сетки Г.Г. Автандилова (1973). У животных с некрозами в печени их площадь измеряли в программе Image Scope M (ув. 200) в интерактивном режиме с использованием камеры Leica DFC290 («Leica Microsystems», Германия). Измерения проводили в 10 полях зрения, результаты выражали в мкм².

Проточная цитофлуориметрия

Анализ субпопуляционного состава лимфоцитов, фагоцитарной активности клеток периферической крови, а также количества апоптотически гибнущих клеток в тимусе у крыс Вистар проводили на проточном цитофлуориметре Cytomics FC 500 («Beckman Coulter», США). С целью определения абсолютного количества лимфоцитов и гранулоцитов в крови оценивали количество лейкоцитов с помощью автоматического гематологического анализатора Mindray BC-2800Vet (Китай), а относительное количество лимфоцитов и гранулоцитов подсчитывали в мазках крови, окрашенных с помощью набора «Лейкодиф 200» («Erba Lachema», Чехия).

Определение субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови

Для анализа субпопуляционного состава лимфоцитов кровь забирали из шейных вен, в качестве антикоагулянта использовали этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА) в концентрации 5 мг/мл. Для иммунофенотипического анализа основных субпопуляций

лимфоцитов периферической крови (табл. 6) крыс Вистар использовали антитела («eBioscience», США), конъюгированные с FITC (Fluorescein Isothiocyanate, флуоресцеин изотиоцианат), PE (Phycoerythrin, фикоэритрин) и PE-Cy7 (Phycoerythrin-Cyanine 7, фикоэритрин-цианин 7): anti-Rat CD3 (маркер Т-лимфоцитов); anti-Rat CD4 (маркер Т-хелперов); anti-Rat CD8a (маркер цитотоксических Т-клеток); anti-Rat CD314 (маркер NK клеток); anti-Rat CD45R (маркер В-лимфоцитов); anti-Rat CD25 (маркер активированных Т-клеток); anti-Mouse/Rat FOXP3 (маркер регуляторных Т-клеток). К 100 мкл крови добавляли антитела: CD3-PE 1 мкл (0,2 мг/мл), CD4-FITC 1 мкл (0,5 мг/мл), CD8a-PE-Cy7 0,5 мкл (0,2 мг/мл), CD45R-FITC 1 мкл (0,5 мг/мл), CD314 (NKG2D)-PE 1 мкл (0,2 мг/мл), CD25-PE 0,5 мкл (0,2 мг/мл), инкубировали в течение 20 мин в темноте. Лизис эритроцитов в образцах цельной крови с ЭДТА осуществляли с помощью раствора OptiLyse C Lysis Solution («Beckman Coulter», США). Субпопуляцию регуляторных Т-лимфоцитов в периферической крови определяли с помощью наборов Regulatory T Cell Staining Kit #3 («eBioscience», США) и FOXP3 Staining Buffer Set («eBioscience», США). К 100 мкл крови добавляли антитела: FOXP3-PE-Cy5 5 мкл (0,2 мг/мл), в качестве изотипического контроля использовали антитела IgG2a-PE-Cy5 5 мкл (0,2 мг/мл). После промывки осадок разводили в 500 мкл PBS (Phosphate Buffered Saline – Фосфатно-Солевой Буфер). Проводили подсчет абсолютного и относительного количества различных субпопуляций лимфоцитов: процентное содержание Т-лимфоцитов (CD3+ клеток), В-лимфоцитов (CD45R+ клеток) и NK клеток (CD314+) периферической крови вычисляли по отношению к абсолютному количеству лимфоцитов; процентное содержание Т-хелперов (CD3+CD4+ клеток) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3+CD8a+ клеток) – по отношению к абсолютному количеству Т-лимфоцитов; процентное содержание регуляторных Т-лимфоцитов (CD4+CD25+FOXP3+ клеток) – по отношению к абсолютному количеству Т-хелперов.

Таблица 6

Использованные системы визуализации для выявления субпопуляций лимфоцитов периферической крови и апоптотически гибнущих клеток в тимусе

Фенотип	Система визуализации	Тип клеток
CD3+CD4+	PE, FITC	Т-хелперы
CD3+CD8a+	PE, PE-Cy7	Цитотоксические Т-лимфоциты
CD3-CD45R+	FITC, PE	В-лимфоциты
CD45R-CD314+	FITC, PE	NK клетки
CD4+CD25+FOXP3+	FITC, PE, PE-Cy5	Регуляторные Т-лимфоциты
CD4+CD25+IgG2a+	FITC, PE, PE-Cy5	Изотипический контроль для FOXP3+
АннексинV+PI-	FITC, PI	Апоптоз

Определение фагоцитарной активности клеток периферической крови

Для определения фагоцитарной активности клеток периферической крови крыс Вистар использовали набор IngoFlowEx kit («Exbio Diagnostics», Чехия). Клетки крови инкубировали с *E. coli*, конъюгированной с FITC, при 37°C в термостате ТС-1/80 СПУ (Россия) в течение 30 мин в соответствии с инструкцией. Не связанные с клетками крови *E. coli* отмывали, эритроциты лизировали с помощью прилагаемого лизирующего раствора. Параллельно проводили контрольную реакцию без *E. coli*. Фагоцитарную активность характеризовали по фагоцитарному показателю – % клеток (нейтрофилов и моноцитов), участвующих в фагоцитозе, и индексу стимуляции – средней степени флуоресценции FITC-*E. coli* в фагоцитирующих клетках (Назаренко Г.И. и Кишкун А.А., 2006).

Определение количества апоптотически гибнущих клеток в тимусе

Для определения количества апоптотически гибнущих клеток в тимусе получали суспензию с помощью гомогенизатора Поттера в культуральной среде RPMI 1640 (Gibco, Великобритания). Использовали набор Annexin V FITC kit («Beckman Coulter», Франция): клетки инкубировали с антителами («eBioscience», США), конъюгированными с PE: anti-Rat CD3+ (маркер Т-лимфоцитов), затем – с аннексином (AnnexinV+), конъюгированным с FITC, и пропидий иодидом (PI, Propidium Iodide). Проводили оценку количества апоптотически гибнущих клеток (AnnexinV+PI-) в суспензии.

Культуральные

Для исследования уровня продукции цитокинов клетки селезенки крыс Вистар выделяли с помощью гомогенизатора Поттера. Выделенные клетки центрифугировали в среде 199 («ПанЭко», Россия) в течение 10 мин при 100g. Лизис эритроцитов вызывали осмотическим шоком с помощью 1 мл дистиллированной воды в течение 10 сек. Количество жизнеспособных ядродержащих клеток в 1 мл суспензии определяли в камере Горяева. Жизнеспособность клеток составляла 97-98%. Среда для культивирования клеток селезенки состояла из RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 («ПанЭко», Россия) с 5% инактивированной телячьей эмбриональной сыворотки («Biosera», Мексика), 2 мМ глутамина («ПанЭко», Россия) и 50 мкг/мл гентамицина («ПанЭко», Россия).

Для индукции синтеза и секреции цитокинов суспензию клеток селезенки в концентрации $1 \cdot 10^6$ /мл культивировали 18 ч в 1 мл полной ростовой среды с добавлением конканавалина А в конечной концентрации 5 мкг/мл («ПанЭко», Россия) в 24-луночных культуральных планшетах

в CO₂-инкубаторе при +37°C в атмосфере 5% углекислого газа («Sanyo», Япония). По окончании инкубации отбирали супернатанты, которые хранили в течение 1 недели при -70°C.

Иммуноферментный анализ

В культуральной жидкости клеток селезенки определяли концентрацию IL-10 с помощью наборов фирмы «Cloud-Clone Corp.» (Китай) согласно приложенной инструкции.

Для получения сыворотки кровь забирали из шейных вен, центрифугировали при 200g в течение 15 мин, сыворотку аликвотировали по 200 мкл, замораживали при -20°C и хранили в течение 1 месяца при -70°C. В сыворотке крови крыс методом иммуноферментного анализа проводили определение содержания эритропоэтина, 8-изопростана, С-реактивного белка, IL-1 β , HIF-1 α , VEGF с использованием соответствующих наборов («Cloud-Clone Corp.», Китай), кортикостерона и неоптерина («IBL International», Германия) и TGF- β («eBioscience», США); с помощью хромогенного LAL-теста (Limulus Amebocyte Lysate-тест) оценивали уровень эндотоксина («Hycult Biotech», США) согласно приложенной инструкции.

Для регистрации интенсивности цветной реакции использовали микропланшетный ИФА-анализатор («ANTHOS 2010», Австрия).

Биохимические

Для оценки повреждения печени в сыворотке крови на автоматическом биохимическом анализаторе Mindray Bs-120 (Китай) кинетическим методом определяли активность ферментов аспаратаминотрансферазы (АСТ) и аланинаминотрансферазы (АЛТ). Использовали наборы реактивов «Human GmbH» (Германия).

Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

Методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени определяли уровни экспрессии мРНК *Hif-1 α* , *Nf- κ b* и *Vegf* в печени крыс Вистар.

Выделение РНК

Немедленно после выведения животных из эксперимента фрагмент печени размером 3-5 мм помещали в 1 мл фиксатора Intact RNA («Евроген», Россия), инкубировали в течение суток при +4°C, образцы хранили при -20°C.

Для выделения тотальной РНК использовали набор RNeasy Plus Mini Kit («QIAGEN», Германия). Ткань (около 30 мг) гомогенизировали в прилагаемом буфере Buffer RLT Plus с меркаптоэтанолом на гомогенизаторе TissueLyser LT («QIAGEN», Германия) 4 мин при 40 Гц, гомогенат центрифугировали в течение 3 мин при 9500g в центрифуге Eppendorf Mini Spin Plus («Eppendorf», Германия), супернатант переносили в gDNA Eliminator для удаления геномной

ДНК. Центрифугировали 30 сек при 8000g, к осадку добавляли равный объем 70% этилового спирта, тщательно перемешивали. Образец переносили в RNeasy Spin Column, центрифугировали 30 сек при 8000g, добавляли Buffer RW1, центрифугировали 30 сек при 8000g, добавляли Buffer RPE, центрифугировали 30 сек при 8000g. Добавляли Buffer RPE, центрифугировали 2 мин при 8000g, затем при 9500g для высушивания, добавляли 40 мкл стерильной воды, свободной от РНКаз, и центрифугировали 1 мин при 8000g. Полученную РНК хранили при -70°C , отбирали аликвоты для оценки качества выделения РНК.

Определение присутствия РНК методом электрофореза в агарозном геле

Готовили камеру для электрофореза с 1% агарозным гелем на TAE-буфере с добавлением бромистого этидия. Раскапывали по лункам образцы РНК, смешанные с буфером для нанесения (Loading Buffer For DNA Ladders, НПО «СибЭнзим», Россия). Подключали электроды к блоку питания, устанавливали силу тока 80 мА, через 30 мин переносили гель в трансиллюминатор и фотографировали в лучах ультрафиолета при длине волны 254 нм. В пробах были видны полосы РНК, что свидетельствует о ее сохранности (рис. 12).

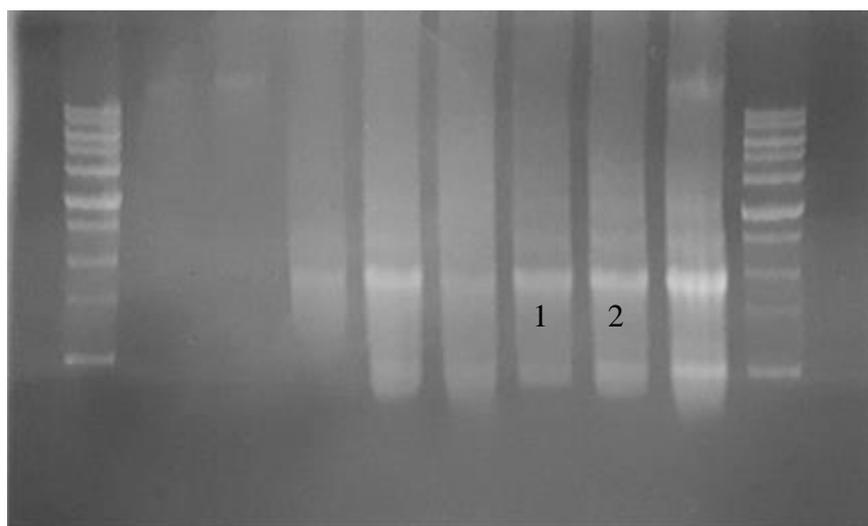


Рис. 12. Электрофорез. Полосы РНК, выделенной из печени высокоустойчивых (1) и низкоустойчивых (2) к гипоксии крыс Вистар

Обратная транскрипция

Для получения кДНК по матрице РНК использовали готовый набор реактивов MMLV RT Kit («Евроген», Россия), постановку реакции проводили согласно приложенной инструкции. К 6 мкл РНК добавляли 2 мкл случайного декануклеотидного праймера (Random dN) и 1 мкл стерильной воды, свободной от РНКаз, нагревали на $+70^{\circ}\text{C}$ в термостате «Термит» («ДНК-технология», Россия) в течение 2 мин для расплавления вторичных структур РНК, затем хранили на льду ($+4^{\circ}\text{C}$). В реакционную смесь добавляли 4 мкл 5X буфера для синтеза первой цепи (280

мМ Трис-НСl, 375 мМ КСl, 30 мМ MgCl₂, рН 8,7), 2 мкл смеси dNTP, 2 мкл DTT и 2 мкл стерильной воды, свободной от РНКаз. Непосредственно перед реакцией в смесь вносили 1 мкл MMLV ревертазы (обратной транскриптазы вируса лейкемии мышей) и добавляли к РНК. Пробирки нагревали в термостате «Гном» («ДНК-технология», Россия) при +39°С в течение 60 мин, затем при +70°С 10 мин в термостате «Термит» («ДНК-технология», Россия). Синтезированную кДНК разбавляли стерильной водой, свободной от РНКаз. Полученные библиотеки кДНК замораживали и хранили при -70°С.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени

С использованием смеси для ПЦР qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Россия), содержащей флуоресцентный интеркалирующий краситель Sybr Green I, согласно приложенной инструкции определяли уровни экспрессии мРНК *Hif-1α*, *Nf-κb* и *Vegf* относительно уровня экспрессии мРНК β₂-микроглобулина *B2m* на Real-Time амплификаторе DTprime («ДНК-Технология», Россия). В пробу добавляли 1 мкл раствора кДНК и по 1 мкл праймера. Праймеры для ПЦР подбирали с помощью on-line программы Primer-BLAST в соответствии с общепринятыми требованиями. Использовали праймеры (табл. 7), синтезированные фирмой «Синтол» (Россия).

Структура использованных для ПЦР праймеров («Синтол», Россия)

Ген	Направление последовательности	Последовательность (5' к 3')	NCBI Ref Seq	Определяемый ген
<i>B2m</i>	Прямая	CTCGCTCGGTGACCGTGAT	NM_012512.2	<i>Rattus norvegicus</i> beta-2 microglobulin (<i>B2m</i>), mRNA
	Обратная	GGACAGATCTGACATCTCGA		
<i>Hif-1α</i>	Прямая	GAGCCTTAACSTATCTGTCA	NM_024359.1	<i>Rattus norvegicus</i> hypoxia inducible factor 1 alpha subunit (<i>Hif-1α</i>), mRNA
	Обратная	CACAATCGTAACTGGTCAGC		
<i>Nf-κb</i>	Прямая	GACGATCCTTTCGGAAGT	NM_001276711.1	<i>Rattus norvegicus</i> nuclear factor kappa B subunit 1 (<i>Nf-κb1</i>), mRNA
	Обратная	GCATATGCCGTCCTCACAG		
<i>Vegf</i>	Прямая	GGATCAAACCTCACCAAAGC	NM_001317043.1	<i>Rattus norvegicus</i> vascular endothelial growth factor A (<i>Vegf-a</i>), mRNA
	Обратная	GGTTAATCGGTCTTTCCGGT		

Объем смеси доводили до 25 мкл. Использовали режим амплификации, представленный в таблице 8.

Таблица 8

Режим амплификации кДНК

Стадия	Количество циклов	Температура	Время инкубации	
Предварительная денатурация	1	95°C	5 мин	
Денатурация	40	94°C	10 сек	
Отжиг		62°C	10 сек	Детекция SYBR Green
Элонгация		72°C	20 сек	

В качестве эндогенного контроля был выбран ген β_2 -микроглобулина *B2m*. Для анализа экспрессии генов использовали метод определения порогового цикла (C_t) и вычисления относительной экспрессии гена по M.W. Pfaffl (2001). Относительную концентрацию мРНК указанных генов рассчитывали прямым сравнением данных по формуле: $[A]_0/[B]_0 = E^{\Delta C(T)}$, где $[A]_0$ – начальная концентрация мРНК гена в ПЦР-смеси, $[B]_0$ – начальная концентрация мРНК *B2m* в ПЦР-смеси, E – эффективность реакции (принимали равной 1,98), $\Delta C(T)$ – разность пороговых циклов *B2m* и искомого гена, используемой в программе «REST 2009» и Microsoft Office Excel 2016.

Статистические методы

Полученные данные подвергали статистической обработке. Характер распределения показателей устанавливали с помощью теста Колмогорова-Смирнова. Поскольку по результатам теста данные были распределены ненормально, для установления достоверности различий использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни, критерий множественного сравнения Крускала-Уоллиса (Гржибовский А.М. и др., 2016). Если по результатам теста Крускала-Уоллиса выявлялись различия, применяли множественное сравнение средних рангов для всех групп («Statistica 8.0») или критерий Данна для установления различий между группами (настройка «AtteStat» для Microsoft Office Excel 2007) (Гланц С., 1998; Мاستицкий С.Э., 2009). Для выявления инфрадианного биоритма в динамике устойчивости к гипоксии применяли метод наложенных эпох (Дещеревский А.В., Лукк А.А., 2002). С целью установления корреляционных связей вычисляли коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Сравнение двух выборочных

долей проводили с помощью z -критерия («SigmaStat 3.5»). Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Показатели выражали в виде медианы и интерквартильного размаха Me (25%;75%). Данные представляли графически с использованием диаграмм размаха с изображением медианы, интерквартильного размаха, нижнего (25%) и верхнего (75%) экстремумов в программах «Statistica 8.0» и Microsoft Office Excel 2016. Проводили фотодокументирование с помощью микроскопа Axioplan 2 Imaging («Carl Zeiss», Германия).

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Взаимосвязь устойчивости к гипоксии крыс Вистар и Спрейг-Доули и 4-суточного биоритма изменений концентрации кортикостерона в сыворотке крови

3.1.1 Однократное и многократное (ежедневное) определение времени жизни крыс Вистар на критической «высоте»

При *однократном* определении времени жизни самцов крыс Вистар ($n=29$) на «высоте» 11500 м выявлены достоверные различия показателей у животных, исследованных в разные календарные даты, связанные с фазой инфрадианного 4-суточного биоритма концентрации кортикостерона в сыворотке крови (рис. 13). Для определения акрофазы и батифазы 4-суточного биоритма кортикостерона использовали календарный метод М.Е. Диатроптова и соавт. (2014). В период акрофазы биоритма время жизни животных на «высоте» составило 67 (57–102) сек, а в период батифазы – 26 (17–48) сек, сравниваемые показатели статистически значимо различались ($p=0,000045$).

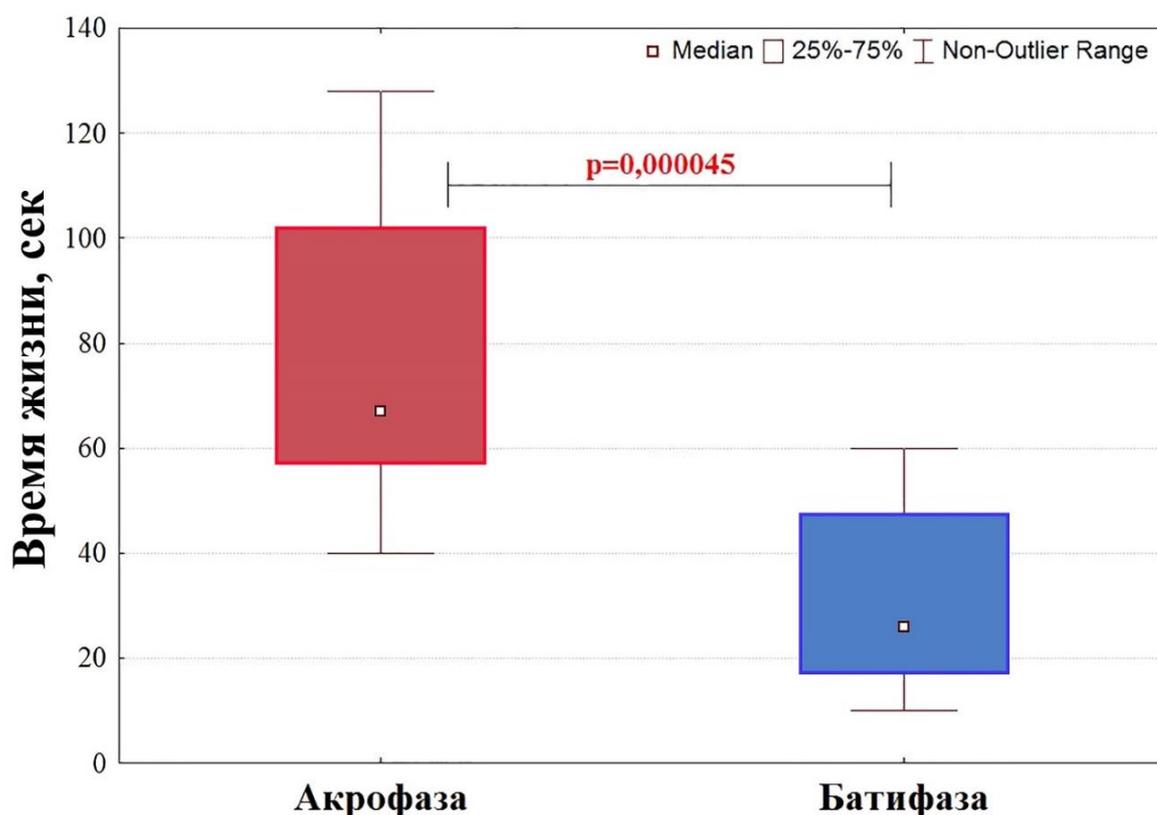


Рис. 13. Время жизни крыс Вистар на «высоте» 11500 м при однократном определении устойчивости к гипоксии в акрофазу ($n=13$) и батифазу ($n=16$) 4-суточного биоритма содержания кортикостерона в сыворотке крови. Данные представлены в виде Ме (25%;75%). p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

При *многократном (ежедневном)* определении в течение 12 суток времени жизни в барокамере самцов крыс Вистар ($n=10$) и концентрации кортикостерона в сыворотке крови ($n=6$) выявлены синфазные 4-суточные колебания этих двух показателей. Индивидуальные кривые динамики содержания кортикостерона были синхронными у разных животных, что позволило представить результаты в целом по группе (рис. 14).

Н.А. Агаджанян и соавт. (1999) выявили различия в устойчивости к гипобарической гипоксии при её повторном определении (через 1-39 суток) и предположили, что они связаны с фазной адаптацией к первому острому гипоксическому воздействию. С целью исключения возможной синхронизации волнообразной адаптации к гипоксии, обусловленной первым острым гипоксическим воздействием, животные были разделены на две подгруппы ($n=5$ в каждой). В первой подгруппе (№1) процедуру ежедневного определения устойчивости к гипоксии начинали 17, а во второй (№2) – 19 апреля. Аналогичный подход был использован и при получении образцов крови для исследования концентрации кортикостерона у отдельной группы крыс, что обеспечило нивелирование влияния на фазу 4-суточного биоритма первого определения устойчивости к гипоксии и концентрации кортикостерона в сыворотке крови. Различий в фазе 4-суточных биоритмов у животных этих двух подгрупп выявлено не было (рис. 14). Коэффициент корреляции между показателями времени жизни на «высоте» первой и второй подгрупп составил 0,75 ($p=0,01$).

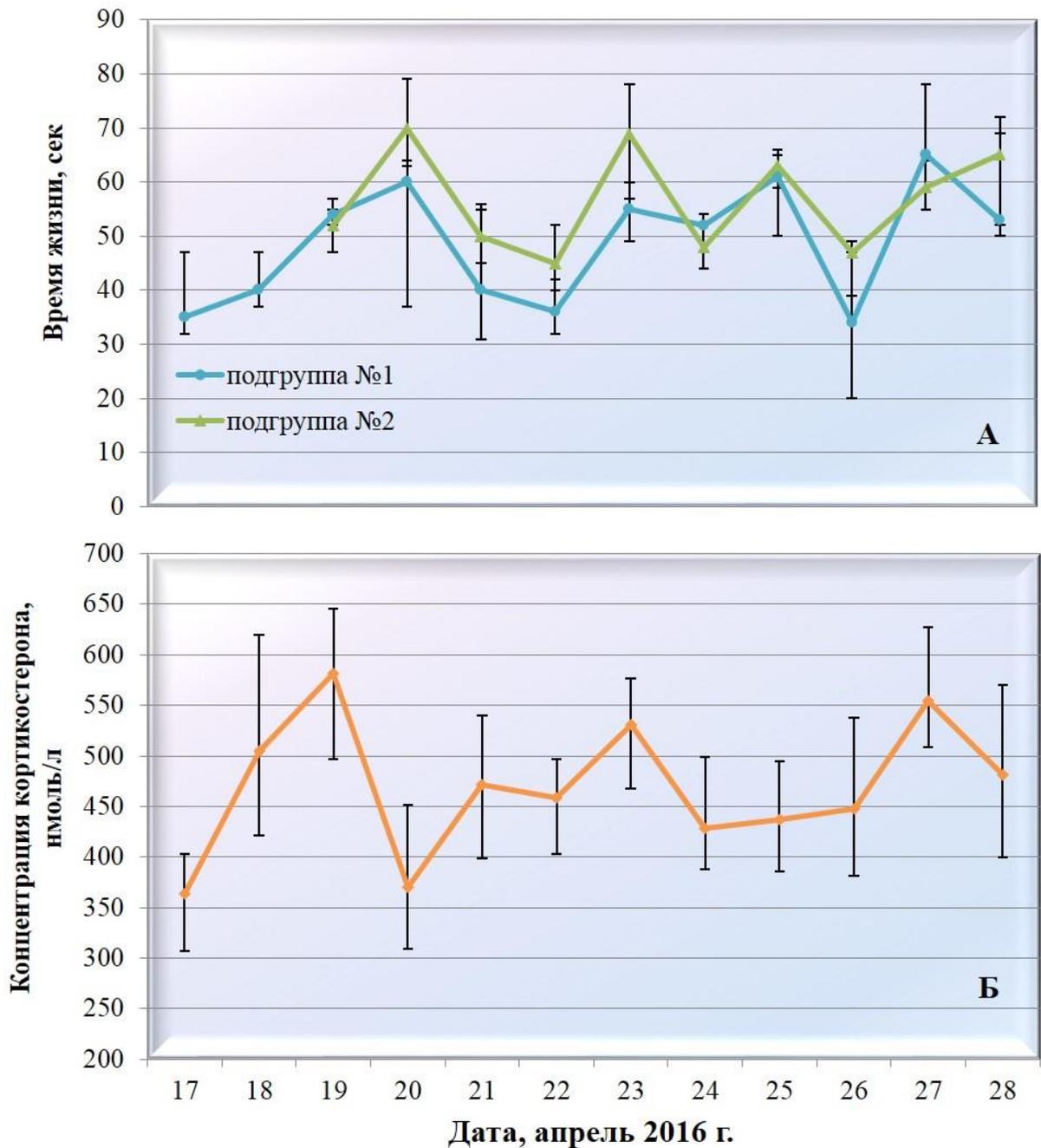


Рис. 14. Динамика показателей времени жизни на «высоте» 11500 м (А) двух подгрупп самцов крыс Вистар ($n=5$ в каждой), ежедневное тестирование подгруппы №1 начинали 17, а №2 – 19 апреля 2016 г., и изменение концентрации кортикостерона (Б) в сыворотке крови у крыс, не подвергавшихся гипоксической нагрузке ($n=6$). Данные представлены в виде Ме (25%;75%)

С целью выявления статистически значимых различий показателей устойчивости к гипоксии в разные фазы инфрадианного биоритма показатели времени жизни крыс были распределены методом наложения эпох по дням 4-суточного периода (рис. 15). Значения показателей времени жизни крыс на «высоте» 17, 21 и 25 апреля были отнесены к первому; показатели 18, 22 и 26 апреля – ко второму; 19, 23 и 27 апреля – к третьему; 20, 24 и 28 апреля – к четвертому дню 4-суточного периода. Показатели времени жизни животных в акрофазе, когда содержание кортикостерона было максимальным и составило 548 (487–580) нмоль/л, были равны

55 (50–57) сек, а в бати́фазе, когда концентрация корти́костерона была минимальной – 426 (391–475) нмоль/л, составили 37,5 (33–48) сек. Показатели времени жизни животных в барокамере в акро́фазе и бати́фазе 4-суточного биоритма концентрации корти́костерона в сыворотке крови статистически значимо различались между собой ($p=0,006$).

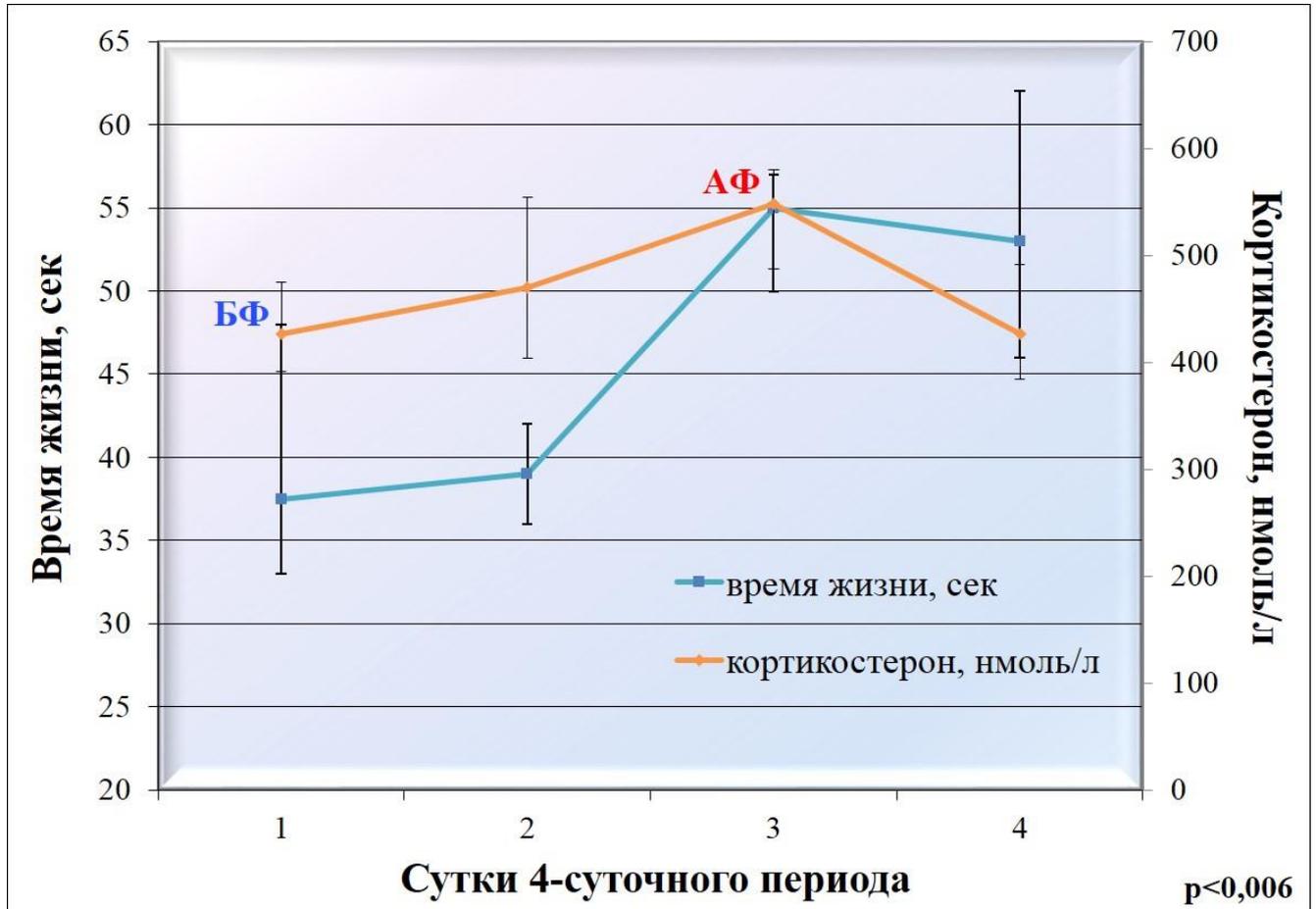


Рис. 15. Распределение методом наложенных эпох по дням 4-суточного периода всех полученных показателей ($n=94$) времени жизни на «высоте» 11500 м крыс Вистар ($n=16$) за период с 17 по 28 апреля 2016 г. **АФ** – акрофаза, **БФ** – бати́фаза инфрадианного биоритма концентрации корти́костерона. Данные представлены в виде Me (25%;75%). p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

На рис. 14 прослеживается тенденция к постепенному увеличению времени жизни животных на «высоте», очевидно, связанная с адаптационным процессом. Следует отметить, что у двух крыс, одна из которых отличалась минимальной (рис. 16, А) по группе устойчивостью к гипоксии, а другая – максимальной (рис. 16, Б), динамика времени жизни также варьировала. Однако у наименее устойчивой к гипоксии крысы регистрировалось постепенное снижение показателей времени жизни от 50 до 22 сек, что, очевидно, связано со срывом адаптации, в то время как наиболее устойчивая к недостатку кислорода особь характеризовалась значительно большим увеличением показателя времени жизни к концу эксперимента (от 60 до 520 сек), чем группа в целом (от 42 до 60 сек).

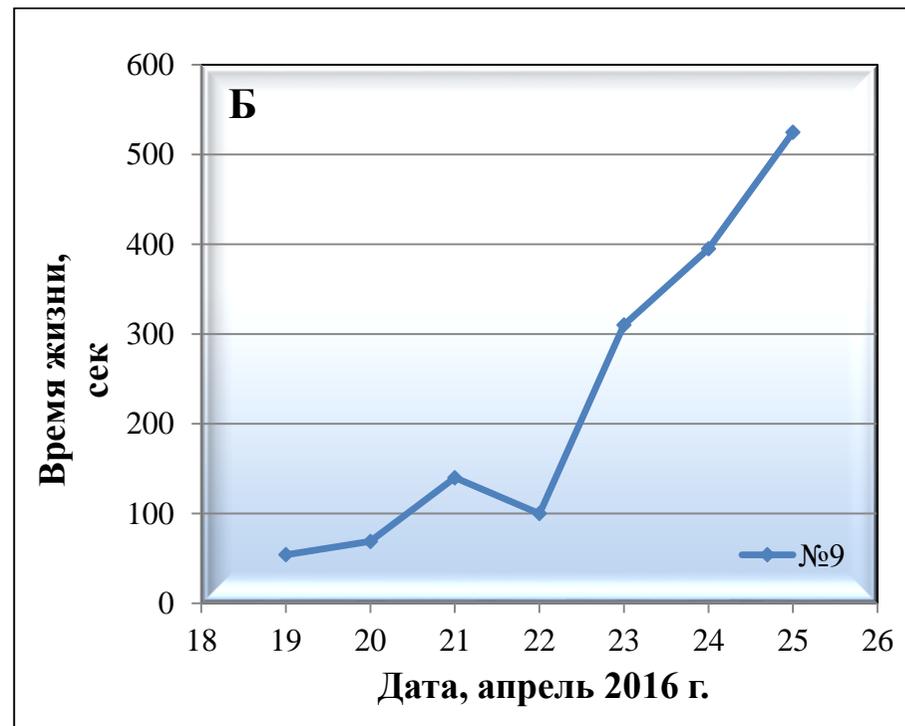
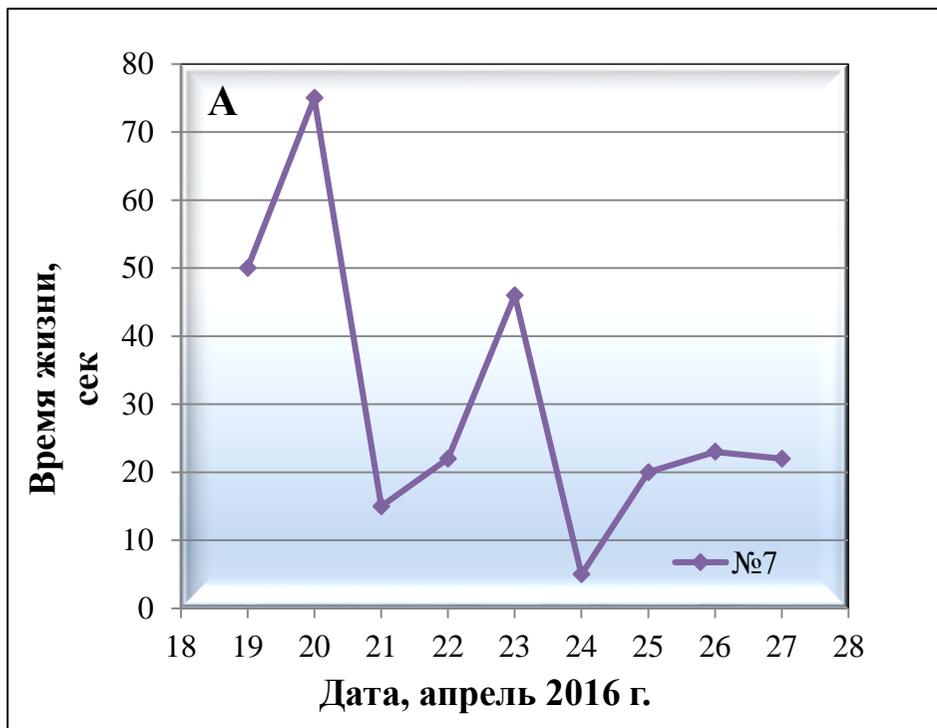


Рис. 16. Время жизни на «высоте» 11500 м одного наименее (А) и одного наиболее (Б) устойчивого к гипоксии самцов крыс Вистар

В группе из 10 крыс Вистар, подвергавшихся ежедневному гипоксическому воздействию, 8 особей имели сходную устойчивость к гипоксии, что не позволило разделить их на группы высокоустойчивых и низкоустойчивых особей. Известно, что при воздействии газовой гипоксической смеси, содержащей 2,5% O₂, время жизни крыс Вистар в 1,7 раза больше, чем крыс Спрейг-Доули, что указывает на более низкую устойчивость последних к кислородной недостаточности (Макарова О.В., 1997). Поэтому дальнейшие исследования зависимости устойчивости к гипоксии от инфранианного биоритма концентрации кортикостерона нами были проведены на более чувствительных к гипоксии крысах линии Спрейг-Доули.

3.1.2 Определение устойчивости к гипоксии крыс Спрейг-Доули в акрофазу и батифазу инфранианного биоритма содержания кортикостерона в сыворотке крови

Самцы крыс Спрейг-Доули (n=18) были разделены на две подгруппы по 9 крыс в каждой. Устойчивость к гипоксии на «высоте» 9500 м у первой подгруппы животных однократно определяли в акрофазу 4-суточного биоритма содержания кортикостерона в сыворотке крови, а у второй – в батифазу. Через месяц проводили повторное определение устойчивости к гипоксии этих подгрупп животных в противоположную фазу инфранианного биоритма, а именно, у первой подгруппы в батифазу, а у второй – в акрофазу.

При определении устойчивости к гипоксии в акрофазу 4-суточного биоритма содержания кортикостерона из 18 крыс Спрейг-Доули к высокоустойчивым (время жизни на «высоте» более 20 мин) было отнесено 12 особей, к среднеустойчивым (время жизни от 10 до 20 мин) – 4 и к низкоустойчивым (время жизни менее 10 мин) – 2 крысы. При тестировании этих же животных в батифазу 4-суточного биоритма концентрации кортикостерона высокоустойчивыми оказались 6 особей, среднеустойчивыми 2, а низкоустойчивыми – 10 крыс, т.е. среднеустойчивые особи стали низкоустойчивыми, а часть высокоустойчивых среднеустойчивыми и даже низкоустойчивыми (рис. 17). При определении устойчивости к гипоксии в акрофазу низкоустойчивыми оказались 11% животных, а в батифазу – 55%, что по z-критерию статистически значимо различалось (p=0,01). При тестировании в акрофазу высокоустойчивые животные составляли 66%, а в батифазу – 33%, что по z-критерию статистически значимо не различалось (p=0,1).



Рис. 17. Распределение крыс Спрейг-Доули (n=18) при определении устойчивости к гипоксии в зависимости от фазы 4-суточного биоритма концентрации кортикостерона в сыворотке крови

У группы крыс Спрейг-Доули (n=4) определяли устойчивость к гипоксии через день, соответственно, в акрофазу и батифазу 4-суточного биоритма (рис. 18). Часть особей в батифазу биоритма по сравнению с акрофазой переходила из среднеустойчивых в низкоустойчивые, а часть высокоустойчивых – в среднеустойчивые.

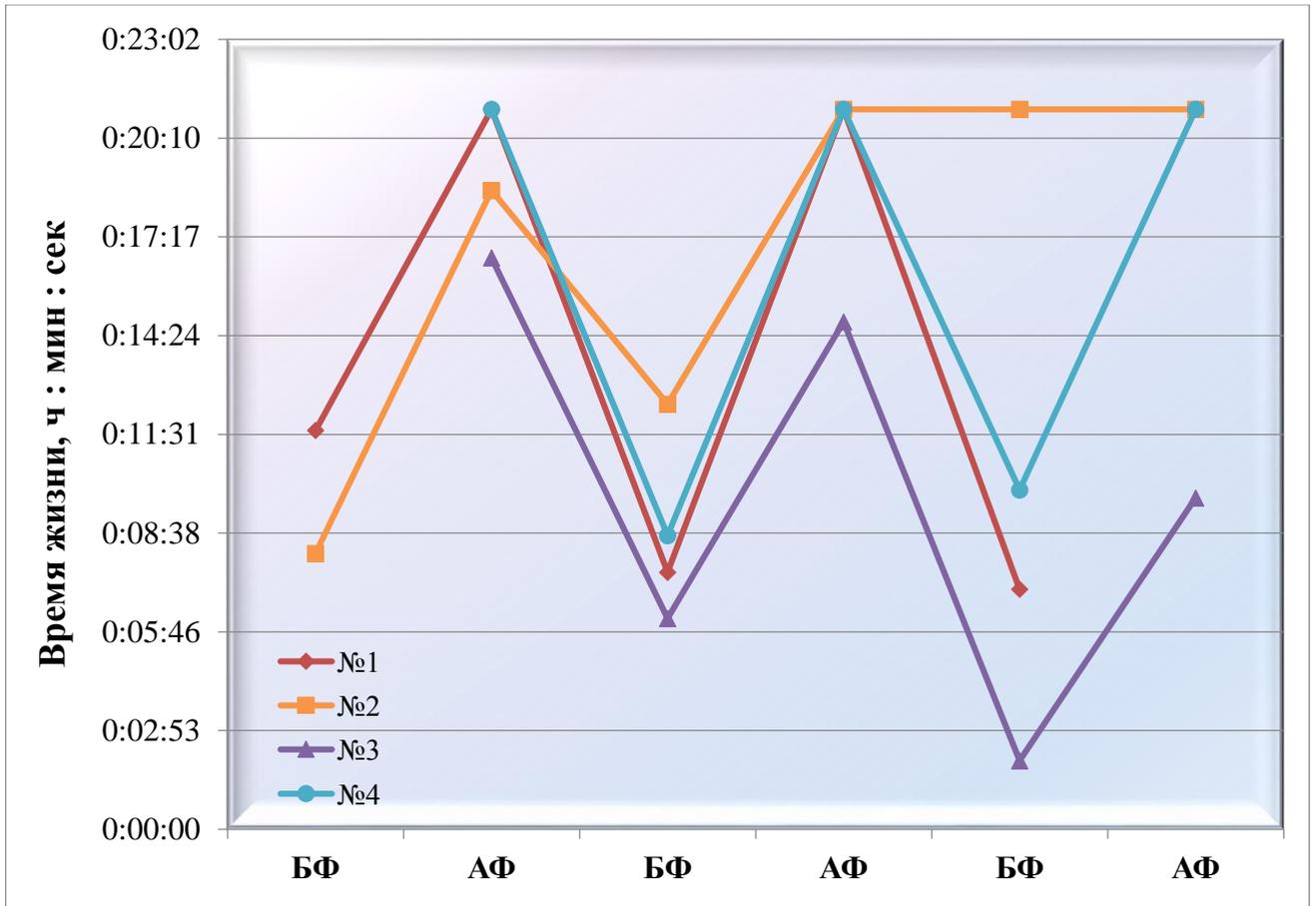


Рис. 18. Индивидуальная динамика устойчивости к гипоксии самцов крыс Спрейг-Доули (№1-4), тестирование которых проводили каждые двое суток, соответственно в акрофазу и батифазу инфрадианного 4-суточного биоритма содержания кортикостерона. Процедуру определения чувствительности к гипоксии для высокоустойчивых крыс, у которых нарушения дыхания не наблюдалось в течение 20 мин, заканчивали на 21-ой мин эксперимента. По оси абсцисс: фаза 4-суточного биоритма концентрации кортикостерона в сыворотке крови, **БФ** – батифаза, **АФ** – акрофаза, соответственно, 18, 20, 22, 24, 26, 28 сентября 2016; по оси ординат: время жизни, ч : мин : сек.

Таким образом, установлено влияние фазы 4-суточного биоритма концентрации кортикостерона в сыворотке крови на устойчивость к гипоксии у самцов крыс. В период акрофазы 4-суточного биоритма кортикостерона время жизни животных на «высоте» было статистически значимо выше, чем в период его батифазы, что показано как на крысах Вистар, так и Спрейг-Доули, которые различаются по устойчивости к гипоксии. Выявлен инфрадианный 4-суточный биоритм устойчивости к гипоксии, синфазный с биоритмом содержания кортикостерона в сыворотке крови. Показано изменение устойчивости к гипоксии в акрофазу и батифазу 4-суточного биоритма концентрации кортикостерона и переход высокоустойчивых животных в группу среднеустойчивых и низкоустойчивых.

Поскольку по результатам работы оказалось, что в акрофазу и батифазу инфрадианного биоритма содержания кортикостерона в группе крыс наблюдается статистически значимое

изменение соотношения животных с разной устойчивостью к гипоксии, дальнейшие исследования по определению устойчивости к недостатку кислорода проводили в промежуточные между акрофазой и батифазой дни 4-суточного биоритма, характеризующиеся средними показателями содержания кортикостерона в сыворотке крови. Фазу 4-суточного биоритма определяли по календарному методу М.Е. Диатроптова и соавт. (2014).

3.2 Сравнительная характеристика динамики молекулярно-биологических и биохимических показателей у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс после гипоксического воздействия

Определяли различия динамики реакции на острое гипоксическое воздействие через 5 и 90 мин после определения устойчивости к гипоксии на критической «высоте» 11500 у высокоустойчивых (n=14) и низкоустойчивых (n=30) к недостатку кислорода крыс Вистар. Выбор сроков исследования обоснован тем, что в сердце крыс Спрейг-Доули «сразу» после определения устойчивости к гипоксии на «высоте» 9250 м содержание белка HIF-1 α возрастало (Jain K. et al., 2013). По данным литературы, в ответ на двухчасовое воздействие острой нормобарической гипоксии (10% O₂) уровень экспрессии *Hif-1 α* в легких мышей повышался в течение 30 мин, был максимальным через час после воздействия и возвращался к исходному уровню через 4 ч. При этом содержание белка HIF-1 α увеличивалось в ответ на гипоксическое воздействие через 30 мин и оставалось повышенным в течение 8 ч (Stroka D.M. et al., 2001; Blouin C.C et al., 2004; BelAiba R.S. et al., 2007). Определяли уровень экспрессии мРНК *Hif-1 α* в печени, а также содержание белка HIF-1 α в сыворотке крови, обеспечивающих реакцию на гипоксическое воздействие, оценивали экспрессию в печени ключевого фактора, регулирующего процессы воспаления – *Nf- κ b*, и содержание в сыворотке крови противовоспалительного белка TGF- β . Исследовали экспрессию гена *Vegf* в печени, содержание белка VEGF и эритропоэтина, обеспечивающих адаптацию к недостатку кислорода, а также маркера окислительного стресса – 8-изопростана в сыворотке крови. Животных группы сравнения (n=8) гипоксическому воздействию не подвергали.

3.2.1 Уровень экспрессии гена *Hif-1 α* в печени и его содержание в сыворотке крови через 5 и 90 мин после гипоксического воздействия у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар

Методом ПЦР установлены различия в уровне экспрессии гена *Hif-1 α* клетками печени у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар в разные сроки после гипоксического воздействия. Показано, что через 5 мин после гипоксической нагрузки экспрессия гена *Hif-1 α* повышалась как у высокоустойчивых, так и у низкоустойчивых к гипоксии крыс, но у высокоустойчивых животных была значительно выше, чем у низкоустойчивых (рис. 19, табл. 9, 10). Через 90 мин после гипоксической нагрузки в барокамере как у высокоустойчивых, так и у низкоустойчивых к недостатку кислорода животных уровень экспрессии мРНК *Hif-1 α* оставался повышенным в отличие от группы сравнения.

Таблица 9

Уровень экспрессии гена *Hif-1α* в печени и содержание белка HIF-1α в сыворотке крови крыс Вистар без воздействия, высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии через 5 и 90 мин после гипоксического воздействия, Ме (25%;75%). p – статистическая значимость различий между высокоустойчивыми и низкоустойчивыми к гипоксии крысами Вистар, критерий Манна-Уитни

Группа наблюдения Параметры	Без гипоксического воздействия (1)	После гипоксического воздействия					
		Через 5 мин			Через 90 мин		
		ВУ (2)	НУ (3)	p (2-3)	ВУ (4)	НУ (5)	p (4-5)
Экспрессия гена <i>Hif-1α</i> в печени, усл. ед., · 10 ⁻³	0,003 (0,001-0,004)	1,6 (0,4-7,0)	0,2 (0,1-0,4)	0,004	0,3 (0,1-0,5)	0,8 (0,2-1,0)	0,10
Содержание HIF-1α в сыворотке крови, нг/мл	0,05 (0,045-0,12)	0,27 (0,25-0,28)	0,12 (0,08-0,18)	0,16	0,075 (0,069-0,075)	0,024 (0,015-0,096)	0,80

Таблица 10

Достигнутая значимость различий (p) показателей экспрессии гена *Hif-1α* в печени крыс Вистар без воздействия, высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии через 5 (ВУ5, НУ5) и 90 (ВУ90, НУ90) мин после гипоксического воздействия (критерии Крускала-Уоллиса и Данна)

	Без гипоксического воздействия	ВУ5	ВУ90		Без гипоксического воздействия	НУ5	НУ90
Без гипоксического воздействия	-	0,000048	0,002	Без гипоксического воздействия	-	0,017	0,000009
ВУ5	0,000048	-	0,342	НУ5	0,017	-	0,202
ВУ90	0,002	0,342	-	НУ90	0,000009	0,202	-

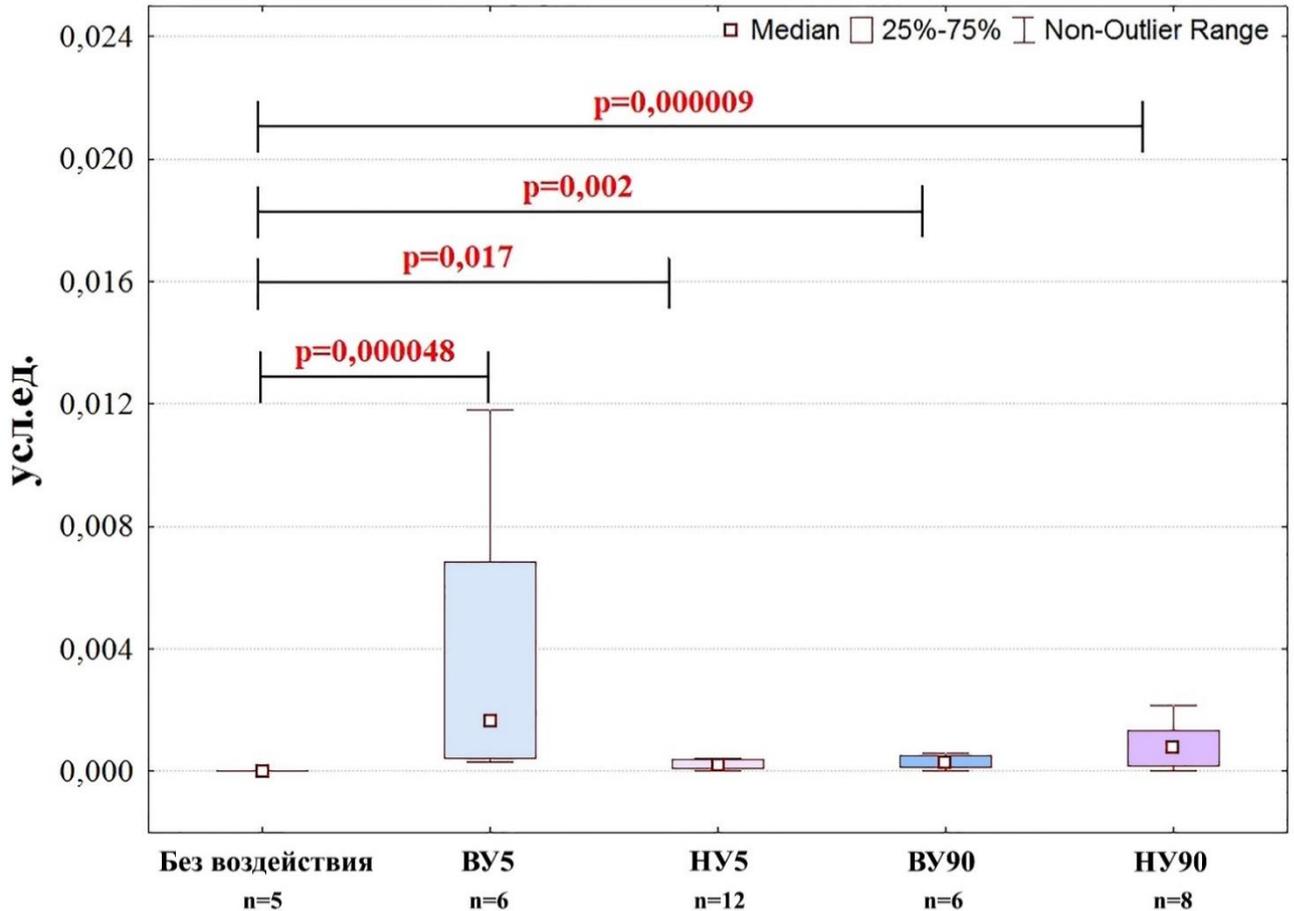


Рис. 19. Уровень экспрессии гена *Hif-1α* в печени крыс Вистар без воздействия, высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии через 5 (ВУ5, НУ5) и 90 (ВУ90, НУ90) мин после гипоксического воздействия, Ме (25%;75%). p – статистическая значимость различий между показателями в разные сроки после гипоксического воздействия, критерии Крускала-Уоллиса и Данна

По результатам иммуноферментного анализа, также, как и при определении уровня экспрессии гена *Hif-1α* в печени, выявлены различия в динамике содержания белка HIF-1α в сыворотке крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс через 5 и 90 мин после гипоксического воздействия (рис. 20, табл. 9, 11). Через 5 мин после гипоксического воздействия у высокоустойчивых животных содержание белка HIF-1α в сыворотке крови было выше в 2,3 раза по сравнению с низкоустойчивыми крысами, однако статистически значимых различий выявлено не было. Через 90 мин, по сравнению с 5 мин после гипоксического воздействия, у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии животных содержание белка HIF-1α в сыворотке крови уменьшалось.

Таблица 11

Достигнутая значимость различий (p) показателей содержания белка HIF-1 α в сыворотке крови крыс Вистар без воздействия, высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии через 5 (ВУ5, НУ5) и 90 (ВУ90, НУ90) мин после гипоксического воздействия (критерии Крускала-Уоллиса и Данна)

	Без гипоксического воздействия	ВУ5	ВУ90		Без гипоксического воздействия	НУ5	НУ90
Без гипоксического воздействия	-	0,030	1,000	Без гипоксического воздействия	-	0,574	1,000
ВУ5	0,030	-	0,042	НУ5	0,574	-	0,024
ВУ90	1,000	0,042	-	НУ90	1,000	0,024	-

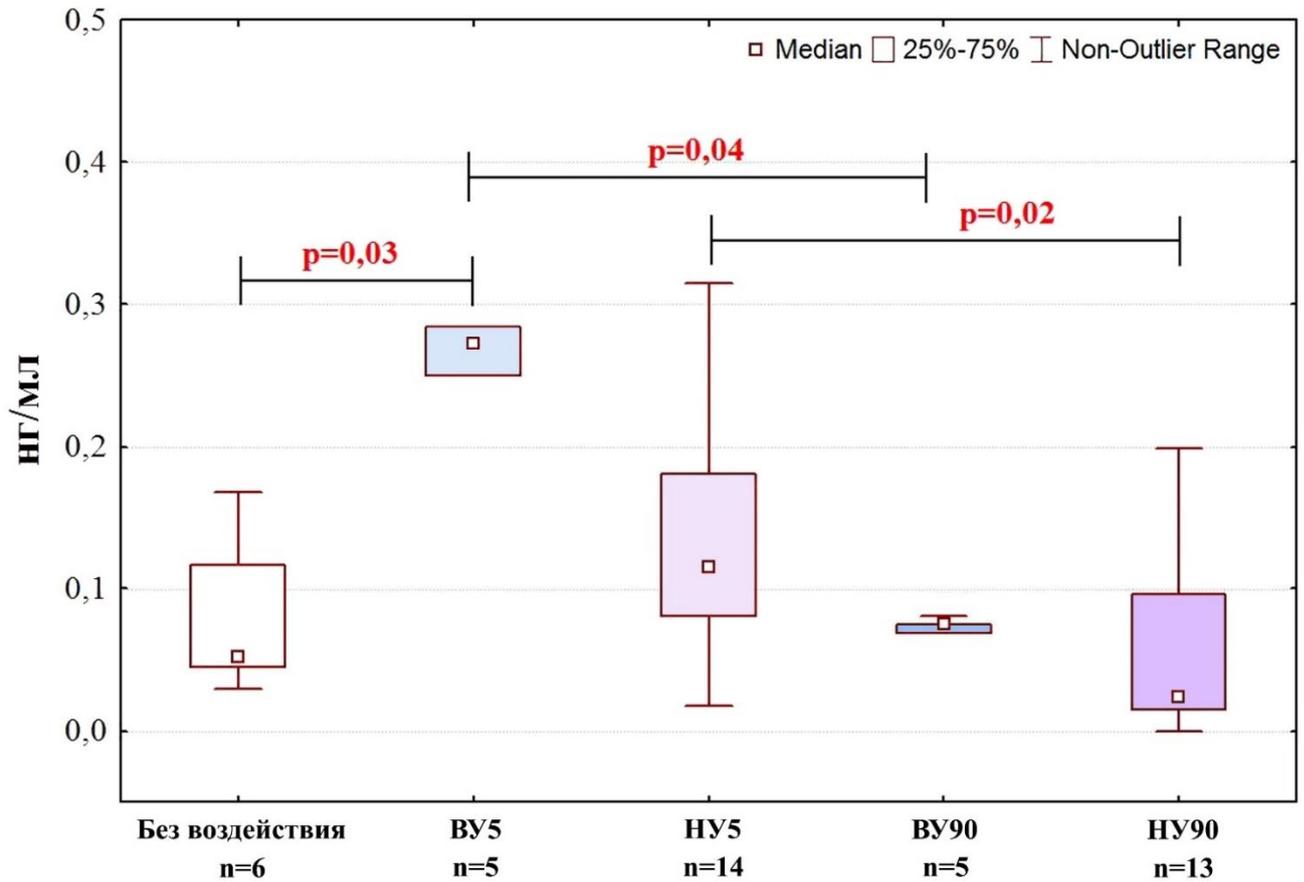


Рис. 20. Содержание белка HIF-1 α в сыворотке крови у крыс Вистар без воздействия, высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии через 5 (ВУ5, НУ5) и 90 (ВУ90, НУ90) мин после гипоксического воздействия, Ме (25%;75%). p – статистическая значимость различий между показателями в разные сроки после гипоксического воздействия, критерии Крускала-Уоллиса и Данна

Таким образом, как у высокоустойчивых, так и у низкоустойчивых к гипоксии животных уровень экспрессии мРНК *Hif-1 α* в печени повышался через 5 мин после гипоксического воздействия, однако у высокоустойчивых был выше, чем у низкоустойчивых. Содержание HIF-1 α в сыворотке крови через 90 мин снижалось по сравнению с 5 мин после гипоксического воздействия как у высокоустойчивых, так и у низкоустойчивых к недостатку кислорода крыс.

3.2.2 Уровень экспрессии гена *Vegf* в печени и содержание белка VEGF в сыворотке крови через 5 и 90 мин после гипоксического воздействия у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар

Методом ПЦР различий в уровне экспрессии гена *Vegf* в печени высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс выявлено не было (табл. 12, 13). Через 5 мин после гипоксического воздействия содержание в сыворотке крови ключевого фактора ангиогенеза VEGF статистически значимо возрастало как у высокоустойчивых, так и у низкоустойчивых животных. По сравнению с низкоустойчивыми у высокоустойчивых к гипоксии крыс через 5 мин после гипоксического воздействия содержание белка VEGF в сыворотке крови было статистически значимо выше (табл. 12, 14). Через 90 мин после гипоксического воздействия содержание белка VEGF в сыворотке крови возвращалось к исходному уровню и не различалось между высокоустойчивыми и низкоустойчивыми к гипоксии животными (рис. 21).

Таблица 12

Уровень экспрессии гена *Vegf* в печени и содержание белка VEGF в сыворотке крови крыс Вистар без воздействия, высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии через 5 и 90 мин после гипоксического воздействия, Ме (25%;75%). p – статистическая значимость различий между высокоустойчивыми и низкоустойчивыми к гипоксии крысами Вистар, критерий Манна-Уитни

Группа наблюдения	Без гипоксического воздействия (1)	После гипоксического воздействия					
		Через 5 мин			Через 90 мин		
		ВУ (2)	НУ (3)	p (2-3)	ВУ (4)	НУ (5)	p (4-5)
Экспрессия <i>Vegf</i> в печени, усл. ед., $\cdot 10^{-3}$	2,7 (2,1-3,3)	4,0 (2,1-4,5)	4,1 (2,1-5,2)	0,86	1,5 (1,2-4,4)	4,0 (3,2-6,0)	0,17
Содержание VEGF в сыворотке крови, пг/мл	5,1 (1,0-6,7)	47,1 (26,8-79,3)	14,2 (10,5-26,8)	0,04	6,2 (0,7-14,5)	2,5 (0,0-10,5)	0,69

Таблица 13

Достигнутая значимость различий (p) показателей экспрессии гена *Vegf* в печени крыс Вистар без воздействия, высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии через 5 (ВУ5, НУ5) и 90 (ВУ90, НУ90) мин после гипоксического воздействия (критерии Крускала-Уоллиса и Данна)

	Без гипоксического воздействия n=5	ВУ5 n=6	ВУ90 n=8		Без гипоксического воздействия n=5	НУ5 n=9	НУ90 n=6
Без гипоксического воздействия	-	0,921	1,000	Без гипоксического воздействия	-	0,316	0,361
ВУ5	0,921	-	0,303	НУ5	0,316	-	1,000
ВУ90	1,000	0,303	-	НУ90	0,361	1,000	-

Таблица 14

Достигнутая значимость различий (p) показателей содержания белка VEGF в сыворотке крови крыс Вистар без воздействия, высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии через 5 (ВУ5, НУ5) и 90 (ВУ90, НУ90) мин после гипоксического воздействия (критерии Крускала-Уоллиса и Данна)

	Без гипоксического воздействия	ВУ5	ВУ90		Без гипоксического воздействия	НУ5	НУ90
Без гипоксического воздействия	-	0,012	1,000	Без гипоксического воздействия	-	0,042	1,000
ВУ5	0,012	-	0,064	НУ5	0,042	-	0,013
ВУ90	1,000	0,064	-	НУ90	1,000	0,013	-

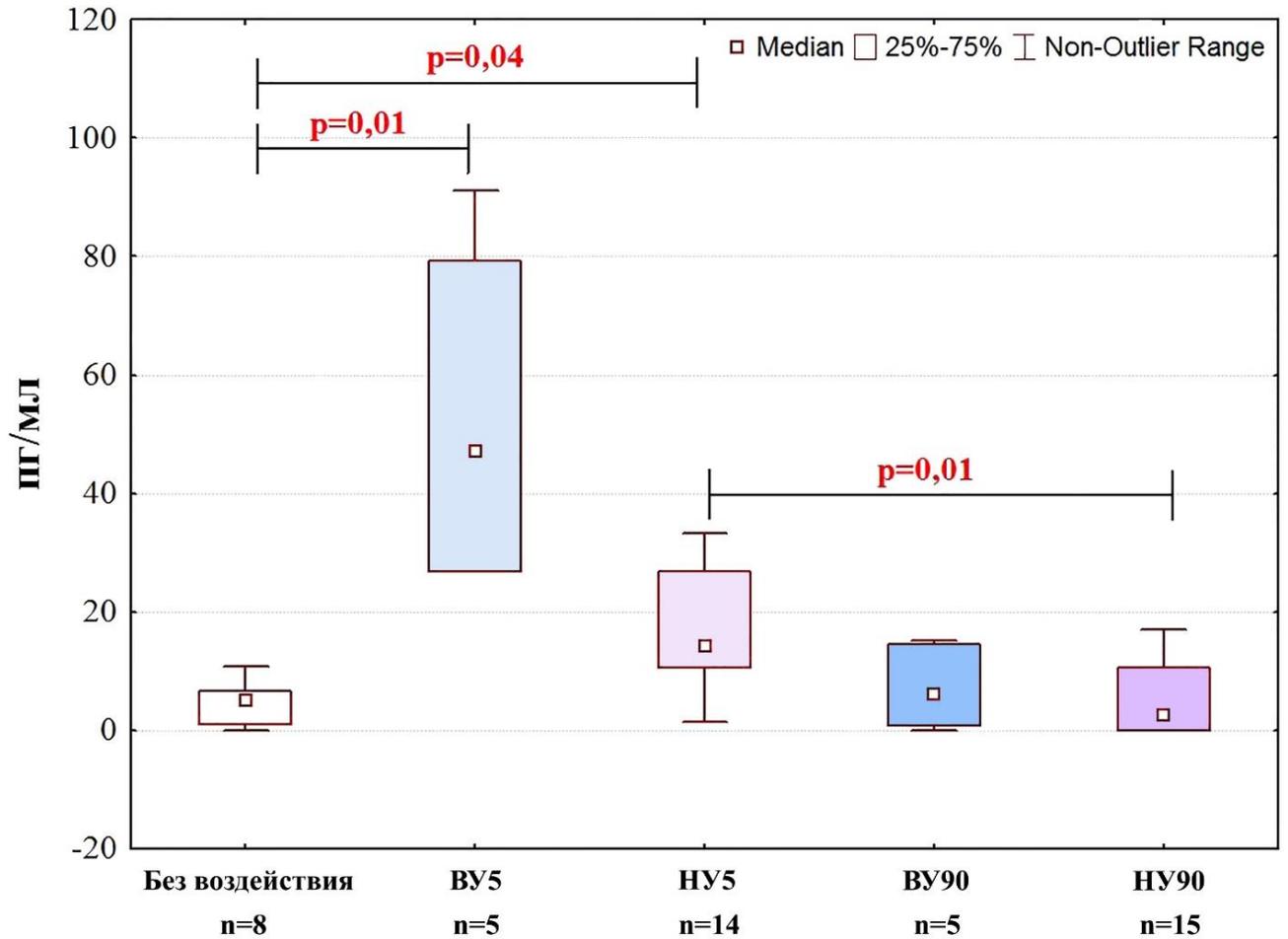


Рис. 21. Содержание белка VEGF в сыворотке крови крыс Вистар без воздействия, высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии через 5 (ВУ5, НУ5) и 90 (ВУ90, НУ90) мин после гипоксического воздействия, Me (25%;75%). p – статистическая значимость различий между показателями в разные сроки после гипоксического воздействия, критерии Крускала-Уоллиса и Данна

3.2.3 Содержание эритропоэтина в сыворотке крови через 5 и 90 мин после гипоксического воздействия у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар

Через 5 мин после гипоксического воздействия содержание эритропоэтина в сыворотке крови у высокоустойчивых крыс было статистически значимо выше, чем у низкоустойчивых (табл. 15, 16). Через 90 мин после гипоксического воздействия по сравнению с 5 мин статистически значимое повышение концентрации эритропоэтина наблюдалось только у низкоустойчивых к гипоксии животных (рис. 22).

Таблица 15

Содержание эритропоетина в сыворотке крови крыс Вистар без воздействия, высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии через 5 и 90 мин после гипоксического воздействия, Ме (25%;75%). р – статистическая значимость различий между высокоустойчивыми и низкоустойчивыми к гипоксии крысами Вистар, критерий Манна-Уитни

Группа наблюдения Параметр	Без гипоксического воздействия (1)	После гипоксического воздействия					
		Через 5 мин			Через 90 мин		
		ВУ (2)	НУ (3)	р (2-3)	ВУ (4)	НУ (5)	р (4-5)
Содержание эритропоетина в сыворотке крови, пг/мл	7,9 (7,1-14,8)	18,3 (12,6-25,2)	6,0 (4,9-13,1)	0,03	12,0 (11,2-21,6)	14,5 (13,1-19,7)	0,4

Таблица 16

Достигнутая значимость различий (р) показателей содержания эритропоетина в сыворотке крови крыс Вистар без воздействия, высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии через 5 (ВУ5, НУ5) и 90 (ВУ90, НУ90) мин после гипоксического воздействия (критерии Крускала-Уоллиса и Данна)

	Без гипоксического воздействия	ВУ5	ВУ90		Без гипоксического воздействия	НУ5	НУ90
Без гипоксического воздействия	-	0,135	0,441	Без гипоксического воздействия	-	1,000	0,326
ВУ5	0,135	-	1,000	НУ5	1,000	-	0,044
ВУ90	0,441	1,000	-	НУ90	0,326	0,044	-

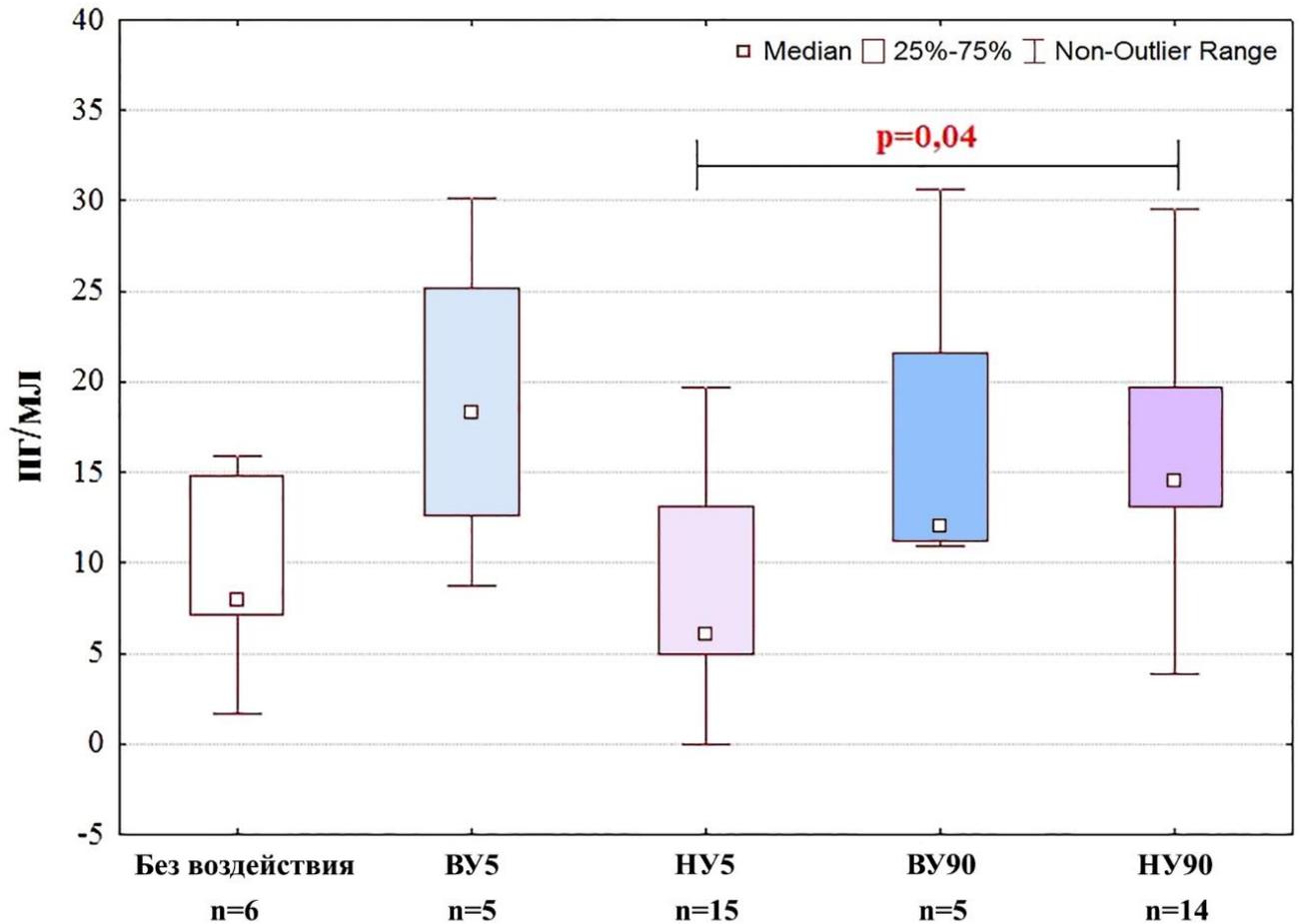


Рис. 22. Содержание эритропоэтина в сыворотке крови у крыс Вистар без воздействия, высокоустойчивых (БУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии через 5 (БУ5, НУ5) и 90 (БУ90, НУ90) мин после гипоксического воздействия, Ме (25%;75%). p – статистическая значимость различий между показателями в разные сроки после гипоксического воздействия, критерии Крускала-Уоллиса и Данна

3.2.4 Содержание 8-изопростана в сыворотке крови через 5 и 90 мин после гипоксического воздействия у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар

По данным иммуноферментного анализа, только у низкоустойчивых к недостатку кислорода крыс через 90 мин по сравнению с 5 мин после воздействия гипоксии, повышалась концентрация 8-изопростана в сыворотке крови (рис. 23, табл. 17, 18). У высокоустойчивых животных через 5 и 90 мин после гипоксического воздействия содержание 8-изопростана в сыворотке крови не изменялось (рис. 23, табл. 17, 18).

Таблица 17

Содержание 8-изопростана в сыворотке крови крыс Вистар без воздействия, высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии через 5 и 90 мин после гипоксического воздействия, Ме (25%;75%). р – статистическая значимость различий между высокоустойчивыми и низкоустойчивыми к гипоксии крысами Вистар, критерий Манна-Уитни

Группа наблюдения Параметр	Без гипоксического воздействия (1)	После гипоксического воздействия					
		Через 5 мин			Через 90 мин		
		ВУ (2)	НУ (3)	р (2-3)	ВУ (4)	НУ (5)	р (4-5)
Содержание 8-изопростана в сыворотке крови, пг/мл	448,3 (428,1-468,5)	477,2 (401,2-557,0)	454,0 (413,7-500,3)	0,57	533,9 (445,4-653,2)	556,0 (462,7-576,2)	0,55

Таблица 18

Достигнутая значимость различий (р) показателей содержания 8-изопростана в сыворотке крови крыс Вистар без воздействия, высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии через 5 (ВУ5, НУ5) и 90 (ВУ90, НУ90) мин после гипоксического воздействия (критерии Крускала-Уоллиса и Данна)

	Без гипоксического воздействия	ВУ5	ВУ90		Без гипоксического воздействия	НУ5	НУ90
Без гипоксического воздействия	-	1,000	0,509	Без гипоксического воздействия	-	1,000	0,044
ВУ5	1,000	-	1,000	НУ5	1,000	-	0,017
ВУ90	0,509	1,000	-	НУ90	0,044	0,017	-

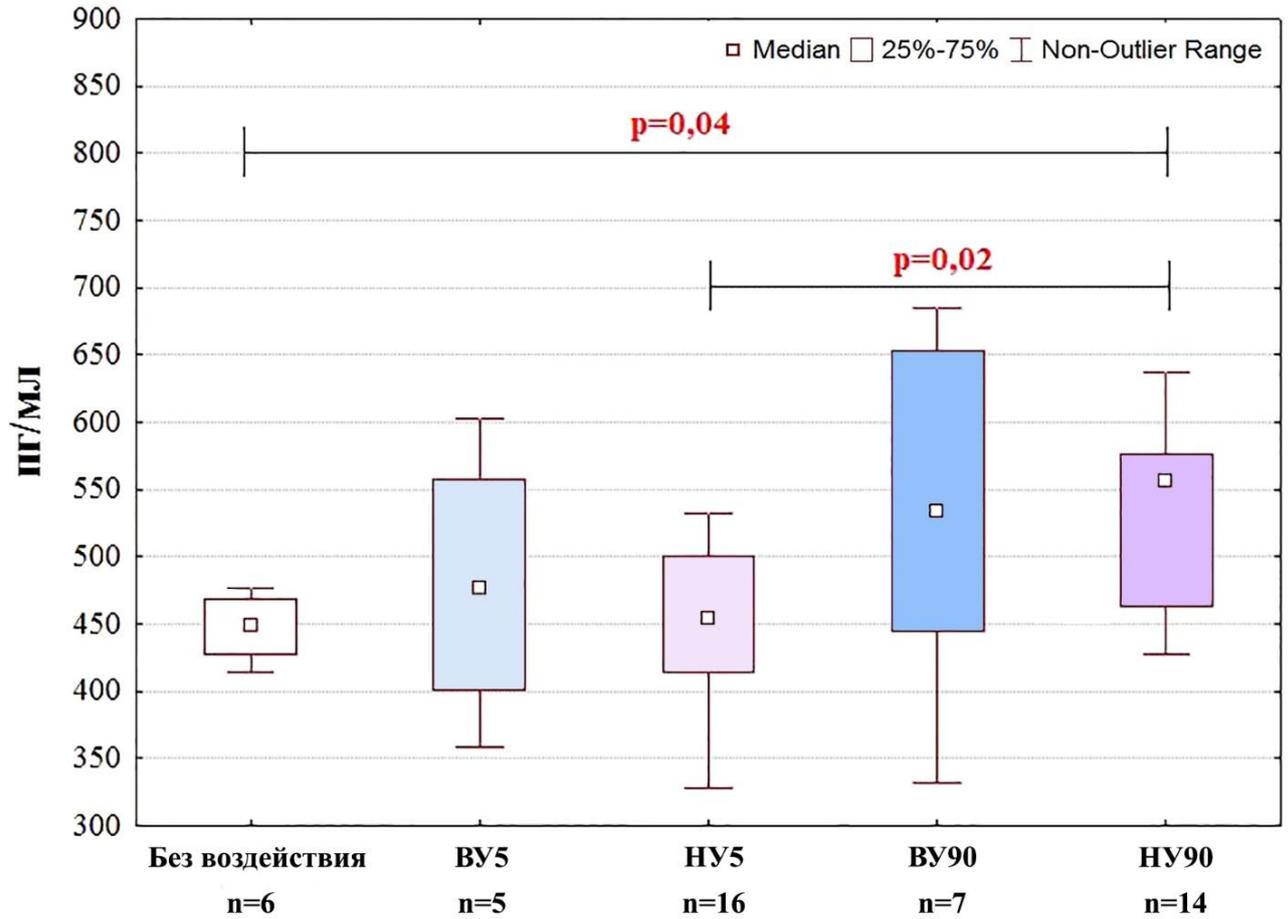


Рис. 23. Содержание 8-изопростана в сыворотке крови у крыс Вистар без воздействия, высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии через 5 (ВУ5, НУ5) и 90 (ВУ90, НУ90) мин после гипоксического воздействия, Ме (25%;75%). p – статистическая значимость различий между показателями в разные сроки после гипоксического воздействия, критерии Крускала-Уоллиса и Данна

3.2.5 Уровень экспрессии гена *Nf- κ b* в печени через 5 и 90 мин после гипоксического воздействия у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар

Уровень экспрессии мРНК фактора *Nf- κ b*, регулирующего воспалительный ответ, в печени повышался через 5 мин после гипоксической нагрузки как у высокоустойчивых, так и у низкоустойчивых к недостатку кислорода животных, но у высокоустойчивых более значительно (табл. 19, 20). Через 90 мин после гипоксического воздействия уровень экспрессии *Nf- κ b* возвращался к исходному уровню, однако у высокоустойчивых животных показатель был в 2,3 раза выше, чем у низкоустойчивых (рис. 24, табл. 19, 20).

Таблица 19

Уровень экспрессии гена *Nf-κb* в печени крыс Вистар без воздействия, высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии через 5 и 90 мин после гипоксического воздействия, Me (25%;75%). p – статистическая значимость различий между высокоустойчивыми и низкоустойчивыми к гипоксии крысами Вистар, критерий Манна-Уитни

Группа наблюдения	Без гипоксического воздействия (1)	После гипоксического воздействия					
		Через 5 мин			Через 90 мин		
		ВУ (2)	НУ (3)	p (2-3)	ВУ (4)	НУ (5)	p (4-5)
Параметр							
Экспрессия гена <i>Nf-κb</i> в печени, усл. ед., ·10 ⁻³	0,006 (0,002-0,113)	1,9 (0,5-7,0)	0,3 (0,07-0,6)	0,034	0,07 (0,03-0,12)	0,03 (0,02-0,06)	0,037

Таблица 20

Достигнутая значимость различий (p) показателей экспрессии гена *Nf-κb* в печени крыс Вистар без воздействия, высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии через 5 (ВУ5, НУ5) и 90 (ВУ90, НУ90) мин после гипоксического воздействия (критерии Крускала-Уоллиса и Данна)

	Без гипоксического воздействия	ВУ5	ВУ90		Без гипоксического воздействия	НУ5	НУ90
Без гипоксического воздействия	-	0,00003	0,475	Без гипоксического воздействия	-	0,0002	1,000
ВУ5	0,00003	-	0,003	НУ5	0,0002	-	0,0004
ВУ90	0,475	0,003	-	НУ90	1,000	0,0004	-

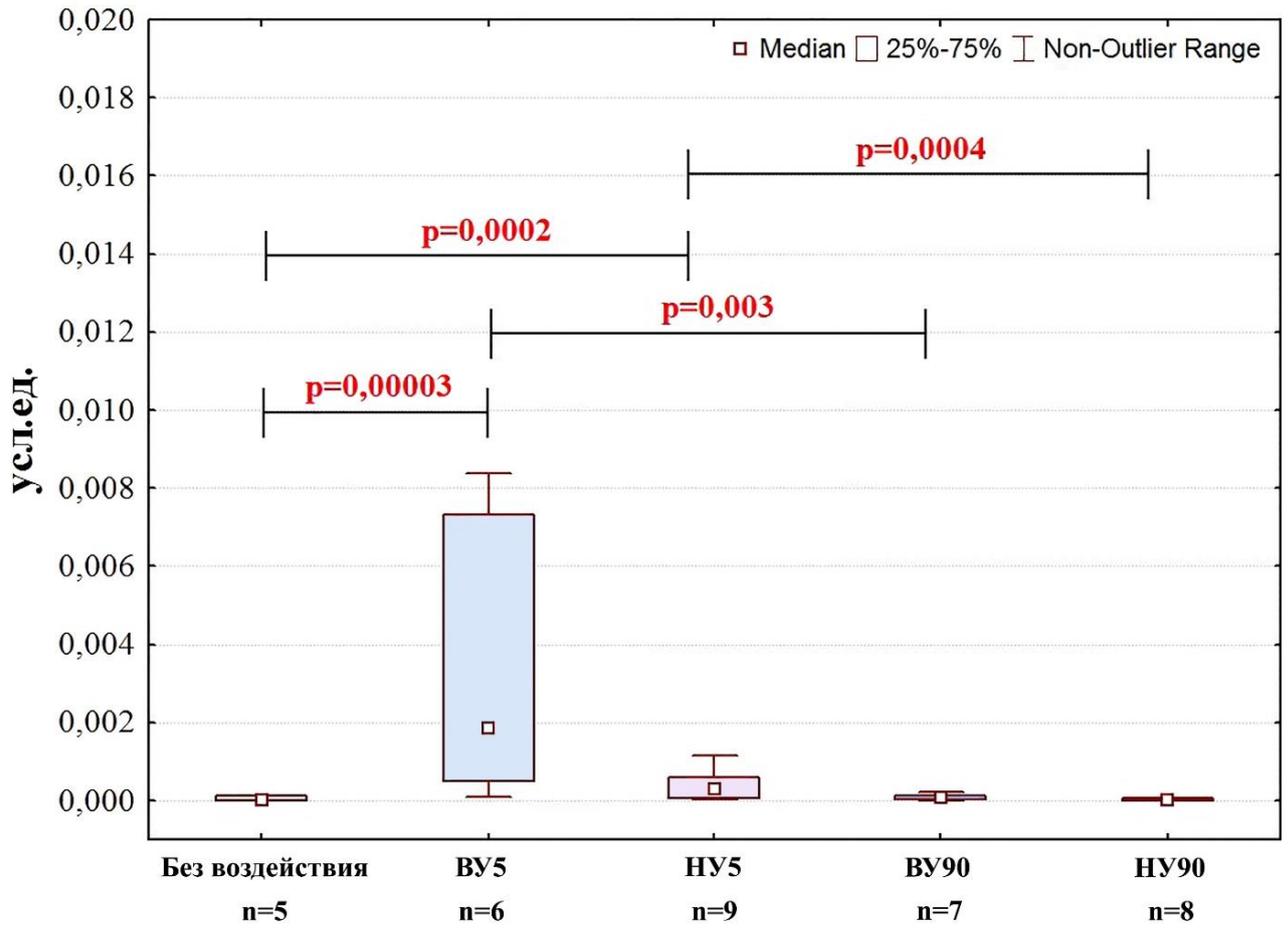


Рис. 24. Уровень экспрессии гена *Nf-κb* в печени у крыс Вистар без воздействия, высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии через 5 (ВУ5, НУ5) и 90 (ВУ90, НУ90) мин после гипоксического воздействия, Ме (25%;75%). p – статистическая значимость различий между показателями в разные сроки после гипоксического воздействия, критерии Крускала-Уоллиса и Данна

3.2.6 Содержание белка TGF- β в сыворотке крови через 5 и 90 мин после гипоксического воздействия у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар

Через 5 мин после гипоксического воздействия содержание фактора TGF- β , модулирующего воспаление, в сыворотке крови высокоустойчивых к гипоксии крыс было статистически значимо выше по сравнению с низкоустойчивыми (табл. 21, 22). Через 90 мин у высокоустойчивых к гипоксии животных содержание белка TGF- β в сыворотке крови снижалось, а у низкоустойчивых – повышалось (рис. 25). При этом у низкоустойчивых к гипоксии крыс концентрация белка TGF- β в сыворотке крови через 90 мин после острого гипоксического воздействия была статистически значимо выше, чем у высокоустойчивых животных (табл. 21, 22).

Таблица 21

Содержание белка TGF- β в сыворотке крови крыс Вистар без воздействия, высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии через 5 и 90 мин после гипоксического воздействия, Ме (25%;75%). p – статистическая значимость различий между высокоустойчивыми и низкоустойчивыми к гипоксии крысами Вистар, критерий Манна-Уитни

Группа наблюдения Параметр	Без гипоксического воздействия (1)	После гипоксического воздействия					
		Через 5 мин			Через 90 мин		
		ВУ (2)	НУ (3)	p (2-3)	ВУ (4)	НУ (5)	p (4-5)
Содержание TGF- β в сыворотке крови, пг/мл	8640 (7675-9768)	12627 (10380-12831)	9000 (8100-11196)	0,037	7740 (6840-7920)	11707,5 (9768-13035)	0,003

Таблица 22

Достигнутая значимость различий (p) показателей содержания белка TGF- β в сыворотке крови крыс Вистар без воздействия, высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии через 5 (ВУ5, НУ5) и 90 (ВУ90, НУ90) мин после гипоксического воздействия (критерии Крускала-Уоллиса и Данна)

	Без гипоксического воздействия	ВУ5	ВУ90		Без гипоксического воздействия	НУ5	НУ90
Без гипоксического воздействия	-	0,132	0,716	Без гипоксического воздействия	-	1,000	0,021
ВУ5	0,132	-	0,013	НУ5	1,000	-	0,017
ВУ90	0,716	0,013	-	НУ90	0,021	0,017	-

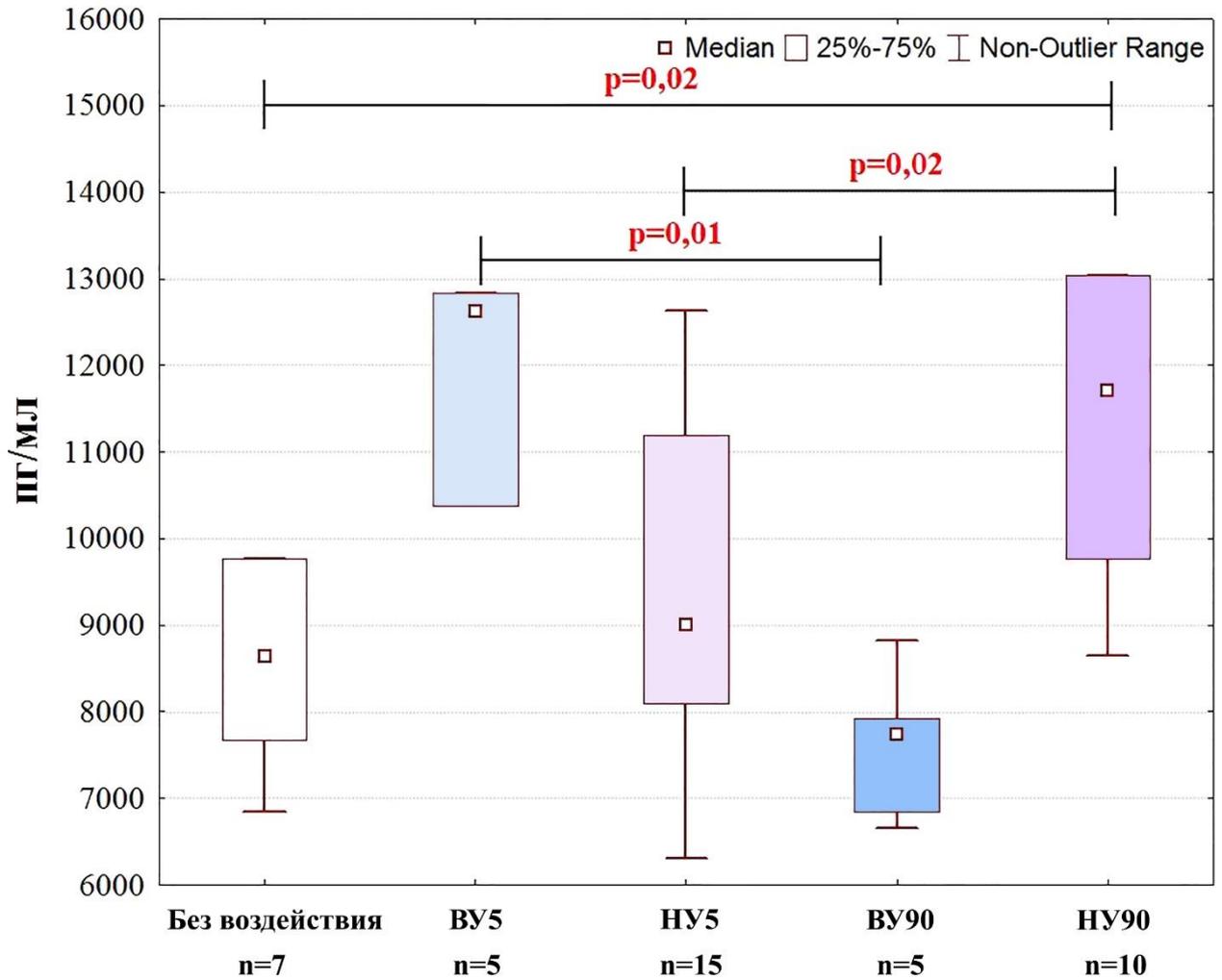


Рис. 25. Содержание белка TGF- β в сыворотке крови у крыс Вистар без воздействия, высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии через 5 (ВУ5, НУ5) и 90 (ВУ90, НУ90) мин после гипоксического воздействия, Me (25%;75%). p – статистическая значимость различий между показателями в разные сроки после гипоксического воздействия, критерии Крускала-Уоллиса и Данна

Таким образом, у самцов крыс Вистар с разной устойчивостью к гипоксии после острого гипоксического воздействия выявлены различия молекулярно-биологических и биохимических параметров – уровней экспрессии *Hif-1 α* и *Nf- κ b* в печени, содержания эритропоэтина, VEGF, TGF- β , 8-изопростана в сыворотке крови. Показано, что у высокоустойчивых к гипоксии крыс через 5 мин после гипоксической нагрузки уровни экспрессии *Hif-1 α* и *Nf- κ b* в печени, содержание эритропоэтина, VEGF и TGF- β в сыворотке крови выше, чем у низкоустойчивых животных. По сравнению с высокоустойчивыми низкоустойчивые к гипоксии животные через 5 мин после гипоксического воздействия характеризовались более низкими уровнями экспрессии *Hif-1 α* и *Nf- κ b* в печени, а через 90 мин у них наблюдалось увеличение концентрации 8-изопростана и TGF- β в сыворотке крови.

3.3 Сравнительная характеристика морфологических изменений и молекулярно-биологических показателей у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар через один месяц после определения устойчивости к недостатку кислорода

3.3.1 Морфологическая характеристика легких и печени у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс через один месяц после определения устойчивости к недостатку кислорода

При микроскопическом исследовании легких у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар через месяц после определения устойчивости к недостатку кислорода просветы бронхов были воздушными, в них выявлялись единичные десквамированные эпителиальные клетки. Слизистая оболочка бронхов выстлана кубическим реснитчатым эпителием, расположенным в 1-2 ряда. Просветы альвеол и альвеолярных ходов воздушные, межальвеолярные перегородки тонкие, при увеличении 1000 в них выявлялись единичные нейтрофилы (рис. 26). Патологических и воспалительных изменений в легких выявлено не было.

Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких на площади 25000 мкм² как у высокоустойчивых, так и у низкоустойчивых к гипоксии крыс через месяц после определения устойчивости к недостатку кислорода (табл. 23) соответствовало нормальным значениям – 1,43 (1,43-2,00) – для самцов крыс Вистар (Косырева А.М., 2018) и не отличалось у животных с разной устойчивостью к дефициту O₂.

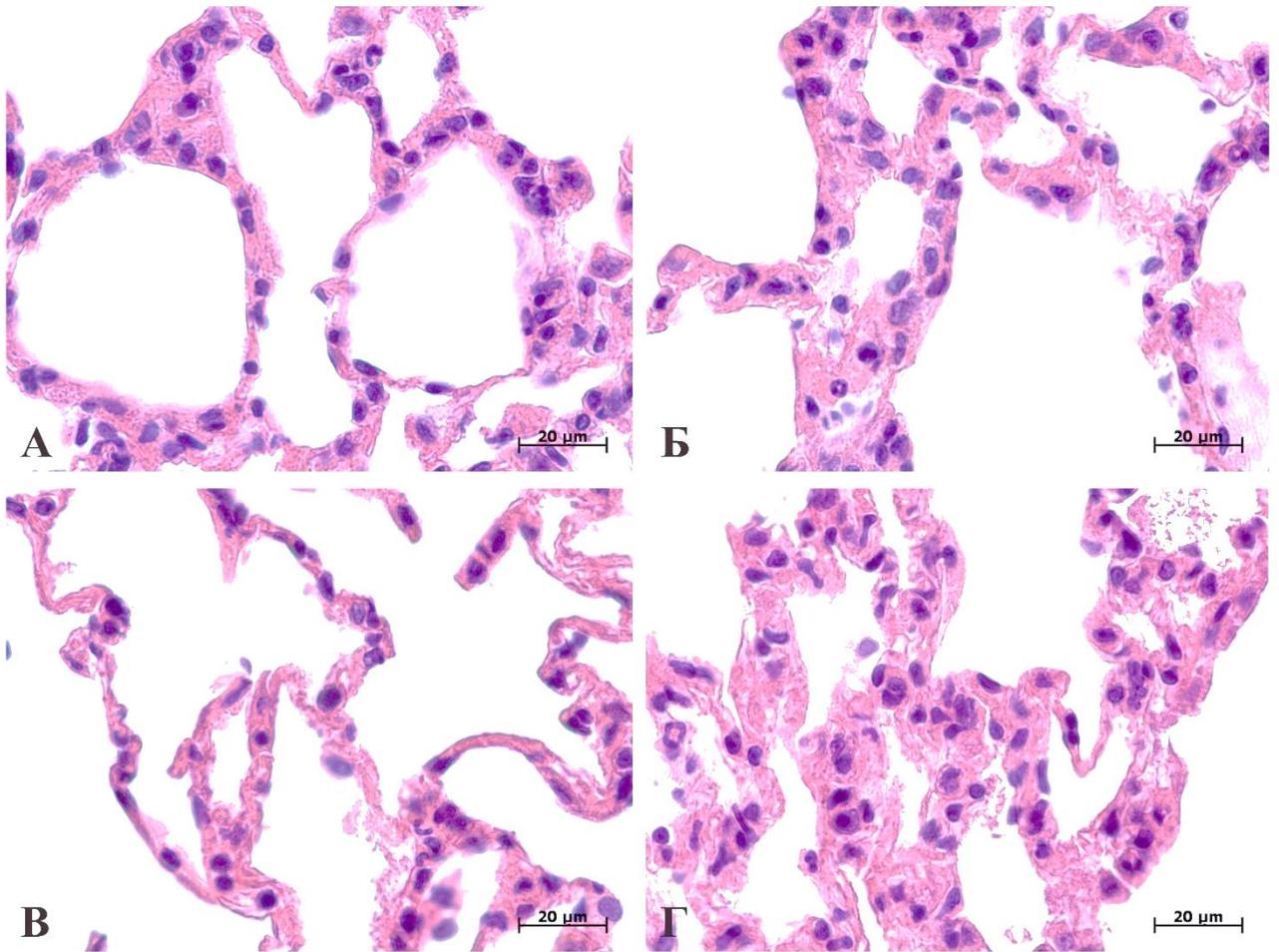


Рис. 26. Морфологическая характеристика легких у высокоустойчивых (А, В) и низкоустойчивых (Б, Г) к гипоксии крыс Вистар через месяц после определения устойчивости к недостатку кислорода. Определяется небольшое количество нейтрофилов в межальвеолярных перегородках. Окраска гематоксилином и эозином

При морфологическом исследовании печени у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар через месяц после определения устойчивости к недостатку кислорода балочное и дольковое строение было сохранено. По ходу балок выявлялись диффузно рассеянные неэпителиальные клеточные элементы, а в соединительной ткани по ходу триад определялись единичные лимфоциты и гистиоциты. Цитоплазма гепатоцитов с мелкой базофильной зернистостью, дистрофических изменений не обнаружено (рис. 27). Стенки центральных вен тонкие, выстилающий их эндотелий плоский. Патологических и воспалительных изменений в печени выявлено не было.

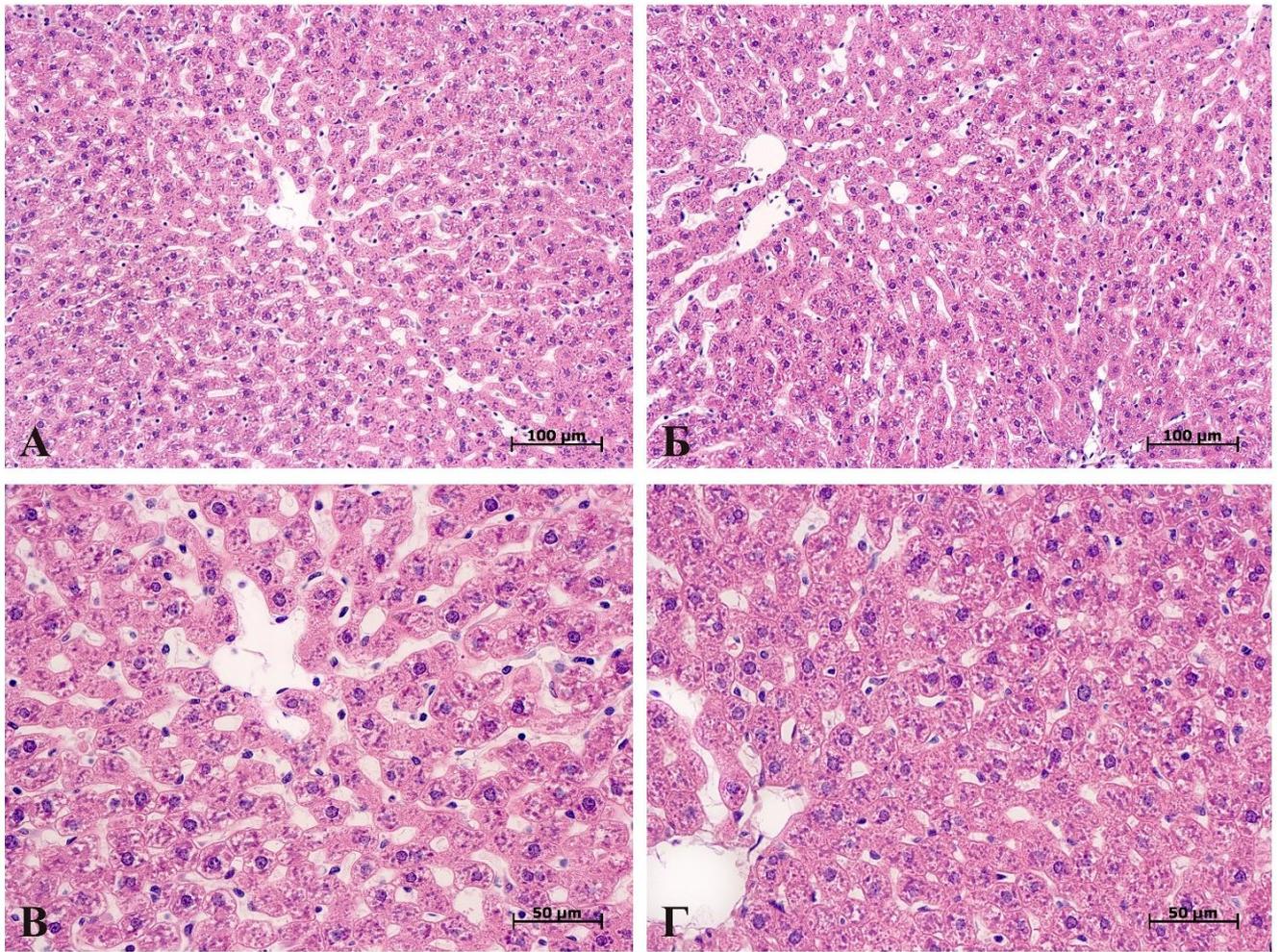


Рис. 27. Морфологическая характеристика печени у высокоустойчивых (А, В) и низкоустойчивых (Б, Г) к гипоксии крыс Вистар через месяц после определения устойчивости к недостатку кислорода. Цитоплазма гепатоцитов с мелкой базофильной зернистостью. Окраска гематоксилином и эозином

Относительное и абсолютное количество гранулоцитов в периферической крови как у высокоустойчивых, так и у низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар через месяц после определения устойчивости к недостатку кислорода (табл. 26) соответствовало нормальным значениям для самцов крыс – 13-30% и 1,4-3,3 млн/мл, соответственно (Линева А., 2003).

Таким образом, у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар через месяц после определения устойчивости к недостатку кислорода патологических изменений в легких и печени выявлено не было. Показатели числа гранулоцитов периферической крови соответствовали нормальным значениям.

3.3.2 Показатели воспалительных маркеров у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс через один месяц после определения устойчивости к недостатку кислорода

Через месяц после определения устойчивости к недостатку кислорода у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс определяли ряд воспалительных маркеров. По содержанию в сыворотке крови эндотоксина, С-реактивного белка, HIF-1 α , IL-1 β , TGF- β и кортикостерона статистически значимых различий между высокоустойчивыми и низкоустойчивыми к гипоксии крысами обнаружено не было. Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких также не отличалось у крыс с разной устойчивостью к гипоксии.

Уровни экспрессии генов *Hif-1 α* и *Vegf* в печени были статистически значимо выше у низкоустойчивых к гипоксии животных (табл. 24) по сравнению с высокоустойчивыми, в то время как уровень экспрессии гена *Nf- κ b* не различался.

Таким образом, различий в содержании воспалительных маркеров в сыворотке крови и в уровне экспрессии гена *Nf- κ b* в печени между высокоустойчивыми и низкоустойчивыми к гипоксии крысами через месяц после определения устойчивости к недостатку кислорода выявлено не было. Однако уровни экспрессии генов *Hif-1 α* и *Vegf* в печени были выше у низкоустойчивых к гипоксии крыс по сравнению с высокоустойчивыми.

Таблица 23

Показатели воспалительных маркеров у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс через один месяц после гипоксического воздействия, Ме (25%;75%). р – статистическая значимость различий между высокоустойчивыми и низкоустойчивыми к гипоксии крысами Вистар, критерий Манна-Уитни

Параметры \ Группа наблюдения	Высокоустойчивые (1)	Низкоустойчивые (2)	р (1-2)
Эндотоксин, МЕ/мл	0,4 (0,3-0,4)	0,5 (0,3-0,5)	0,53
С-реактивный белок, пг/мл	1833 (1645-2585)	1363 (1128-1551)	0,09
Содержание ИИФ-1 α в сыворотке крови, нг/мл	0,049 (0,042-0,085)	0,048 (0,039-0,059)	0,77
ИЛ-1 β в крови, пг/мл	1,7 (0,8-8,8)	3,0 (0,9-8,2)	0,77
TGF- β , пг/мл	58238,6 (48295,5-69602,3)	49715,9 (45454,5-52556,8)	0,29
Кортикостерон, нмоль/л	739,6 (384,6-767,2)	715,2 (701,6-764,0)	0,92
Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках/25000 мкм ²	2,3 (2,0-2,3)	1,9 (1,5-2,2)	0,46
АСТ, МЕ/л	147,6 (132,2-157,3)	152,4 (140,8-168,9)	0,67
АЛТ, МЕ/л	64,8 (55,6-74,5)	67,6 (64,3-72,4)	0,83

Таблица 24

Уровни экспрессии генов *Hif-1 α* , *Vegf* и *Nf- κ b* в печени у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс через один месяц после гипоксического воздействия, Ме (25%;75%). р – статистическая значимость различий между высокоустойчивыми и низкоустойчивыми к гипоксии крысами Вистар, критерий Манна-Уитни

Параметры \ Группа наблюдения	Высокоустойчивые (1)	Низкоустойчивые (2)	р (1-2)
Уровень экспрессии <i>Hif-1α</i> в печени, усл. ед. $\cdot 10^{-4}$	0,09 (0,02-0,2)	6,0 (1,0-9,0)	0,02
Уровень экспрессии <i>Vegf</i> в печени, усл. ед., $\cdot 10^{-3}$	3,6 (3,4-3,7)	4,1 (3,7-6,8)	0,036
Уровень экспрессии <i>Nf-κb</i> в печени, усл. ед., $\cdot 10^{-4}$	0,5 (0,1-1,0)	1,0 (0,01-2,0)	0,91

3.3.3 Морфофункциональная характеристика тимуса и селезенки и субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс через один месяц после определения устойчивости к недостатку кислорода

Через месяц после определения устойчивости к недостатку кислорода у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс определяли морфофункциональные различия иммунной системы.

При микроскопическом исследовании тимуса у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар через месяц после определения устойчивости к недостатку кислорода соотношение между корковым и мозговым веществом составляло примерно 1:1. Корковое вещество представлено равномерно распределенными лимфоидными и эпителиальными ретикулярными клетками. Границы между корковым и мозговым веществом четкие (рис. 28).

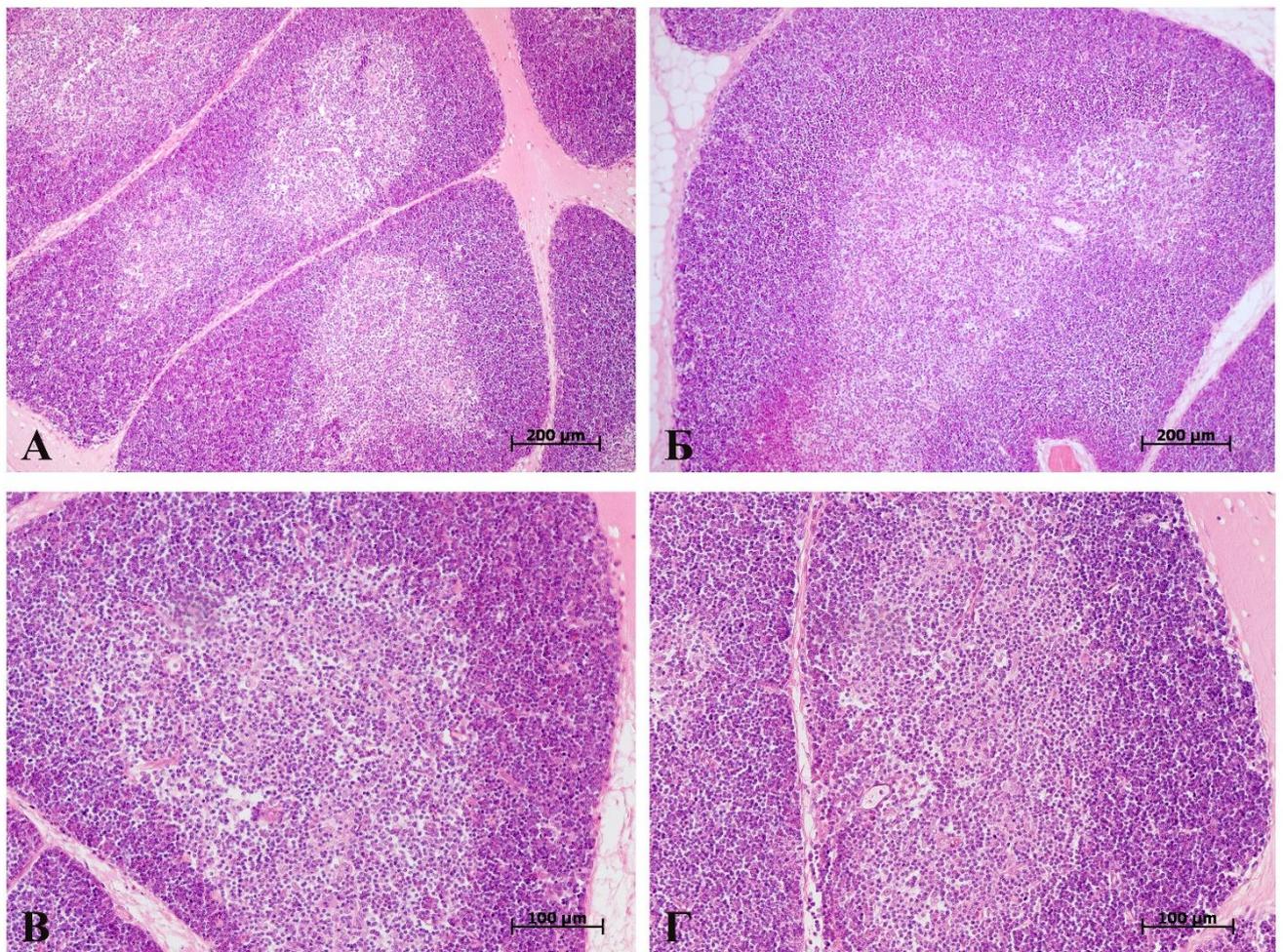


Рис. 28. Морфологическая характеристика тимуса у высокоустойчивых (А, В) и низкоустойчивых (Б, Г) к гипоксии крыс Вистар через месяц после определения устойчивости к недостатку кислорода. Границы между корковым и мозговым веществом четкие, соотношение между корковым и мозговым веществом примерно 1:1. Окраска гематоксилином и эозином

При морфометрическом исследовании в тимусе показатели объемной доли коркового и мозгового вещества, а также отношения коркового к мозговому веществу не отличались у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии животных (табл. 25). Относительное число апоптотически гибнущих CD3- и CD3+ клеток в тимусе не различалось у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс (табл. 25).

При микроскопическом исследовании селезенки у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар через месяц после определения устойчивости к недостатку кислорода белая пульпа была представлена ПАЛМ (периартериальные лимфоидные муфты)-зоной и лимфоидными узелками со светлыми центрами и хорошо выраженными маргинальными зонами (рис. 29). У низкоустойчивых к гипоксии крыс выявлялись более широкие маргинальные зоны лимфоидных узелков по сравнению с высокоустойчивыми животными (рис. 29, Б, Г). В светлых центрах среди лимфобластов выявлялись митотически делящиеся клетки. В красной пульпе селезенки обнаруживались равномерно распределенные зрелые клетки крови и макрофаги.

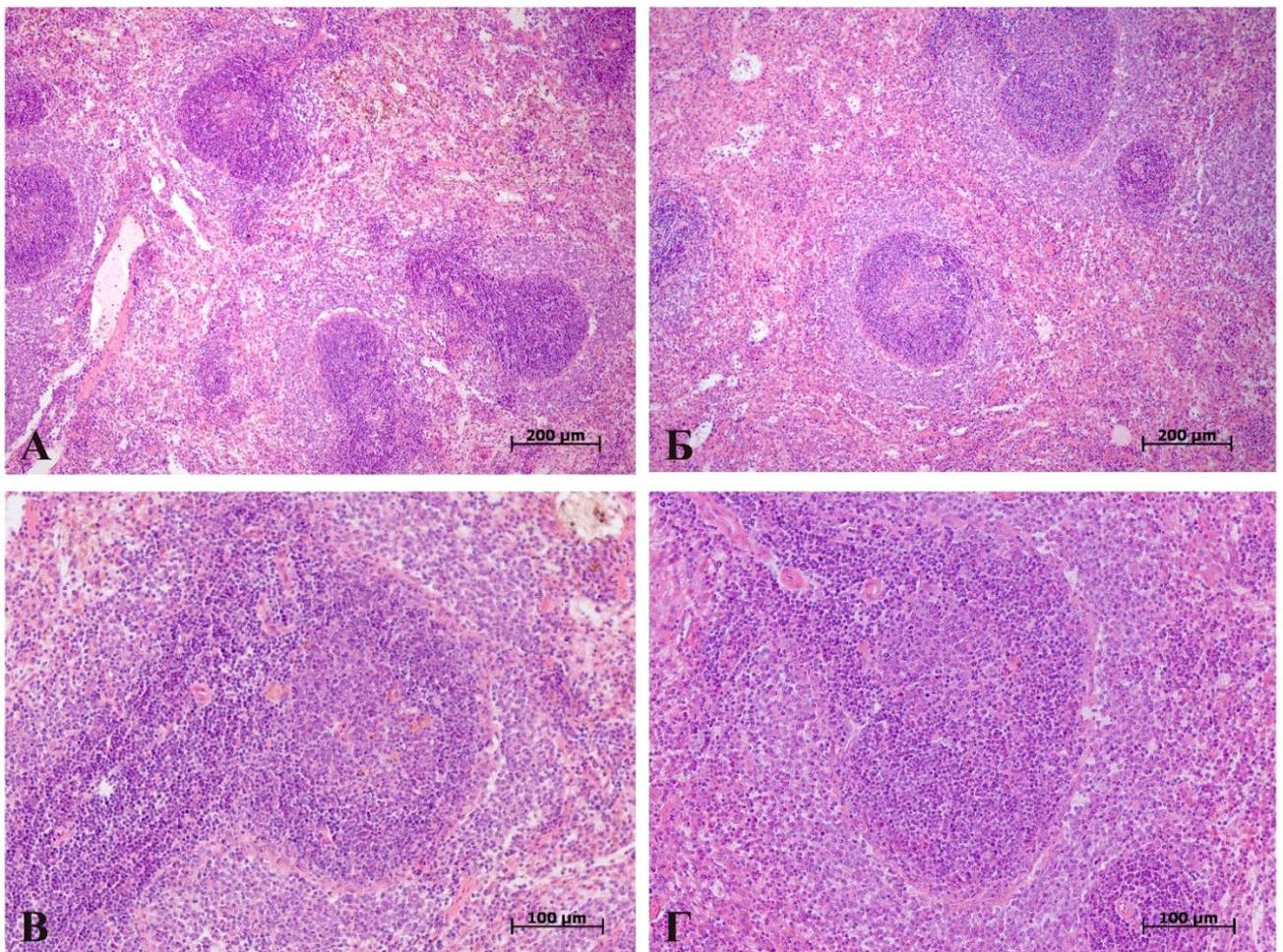


Рис. 29. Морфологическая характеристика селезенки у высокоустойчивых (А, В) и низкоустойчивых (Б, Г) к гипоксии крыс Вистар через месяц после определения устойчивости к недостатку кислорода. У низкоустойчивых к гипоксии крыс широкие маргинальные зоны лимфоидных узелков. Окраска гематоксилином и эозином

При морфометрическом исследовании в селезенке низкоустойчивых к гипоксии крыс показатель объемной доли маргинальных зон лимфоидных узелков был статистически значимо выше по сравнению с высокоустойчивыми животными (табл. 25). Объемная доля белой пульпы, ПАЛМ-зоны, лимфоидных узелков и их светлых центров, а также отношение белой пульпы селезенки к красной не различались между высокоустойчивыми и низкоустойчивыми к гипоксии крысами. Продукция клетками селезенки IL-10 также не различалась у животных с разной устойчивостью к гипоксии. Содержание неоптерина в сыворотке крови не различалось у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс (табл. 25).

Таблица 25

Морфофункциональная характеристика тимуса и селезенки и содержание неоптерина в сыворотке крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс через один месяц после гипоксического воздействия, Me (25%;75%). p – статистическая значимость различий между высокоустойчивыми и низкоустойчивыми к гипоксии крысами Вистар, критерий Манна-Уитни

Параметры \ Группа наблюдения	Высокоустойчивые (1)	Низкоустойчивые (2)	p (1-2)
Корковое вещество тимуса, %	59,7 (54,7-64,9)	58,9 (56,7-62,0)	0,81
Мозговое вещество тимуса, %	40,8 (35,0-46,0)	38,6 (37,2-41,5)	0,62
Отношение коркового вещества тимуса к мозговому	1,7 (1,2-2,1)	1,7 (1,7-2,0)	0,62
Все клетки тимуса (CD3-), %	11,3 (10,8-15,1)	12,7 (8,2-15,3)	1,00
CD3+-лимфоциты, %	7,0 (5,4-9,2)	9,0 (6,4-11,0)	0,32
Объемная доля белой пульпы селезенки, %	39,6 (36,1-45,4)	35,6 (35,6-36,6)	0,22
Отношение белой пульпы селезенки к красной	0,67 (0,58-0,87)	0,59 (0,56-0,59)	0,33
Объемная доля лимфоидных узелков в белой пульпе селезенки	37,9 (35,5-39,8)	36,7 (36,1-42,9)	0,81
Объемная доля ПАЛМ в белой пульпе селезенки	62,1 (60,2-64,5)	63,3 (57,1-63,9)	0,81
Объемная доля маргинальных зон лимфоидных узелков селезенки	55,3 (50,4-55,9)	59,6 (58,6-60,6)	0,01
Объемная доля светлых центров лимфоидных узелков селезенки	14,5 (13,5-15,7)	15,9 (13,5-16,6)	0,62
IL-10 в селезенке, пг/мл	44,2 (44,2-45,6)	32,6 (31,2-38,4)	0,07
Неоптерин, нмоль/л	1,91 (1,70-1,96)	2,15 (1,94-2,60)	0,12

Относительное количество Т-лимфоцитов, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, НК клеток и Т-регуляторных клеток в периферической крови высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс не различалось (табл. 26).

Абсолютное количество цитотоксических Т-лимфоцитов и НК клеток было статистически значимо выше у низкоустойчивых к гипоксии крыс по сравнению с высокоустойчивыми, а абсолютное число Т-лимфоцитов, Т-хелперов, В-лимфоцитов и Т-регуляторных клеток в периферической крови не различалось.

Различий по абсолютному и относительному количеству гранулоцитов в периферической крови у животных с разной устойчивостью к гипоксии выявлено не было (табл. 26). По сравнению с высокоустойчивыми фагоцитарный показатель клеток периферической крови был статистически значимо выше у низкоустойчивых к гипоксии крыс, а фагоцитарный индекс стимуляции не различался (табл. 26).

Уровень фагоцитарной активности, количество гранулоцитов, субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс через один месяц после гипоксического воздействия, Ме (25%;75%). р – статистическая значимость различий между высокоустойчивыми и низкоустойчивыми к гипоксии крысами Вистар, критерий Манна-Уитни

Параметры \ Группа наблюдения	Высокоустойчивые (1)	Низкоустойчивые (2)	р (1-2)
Т-лимфоциты, % от лимфоцитов	38,0 (28,4-45,9)	53,6 (44,2-54,1)	0,14
Т-лимфоциты, 10 ⁶ /мл	3,5 (2,7-4,3)	7,0 (4,8-7,7)	0,09
Т-хелперы (CD3+CD4+), % от Т-лимфоцитов	57,5 (49,0-66,3)	29,8 (23,2-34,4)	0,05
Т-хелперы (CD3+CD4+), 10 ⁶ /мл	2,2 (1,6-2,4)	1,8 (1,6-2,1)	0,80
Цитотоксические Т-лимфоциты (CD3+CD8a+), % от Т-лимфоцитов	40,8 (31,8-49,3)	69,5 (63,5-76,1)	0,05
Цитотоксические Т-лимфоциты (CD3+CD8a+), 10 ⁶ /мл	1,2 (1,0-1,8)	5,6 (3,0-5,9)	0,03
В-лимфоциты (CD45R+), % от лимфоцитов	25,3 (19,4-27,8)	17,1 (13,2-20,2)	0,09
В-лимфоциты (CD45R+), 10 ⁶ /мл	2,3 (1,8-2,6)	2,2 (1,9-2,9)	0,81
НК (CD314+), % от лимфоцитов	8,6 (8,3-12,7)	15,4 (15,4-22,1)	0,33
НК (CD314+), 10 ⁶ /мл	0,78 (0,78-1,2)	2,2 (1,7-2,5)	0,03
Регуляторные Т-лимфоциты (CD4+CD25+FOXP3+), % от Т-хелперов	2,1 (2,05-2,4)	1,8 (1,5-2,7)	0,62
Регуляторные Т-лимфоциты (CD4+CD25+FOXP3+), 10 ⁶ /мл	0,05 (0,03-0,06)	0,05 (0,02-0,05)	0,81
% гранулоцитов	15,3 (13,3-25,5)	21,1 (19,6-23,2)	0,28
Гранулоциты, млн/мл	3,3 (2,9-6,9)	4,1 (2,9-4,4)	0,67
Фагоцитарный показатель, %	64,5 (49,0-71,5)	80,0 (78,0-84,0)	0,03
Фагоцитарный индекс стимуляции, усл.ед.	0,8 (0,7-1,4)	1,4 (0,9-2,1)	0,20

Таким образом, через один месяц после определения устойчивости к недостатку кислорода у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс патологических изменений в легких и печени не выявлено. По сравнению с высокоустойчивыми у низкоустойчивых к гипоксии крыс через один месяц после гипоксического воздействия выше экспрессия генов *Hif-1 α* и *Vegf* в печени, а также объемная доля маргинальных зон лимфоидных узелков селезенки, абсолютное число цитотоксических Т-лимфоцитов, НК клеток и фагоцитарный показатель клеток периферической крови.

3.4 Молекулярно-биологическая, биохимическая и морфологическая характеристика системной воспалительной реакции у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар

В течение суток после введения ЛПС в группе высокоустойчивых к гипоксии крыс погибли 10% (2 из 20), низкоустойчивых – 17% (3 из 18). Показатели гибели животных в сравниваемых группах статистически значимо не различались ($p=0,88$). Животные погибали в первые 6 ч после введения ЛПС, что связано с развитием эндотоксинового шока: в органах-мишенях – легких и печени – выявлялось резко выраженное полнокровие сосудов, стазы, сладжи, отек.

3.4.1 Морфологическое и морфометрическое исследование легких у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС

Во все сроки после введения ЛПС в органе-мишени – легких, как у высокоустойчивых, так и у низкоустойчивых к гипоксии крыс наблюдалось выраженное неравномерное полнокровие сосудов.

Как у высокоустойчивых, так и у низкоустойчивых к гипоксии животных через 3 и 6 ч после введения ЛПС выявлялась значительная инфильтрация межальвеолярных перегородок легких нейтрофилами (рис. 30, 31). Через 6 ч после введения ЛПС по сравнению с высокоустойчивыми у низкоустойчивых к гипоксии крыс количество нейтрофилов в межальвеолярных перегородках было статистически значимо выше (табл. 27, 28).

Через 24 ч после введения ЛПС как у высокоустойчивых, так и у низкоустойчивых к гипоксии животных количество нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких не отличалось от контрольных значений (рис. 30, табл. 28).

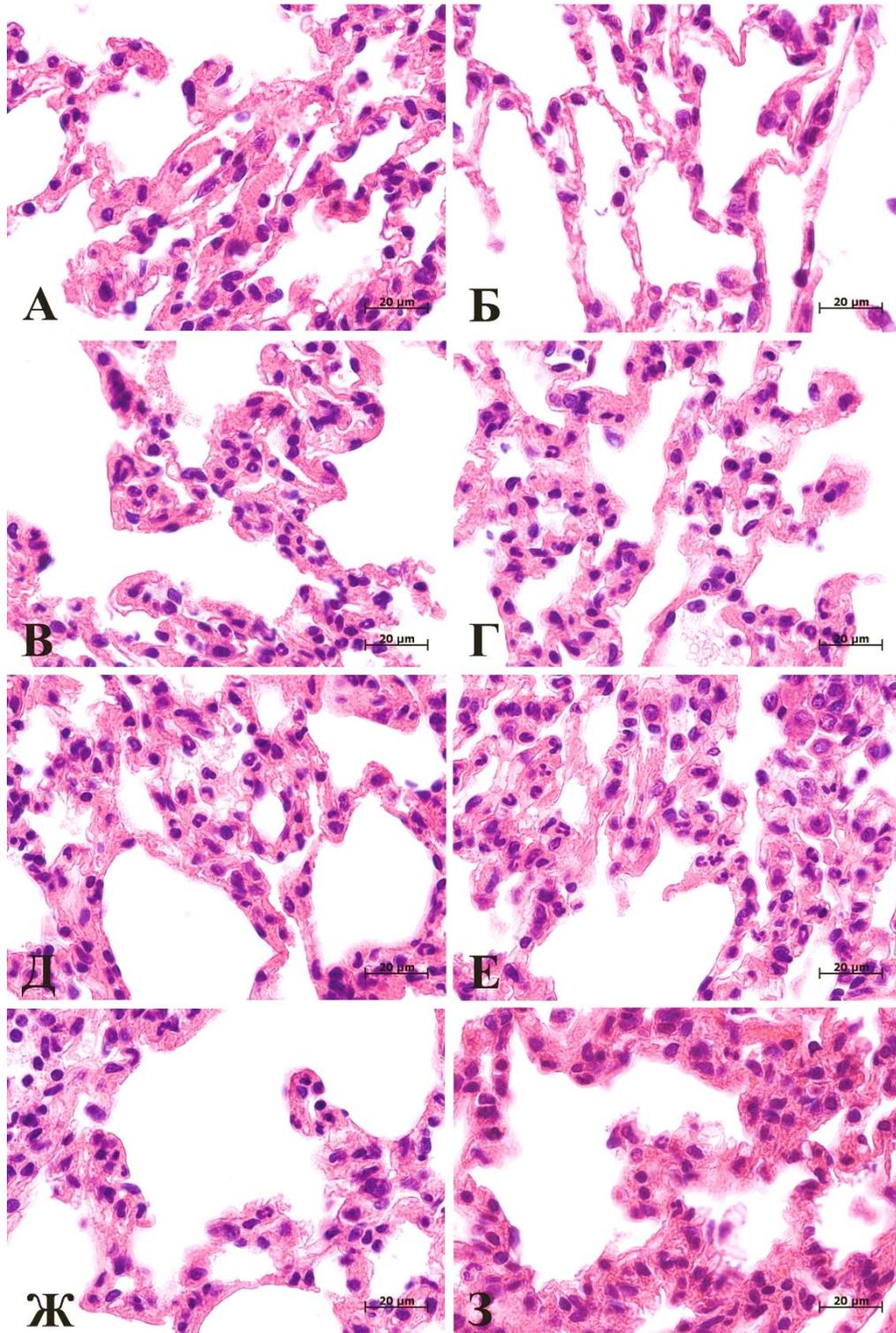


Рис. 30. Морфологические изменения в легких у высокоустойчивых (А, В, Д, Ж) и низкоустойчивых (Б, Г, Е, З) к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп (А, Б), через 3 (В, Г), 6 (Д, Е) и 24 (Ж, З) ч после введения ЛПС. Контрольная группа: А, Б – небольшое количество нейтрофилов в межальвеолярных перегородках; 3 ч после введения ЛПС: В, Г - диффузно рассеянные полиморфноядерные лейкоциты в межальвеолярных перегородках; 6 ч после введения ЛПС: Д – нейтрофильная инфильтрация межальвеолярных перегородок, Е – выраженная нейтрофильная инфильтрация межальвеолярных перегородок; 24 ч после введения ЛПС: Ж, З – небольшое количество нейтрофилов в межальвеолярных перегородках. Окраска гематоксилином и эозином

Таблица 27

Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС, Me (25%; 75%). p – статистическая значимость различий между высокоустойчивыми и низкоустойчивыми к гипоксии крысами Вистар, критерий Манна-Уитни

Группа наблюдения Параметр	Контрольные			Время после введения ЛПС в дозе 1,5 мг/кг								
				3 ч			6 ч			24 ч		
	(1)	(2)	p (1-2)	(3)	(4)	p (3-4)	(5)	(6)	p (5-6)	(7)	(8)	p (7-8)
	ВУ n=5	НУ n=5		ВУ n=5	НУ n=5		ВУ n=5	НУ n=5		ВУ n=8	НУ n=5	
Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках/ 25000 мкм ²	2,3 (2,0-2,3)	1,9 (1,5-2,2)	0,46	18,6 (16,9-24,4)	31,5 (28,0-38,6)	0,05	19,2 (16,8-21,9)	30,1 (25,2-32,5)	0,04	10,3 (8,0-11,0)	11,1 (10,0-11,7)	0,31

Таблица 28

Достигнутая значимость различий (p) показателей числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС (критерии Крускала-Уоллиса и Данна)

	Высокоустойчивые				Низкоустойчивые			
	Контроль	3 ч ЛПС	6 ч ЛПС	24 ч ЛПС	Контроль	3 ч ЛПС	6 ч ЛПС	24 ч ЛПС
Контроль	-	0,005	0,005	0,586	-	0,002	0,017	0,960
3 ч ЛПС	0,005	-	1,000	0,163	0,002	-	1,000	0,196
6 ч ЛПС	0,005	1,000	-	0,163	0,017	1,000	-	0,587
24 ч ЛПС	0,586	0,163	0,163	-	0,960	0,196	0,587	-

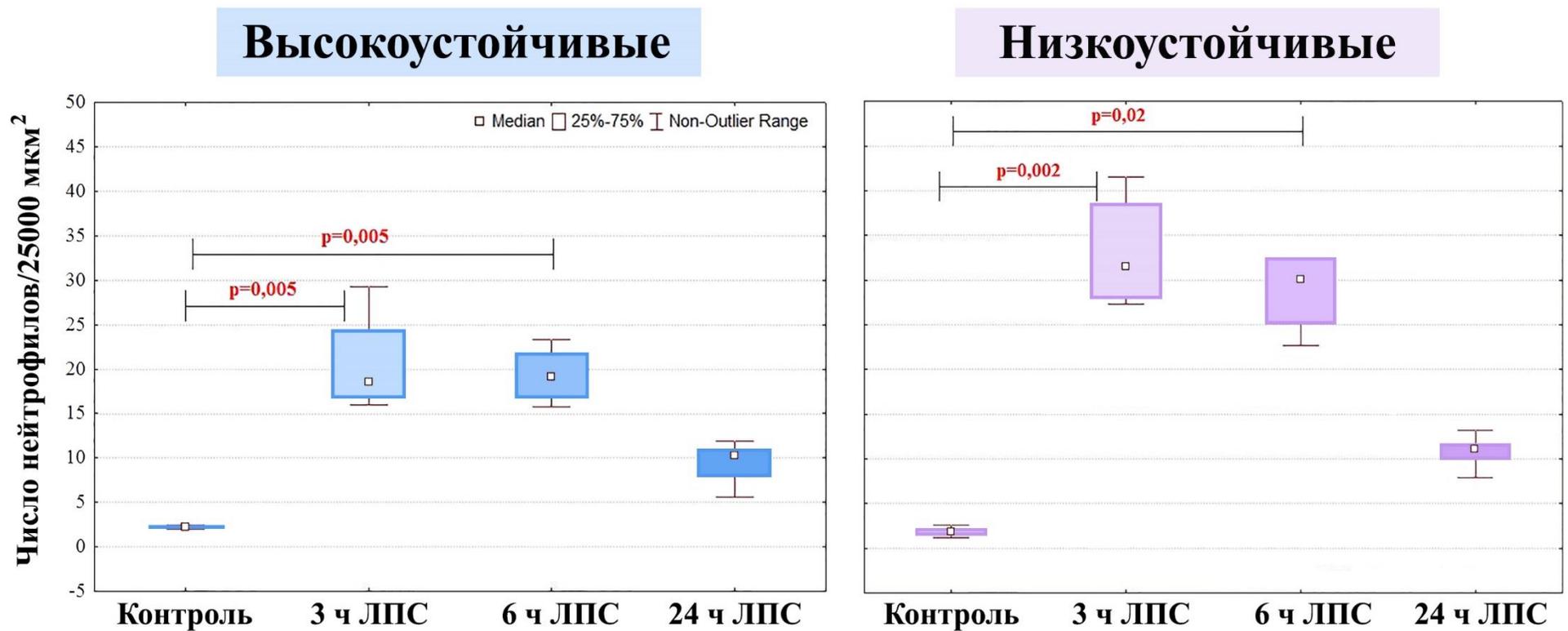


Рис. 31. Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и в разные сроки (3, 6 и 24 ч) после введения ЛПС, Ме (25%;75%). p – статистическая значимость различий, критерии Крускала-Уоллиса и Данна

3.4.2 Морфологические изменения печени у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар контрольных групп и через 24 ч после введения ЛПС

По данным литературы, морфологические изменения печени выявляются через сутки после введения ЛПС (Kosyreva A.M. et al., 2018). В соответствии с этим, мы проводили морфологическое и морфометрическое исследование печени у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар через 24 ч после введения ЛПС.

Через сутки после введения ЛПС у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс в печени выявлялись альтеративные изменения гепатоцитов – выраженная и распространенная вакуольная дистрофия, очаговые и субтотальные ландшафтообразные некрозы. По ходу балок наблюдалось увеличение числа неэпителиальных клеточных элементов, среди которых выявлялись нейтрофилы. По ходу триад слабо выраженная лимфоидная и гистиоцитарная инфильтрация. Выражено неравномерное полнокровие синусоидных капилляров и мелких вен, стазы и сладжи (рис. 32).

В группе высокоустойчивых к гипоксии крыс у 2 из 8 животных выявлялись множественные очаговые некрозы, у 3 из 8 – единичные, у 3 животных наблюдалась мелкокапельная дистрофия. В группе низкоустойчивых к гипоксии животных у 3 из 5 крыс обнаруживались субтотальные ландшафтообразные некрозы, у 1 из 5 – множественные очаговые некрозы, у 1 из 5 – единичные некрозы. По сравнению с высокоустойчивыми у низкоустойчивых к гипоксии крыс площадь некрозов в печени через 24 ч после введения ЛПС была статистически значимо выше (рис. 33).

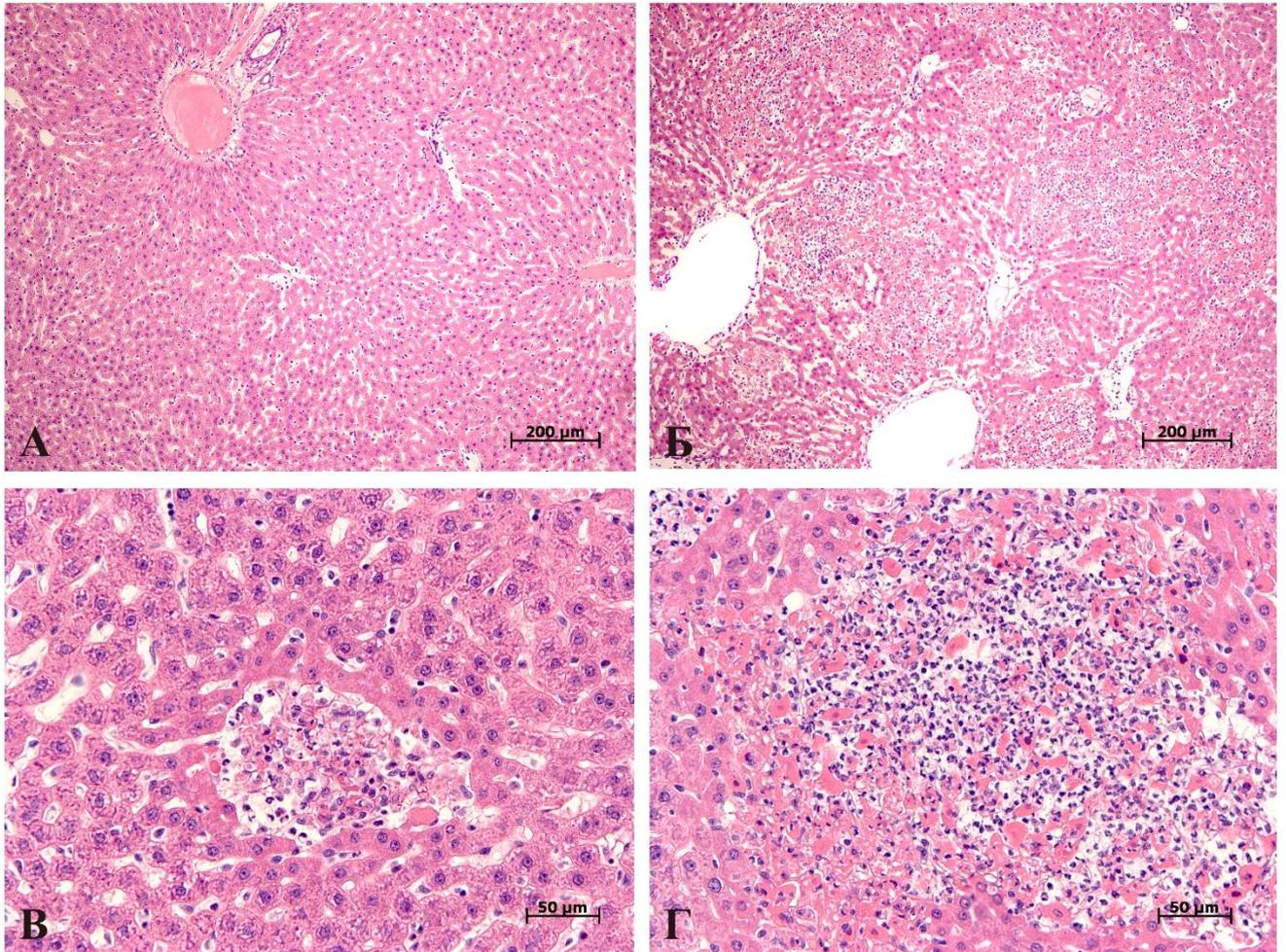


Рис. 32. Морфологические изменения в печени у высокоустойчивых (А, В) и низкоустойчивых (Б, Г) к гипоксии крыс через 24 ч после введения ЛПС. Высокоустойчивые (А, В) – очаговые некрозы, неравномерное полнокровие междольковых вен и артерий, синусоидных капилляров; низкоустойчивые (Б, Г) — обширные некрозы. Окраска гематоксилином и эозином

Площадь некрозов в печени у высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии крыс (n=10) через 24 ч после введения ЛПС, Me (25-75%). p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Параметр	Группа наблюдения	Через 24 ч после введения ЛПС в дозе 1,5 мг/кг
Площадь некрозов в печени, мкм ²	ВУ (n=5)	3911,6 (3572,3-17506,5)
	НУ (n=5)	71317,2 (30750,5-127131,6)
	p	0,028

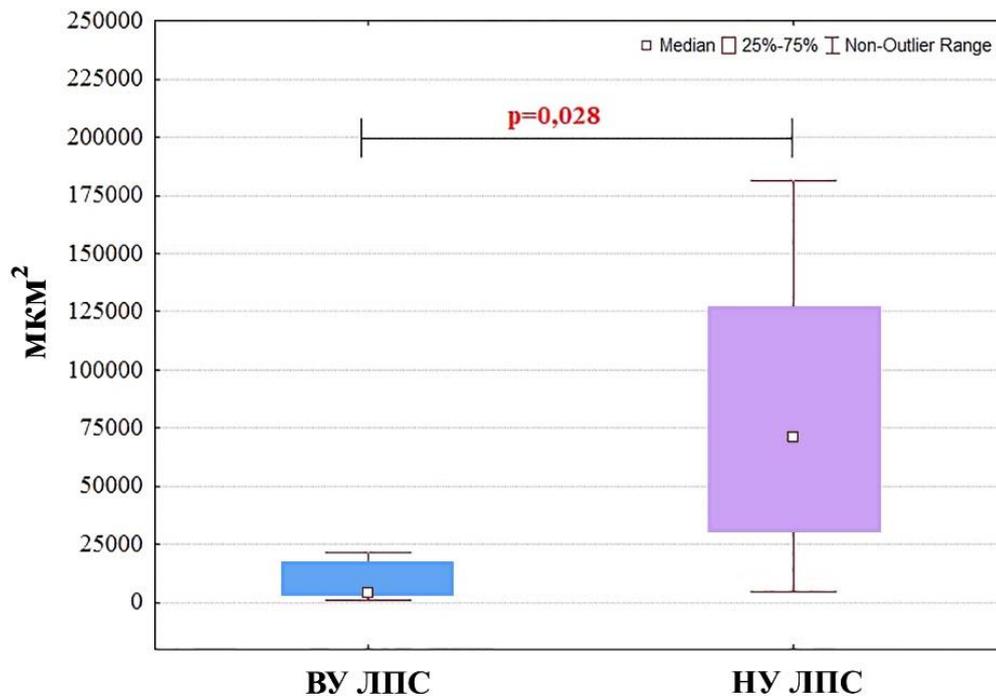


Рис. 33. Площадь некрозов на стандартной площади среза (50000 мкм²) печени у высокоустойчивых (ВУ) (n=5) и низкоустойчивых (НУ) (n=5) к гипоксии крыс Вистар через 24 ч после введения ЛПС, Me (25-75%). p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

3.4.3 Активность ферментов АСТ и АЛТ в сыворотке крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар контрольных групп и через 24 ч после введения ЛПС

По данным биохимического анализа, через сутки после введения ЛПС в сыворотке крови как у высокоустойчивых, так и у низкоустойчивых к гипоксии крыс уровни активности ферментов печени – аспартатаминотрансферазы (АСТ) и аланинаминотрансферазы (АЛТ), повышался по сравнению с контрольными группами (табл. 30). Между высокоустойчивыми и низкоустойчивыми к гипоксии животными контрольных и опытных групп статистически значимых различий выявлено не было, однако у низкоустойчивых к гипоксии крыс по сравнению с высокоустойчивыми после введения ЛПС уровни активности АСТ и АЛТ были, соответственно, в 5,6 и 5,2 раза выше.

Таблица 30

Динамика уровней активности АСТ и АЛТ в сыворотке крови у высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии крыс Вистар (n=23) через 24 ч после введения ЛПС (Ме; 25-75%). р – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Параметры	Группа наблюдения	Контрольные (1)	Через 24 ч после введения ЛПС в дозе 1,5 мг/кг (2)	р (1-2)
АСТ, МЕ/л	ВУ	147,6 (132,2-157,3)	895,5 (378,7-1290,9)	0,03
	НУ	152,4 (140,8-168,9)	5048,3 (1599,5-6691,0)	0,02
	Р (ВУ-НУ)	0,67	0,35	
АЛТ, МЕ/л	ВУ	64,8 (55,6-74,5)	790,4 (246,2-1046,9)	0,01
	НУ	67,6 (64,3-72,4)	4132,0 (1490,8-4420,4)	0,006
	Р (ВУ-НУ)	0,83	0,25	

3.4.4 Уровень эндотоксина в сыворотке крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС

Через 3 ч после введения ЛПС уровень эндотоксина в сыворотке крови повышался по сравнению с контрольной группой только у низкоустойчивых к гипоксии крыс (табл. 31, 32).

Через 6 ч после введения ЛПС у низкоустойчивых к гипоксии животных по сравнению с контрольной группой показатель нормализовался, а у высокоустойчивых крыс был повышен (рис. 34).

Через 24 ч после введения ЛПС показатели уровня эндотоксина в сыворотке крови не отличались от значений контрольных групп как у высокоустойчивых, так и у низкоустойчивых к гипоксии крыс.

Таблица 31

Уровень эндотоксина в сыворотке крови у высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС, Me (25%;75%). p – статистическая значимость различий между высокоустойчивыми и низкоустойчивыми к гипоксии крысами Вистар, критерий Манна-Уитни

Группа наблюдения Параметр	Контрольные			Время после введения ЛПС в дозе 1,5 мг/кг								
				3 ч			6 ч			24 ч		
	(1)	(2)	p (1-2)	(3)	(4)	p (3-4)	(5)	(6)	p (5-6)	(7)	(8)	p (7-8)
	ВУ n=5	НУ n=5		ВУ n=5	НУ n=5		ВУ n=5	НУ n=5		ВУ n=8	НУ n=5	
Эндотоксин, МЕ/мл	0,4 (0,3-0,4)	0,5 (0,3-0,5)	0,53	0,9 (0,6-8,6)	32,0 (16,8-50,0)	0,03	3,3 (2,5-4,5)	2,6 (2,3-2,7)	0,22	0,60 (0,35-1,15)	0,84 (0,6-1,3)	0,38

Таблица 32

Достигнутая значимость различий (p) показателей уровня эндотоксина в сыворотке крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС (критерии Крускала-Уоллиса и Данна)

	Высокоустойчивые				Низкоустойчивые			
	Контроль	3 ч ЛПС	6 ч ЛПС	24 ч ЛПС	Контроль	3 ч ЛПС	6 ч ЛПС	24 ч ЛПС
Контроль	-	0,254	0,009	1,000	-	0,002	0,653	1,000
3 ч ЛПС	0,254	-	1,000	1,000	0,002	-	0,288	0,084
6 ч ЛПС	0,009	1,000	-	0,102	0,653	0,288	-	1,000
24 ч ЛПС	1,000	1,000	0,102	-	1,000	0,084	1,000	-

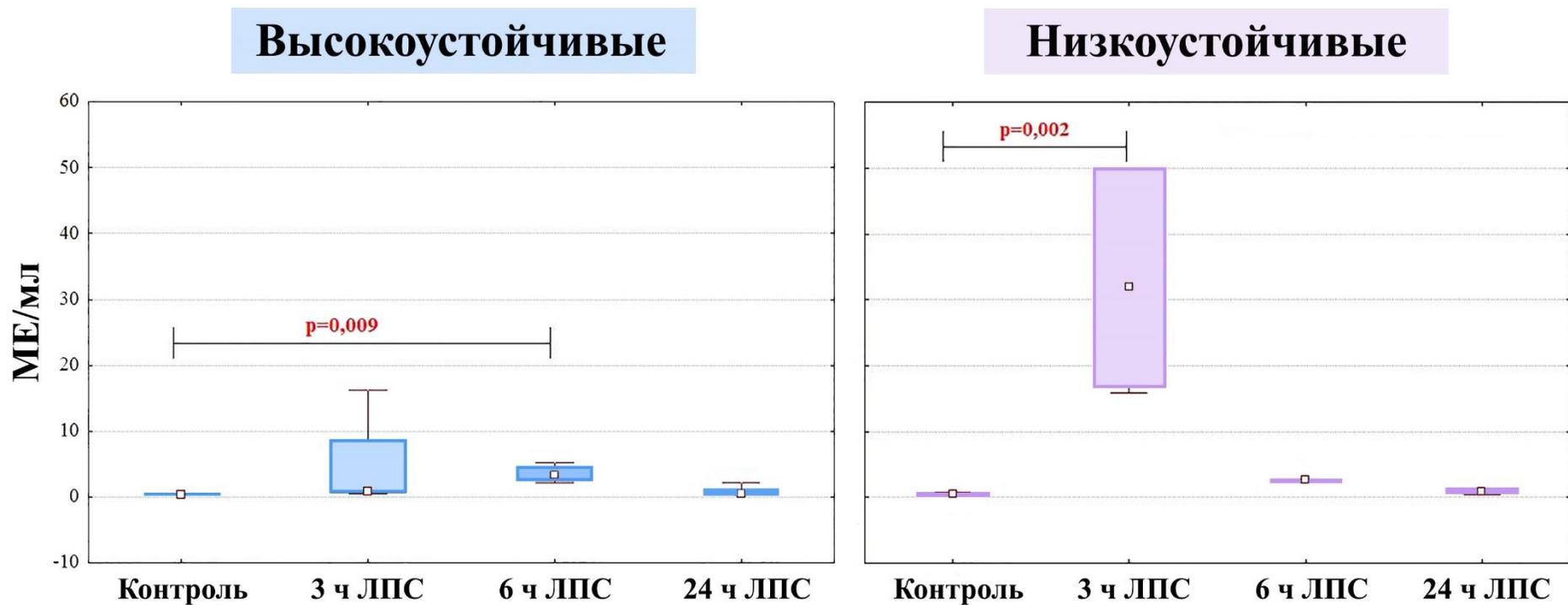


Рис. 34. Уровень эндотоксина в сыворотке крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс контрольных групп и в разные сроки (3, 6 и 24 ч) после введения ЛПС, Me (25%;75%). p – статистическая значимость различий, критерии Крускала-Уоллиса и Данна

3.4.5 Содержание С-реактивного белка в сыворотке крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар контрольных групп и через 24 ч после введения ЛПС

По данным литературы, введение ЛПС и повышение продукции провоспалительных цитокинов приводит к значительному увеличению содержания маркера воспаления – С-реактивного белка через 10-12 ч после инъекции, при этом пик его концентрации наблюдается через 24-48 ч (Ng P.C. et al., 1997; Makhoul I.R. et al., 2006; Hofer N. et al., 2012; Slaats J. et al., 2016). Поэтому мы исследовали содержание С-реактивного белка в сыворотке крови через 24 ч после введения ЛПС.

По данным ИФА, через 24 ч после введения ЛПС содержание С-реактивного белка в сыворотке крови по сравнению с контрольной группой повышалось только у низкоустойчивых к гипоксии крыс (рис. 35, табл. 33). Статистически значимых различий содержания С-реактивного белка между высокоустойчивыми и низкоустойчивыми к гипоксии крысами контрольных и опытных групп выявлено не было (табл. 33).

Содержание С-реактивного белка в сыворотке крови у высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии крыс (n=23) контрольных групп и через 24 ч после введения ЛПС, Me (25%;75%). p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Группа наблюдения	Контрольные			Через 24 ч после введения ЛПС в дозе 1,5 мг/кг			p	
	(1)	(2)	p (1-2)	(3)	(4)	p (3-4)	(1-3)	(2-4)
	ВУ n=5	НУ n=5		ВУ n=8	НУ n=5			
С-реактивный белок, мг/мл	1833 (1645-2585)	1363 (1128-1551)	0,09	2115 (1974-2397)	2421 (1810-2844)	0,81	0,60	0,04

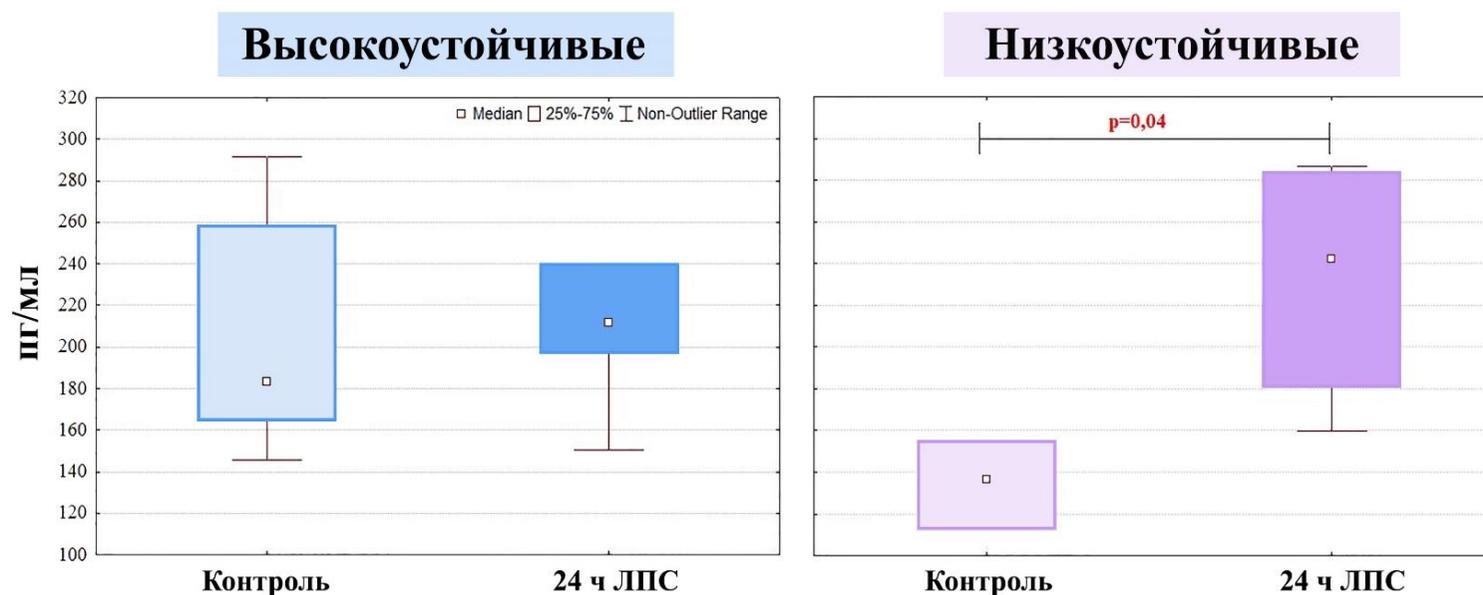


Рис. 35. Содержание С-реактивного белка в сыворотке крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс (n=23) контрольных групп и через 24 ч после введения ЛПС, Me (25%;75%). p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

3.4.6 Уровень экспрессии гена *Nf-κb* в печени у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС

Через 3 и 6 ч после введения ЛПС уровень экспрессии гена *Nf-κb* в печени повышался только у низкоустойчивых к гипоксии крыс, в то время как у высокоустойчивых увеличение не являлось статистически значимым (табл. 34, 35, рис. 36).

Через 6 ч после введения ЛПС уровень экспрессии гена *Nf-κb* в печени был статистически значимо выше у низкоустойчивых к гипоксии крыс по сравнению с высокоустойчивыми (табл. 34, 35).

Через 24 ч уровень экспрессии гена *Nf-κb* нормализовался, однако у низкоустойчивых к гипоксии крыс показатели были выше, чем у высокоустойчивых (табл. 34, 35).

Таблица 34

Уровень экспрессии гена *Nf-κb* в печени у высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС, Me (25%; 75%). p – статистическая значимость различий показателей у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар, критерий Манна-Уитни

Группа наблюдения Параметр	Контрольные			Время после введения ЛПС в дозе 1,5 мг/кг								
				3 ч			6 ч			24 ч		
	(1)	(2)	p (1-2)	(3)	(4)	p (3-4)	(5)	(6)	p (5-6)	(7)	(8)	p (7-8)
	ВУ n=5	НУ n=5		ВУ n=5	НУ n=5		ВУ n=5	НУ n=5		ВУ n=8	НУ n=5	
Уровень экспрессии <i>Nf-κb</i> в печени, усл. ед., $\cdot 10^{-4}$	0,5 (0,1-1,0)	1,0 (0,01-2,0)	0,91	1,0 (0,6-4,0)	3,0 (1,0-6,0)	0,19	2,0 (0,4-6,0)	6,0 (5,0-9,0)	0,02	0,2 (0,08-0,6)	2,0 (0,7-4,0)	0,004

Таблица 35

Достигнутая значимость различий (p) показателей уровня экспрессии гена *Nf-κb* в печени у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС (критерии Крускала-Уоллиса и Данна)

	Высокоустойчивые				Низкоустойчивые			
	Контроль	3 ч ЛПС	6 ч ЛПС	24 ч ЛПС	Контроль	3 ч ЛПС	6 ч ЛПС	24 ч ЛПС
Контроль	-	0,182	0,659	1,000	-	0,038	0,0001	1,000
3 ч ЛПС	0,182	-	1,000	0,009	0,038	-	0,420	1,000
6 ч ЛПС	0,659	1,000	-	0,084	0,0001	0,420	-	0,038
24 ч ЛПС	1,000	0,009	0,084	-	1,000	1,000	0,038	-

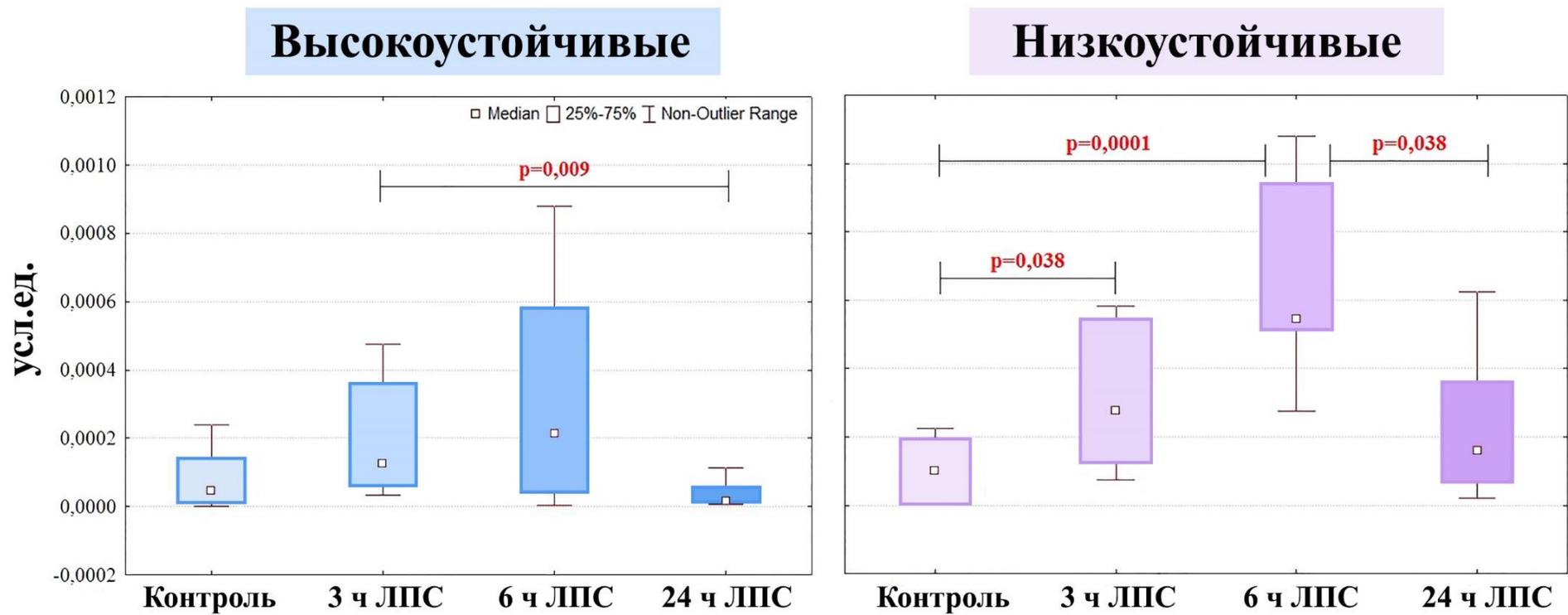


Рис. 36. Уровень экспрессии *Nf-kb* в печени у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и в разные сроки (3, 6 и 24 ч) после введения ЛПС, Ме (25%;75%). p – статистическая значимость различий, критерии Крускала-Уоллиса и Данна

3.4.7 Уровень экспрессии гена *Hif-1 α* в печени и содержание белка HIF-1 α в сыворотке крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС

Уровень экспрессии гена *Hif-1 α* в печени животных контрольных групп был статистически значимо выше у низкоустойчивых к гипоксии крыс (табл. 36, 37).

Через 6 ч после введения ЛПС экспрессия *Hif-1 α* повышалась как у высокоустойчивых, так и у низкоустойчивых к гипоксии животных (рис. 37), причем у низкоустойчивых была в 2,2 раза выше, чем у высокоустойчивых (табл. 36, 37).

Через 24 ч показатели нормализовались, однако у низкоустойчивых к гипоксии крыс оставались выше, чем у высокоустойчивых.

По содержанию белка HIF-1 α в сыворотке крови статистически значимых различий как между группами высокоустойчивых и низкоустойчивых животных, так и в разные сроки после введения ЛПС, выявлено не было (табл. 36, 37).

Таблица 36

Уровень экспрессии гена *Hif-1α* в печени и содержание белка HIF-1α в сыворотке крови у высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС, Me (25%; 75%). p – статистическая значимость различий между высокоустойчивыми и низкоустойчивыми к гипоксии крысами Вистар, критерий Манна-Уитни

Группа наблюдения Параметры	Контрольные			Время после введения ЛПС в дозе 1,5 мг/кг								
				3 ч			6 ч			24 ч		
	(1)	(2)	p (1-2)	(3)	(4)	p (3-4)	(5)	(6)	p (5-6)	(7)	(8)	p (7-8)
	ВУ n=5	НУ n=5		ВУ n=5	НУ n=5		ВУ n=5	НУ n=5		ВУ n=8	НУ n=5	
Уровень экспрессии гена <i>Hif-1α</i> в печени, усл. ед. · 10 ⁻⁴	0,09 (0,02-0,2)	6,0 (1,0-9,0)	0,02	3,0 (0,2-4,0)	1,0 (0,5-3,0)	0,57	9,0 (1,0-20,0)	20,0 (20,0-30,0)	0,02	0,2 (0,07-0,4)	2,0 (0,2-3,0)	0,02
Содержание белка HIF-1α в сыворотке крови, нг/мл	0,05 (0,04-0,09)	0,05 (0,04-0,06)	0,77	0,04 (0,03-0,08)	0,04 (0,03-0,07)	0,92	0,02 (0,01-0,04)	0,03 (0,02-0,04)	0,56	0,02 (0,01-0,06)	0,03 (0,03-0,04)	0,30

Таблица 37

Достигнутая значимость различий (p) показателей уровня экспрессии гена *Hif-1α* в печени у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС (критерии Крускала-Уоллиса и Данна)

Показатели	Высокоустойчивые				Низкоустойчивые				
	Контроль	3 ч ЛПС	6 ч ЛПС	24 ч ЛПС	Контроль	3 ч ЛПС	6 ч ЛПС	24 ч ЛПС	
Уровень экспрессии гена <i>Hif-1α</i> в печени	Контроль	-	0,528	0,020	1,000	-	0,715	0,035	0,855
	3 ч ЛПС	0,528	-	1,000	0,980	0,715	-	0,0005	1,000
	6 ч ЛПС	0,020	1,000	-	0,053	0,035	0,0005	-	0,0007
	24 ч ЛПС	1,000	0,980	0,053	-	0,855	1,000	0,0007	-
Содержание белка HIF-1α в сыворотке крови	Контроль	-	1,000	0,464	0,407	-	1,000	1,000	1,000
	3 ч ЛПС	1,000	-	1,000	1,000	1,000	-	1,000	1,000
	6 ч ЛПС	0,464	1,000	-	1,000	1,000	1,000	-	1,000
	24 ч ЛПС	0,407	1,000	1,000	-	1,000	1,000	1,000	-

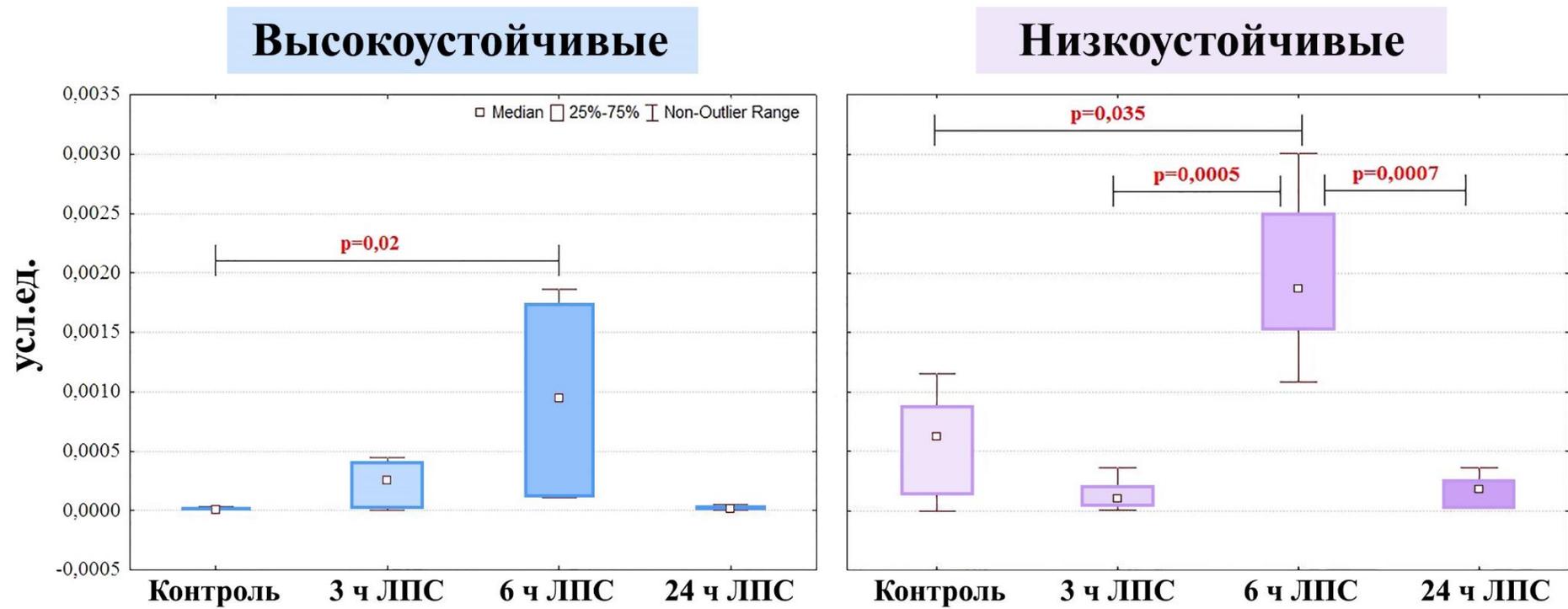


Рис. 37. Уровень экспрессии гена *Hif-1α* в печени у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и в разные сроки (3, 6 и 24 ч) после введения ЛПС, Me (25%;75%). p – статистическая значимость различий, критерии Крускала-Уоллиса и Данна

3.4.8 Уровень экспрессии гена *Vegf* в печени у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС

Уровень экспрессии гена *Vegf* в печени животных контрольных групп был статистически значимо выше у низкоустойчивых к гипоксии крыс (табл. 38, 39). В разные сроки после введения ЛПС статистически значимых различий показателя уровня экспрессии *Vegf* по сравнению с контрольной группой выявлено не было как у высокоустойчивых, так и у низкоустойчивых к недостатку кислорода животных. Через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС экспрессия гена *Vegf* в печени у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс не различалась.

Таблица 38

Уровень экспрессии гена *Vegf* в печени у высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС, Me (25%; 75%). p – статистическая значимость различий между высокоустойчивыми и низкоустойчивыми к гипоксии крысами Вистар, критерий Манна-Уитни

Группа наблюдения	Контрольные		Время после введения ЛПС в дозе 1,5 мг/кг									
			3 ч			6 ч			24 ч			
	(1)	(2)	p (1-2)	(3)	(4)	p (3-4)	(5)	(6)	p (5-6)	(7)	(8)	p (7-8)
	ВУ (n=5)	НУ (n=5)		ВУ (n=5)	НУ (n=5)		ВУ (n=5)	НУ (n=5)		ВУ (n=8)	НУ (n=5)	
Параметр												
Уровень экспрессии гена <i>Vegf</i> в печени, усл. ед., $\cdot 10^{-3}$	3,6 (3,4-3,7)	4,1 (3,7-6,8)	0,04	3,8 (2,2-5,6)	4,7 (3,7-5,6)	0,24	6,0 (4,2-7,3)	4,2 (4,0-4,9)	0,09	4,4 (3,4-8,4)	6,3 (4,5-8,4)	0,18

Таблица 39

Достигнутая значимость различий (p) показателей экспрессии гена *Vegf* в печени у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС (критерии Крускала-Уоллиса и Данна)

	Высокоустойчивые				Низкоустойчивые			
	Контроль	3 ч ЛПС	6 ч ЛПС	24 ч ЛПС	Контроль	3 ч ЛПС	6 ч ЛПС	24 ч ЛПС
Контроль	-	1,000	0,135	0,785	-	1,000	1,000	0,600
3 ч ЛПС	1,000	-	0,313	1,000	1,000	-	1,000	1,000
6 ч ЛПС	0,135	0,313	-	1,000	1,000	1,000	-	0,511
24 ч ЛПС	0,785	1,000	1,000	-	0,600	1,000	0,511	-

3.4.9 Содержание цитокинов IL-1 β , IL-10, TGF- β у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС

По результатам ИФА было показано, что через 3 ч после введения ЛПС происходило статистически значимое повышение содержания провоспалительного цитокина IL-1 β в сыворотке крови только у низкоустойчивых к гипоксии крыс, в то время как у высокоустойчивых различия не были достоверными (рис. 38).

Через 6 ч после введения ЛПС содержание IL-1 β в сыворотке крови у низкоустойчивых к гипоксии животных нормализовалось, однако через 24 ч его концентрация оставалась статистически значимо выше, чем у высокоустойчивых (табл. 40, 41).

Через 3 ч после введения ЛПС продукция клетками селезенки противовоспалительного цитокина IL-10 как у высокоустойчивых, так и у низкоустойчивых к гипоксии крыс не отличалась от контрольных значений.

Через 6 ч после введения ЛПС продукция IL-10 у высокоустойчивых к гипоксии крыс достоверно снижалась, а через 24 ч нормализовалась и была статистически значимо выше, чем у низкоустойчивых животных (рис. 39, табл. 42, 43).

По сравнению с контрольными группами через 3 и 6 ч после введения ЛПС содержание TGF- β в сыворотке крови как у высокоустойчивых, так и у низкоустойчивых к гипоксии животных статистически значимо не изменялось.

Через 24 ч после введения ЛПС происходило статистически значимое снижение концентрации TGF- β в сыворотке крови по сравнению с контрольной группой только у высокоустойчивых к гипоксии крыс (рис. 40). У низкоустойчивых к недостатку кислорода животных показатель не изменялся. Статистически значимых различий по содержанию TGF- β между высокоустойчивыми и низкоустойчивыми к гипоксии крысами контрольных и опытных групп выявлено не было (табл. 44, 45).

Таблица 40

Содержание IL-1 β в сыворотке крови у высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС, Me (25%; 75%). p – статистическая значимость различий между высокоустойчивыми и низкоустойчивыми к гипоксии крысами Вистар, критерий Манна-Уитни

Группа наблюдения Параметр	Контрольные			Время после введения ЛПС в дозе 1,5 мг/кг								
			p (1-2)	3 ч			6 ч			24 ч		
	(1)	(2)		(3)	(4)	p (3-4)	(5)	(6)	p (5-6)	(7)	(8)	p (7-8)
	ВУ n=5	НУ n=5		ВУ n=5	НУ n=5		ВУ n=5	НУ n=5		ВУ n=8	НУ n=5	
IL-1 β , пг/мл	1,7 (0,8-8,8)	3,0 (0,9-8,2)	0,77	14,2 (10,3-22,1)	40,0 (21,7-49,4)	0,06	3,2 (1,7-15,2)	6,0 (1,1-10,5)	0,81	2,6 (0,0-7,1)	15,7 (7,5-18,3)	0,04

Таблица 41

Достигнутая значимость различий (p) показателей содержания IL-1 β в сыворотке крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС (критерии Крускала-Уоллиса и Данна)

	Высокоустойчивые				Низкоустойчивые			
	Контроль	3 ч ЛПС	6 ч ЛПС	24 ч ЛПС	Контроль	3 ч ЛПС	6 ч ЛПС	24 ч ЛПС
Контроль	-	0,233	1,000	1,000	-	0,024	1,000	0,462
3 ч ЛПС	0,233	-	0,907	0,170	0,024	-	0,032	1,000
6 ч ЛПС	1,000	0,907	-	1,000	1,000	0,032	-	0,666
24 ч ЛПС	1,000	0,170	1,000	-	0,462	1,000	0,666	-

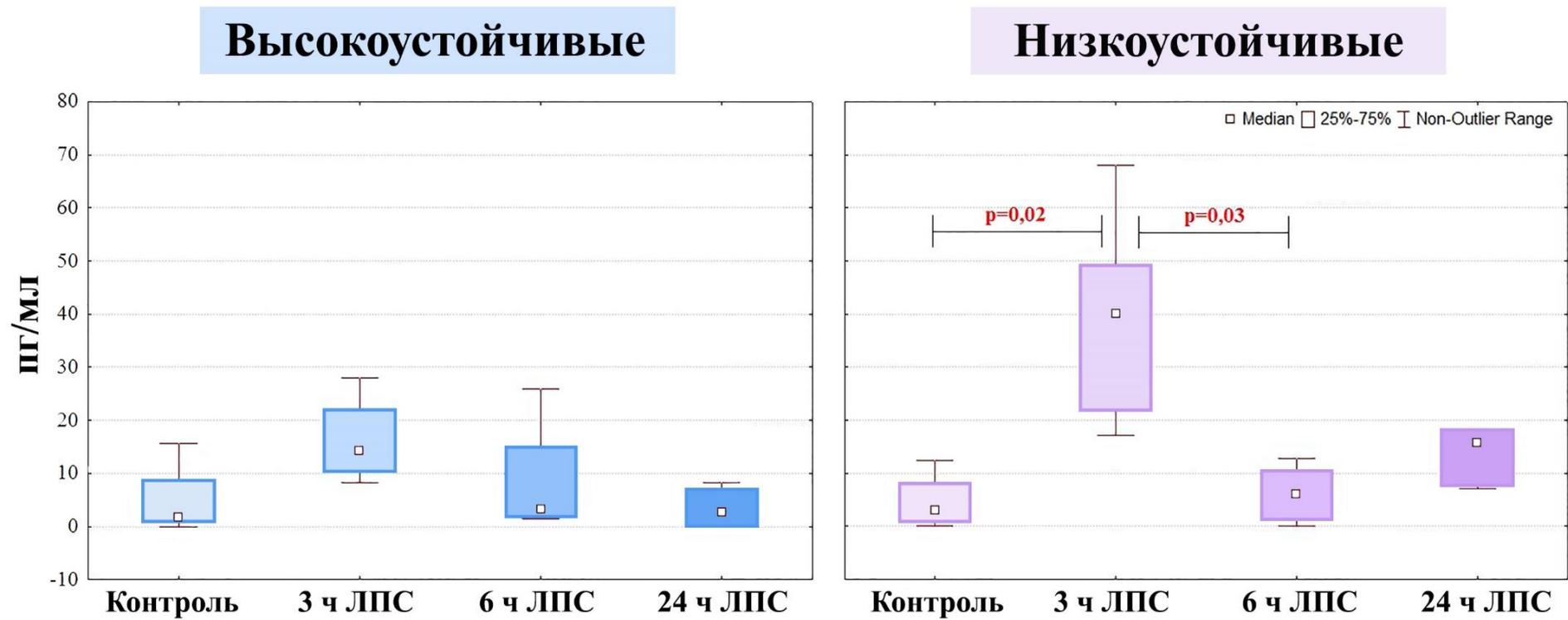


Рис. 38. Содержание IL-1 β в сыворотке крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и в разные сроки (3, 6 и 24 ч) после введения ЛПС, Me (25%;75%). p – статистическая значимость различий, критерии Крускала-Уоллиса и Данна

Таблица 42

Продукция ПЛ-10 клетками селезенки у высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС, Me (25%; 75%). p – статистическая значимость различий между высокоустойчивыми и низкоустойчивыми к гипоксии крысами Вистар, критерий Манна-Уитни

Группа наблюдения	Контрольные			Время после введения ЛПС в дозе 1,5 мг/кг								
				3 ч			6 ч			24 ч		
	(1)	(2)	p (1-2)	(3)	(4)	p (3-4)	(5)	(6)	p (5-6)	(7)	(8)	p (7-8)
Параметр	ВУ n=5	НУ n=5			ВУ n=5		НУ n=5			ВУ n=5	НУ n=5	
ПЛ-10, пг/мл	44,2 (44,2-45,6)	32,6 (31,2-38,4)	0,07	50,0 (47,1-51,4)	41,3 (39,9-48,5)	0,46	32,6 (31,2-34,1)	45,6 (34,1-47,1)	0,07	41,3 (29,0-44,9)	26,8 (20,1-31,2)	0,04

Таблица 43

Достигнутая значимость различий (p) показателей продукции ПЛ-10 клетками селезенки у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС (критерии Крускала-Уоллиса и Данна)

	Высокоустойчивые				Низкоустойчивые			
	Контроль	3 ч ЛПС	6 ч ЛПС	24 ч ЛПС	Контроль	3 ч ЛПС	6 ч ЛПС	24 ч ЛПС
Контроль	-	1,000	0,890	1,000	-	1,000	0,921	1,000
3 ч ЛПС	1,000	-	0,033	0,281	1,000	-	1,000	0,197
6 ч ЛПС	0,890	0,033	-	1,000	0,921	1,000	-	0,091
24 ч ЛПС	1,000	0,281	1,000	-	1,000	0,197	0,091	-

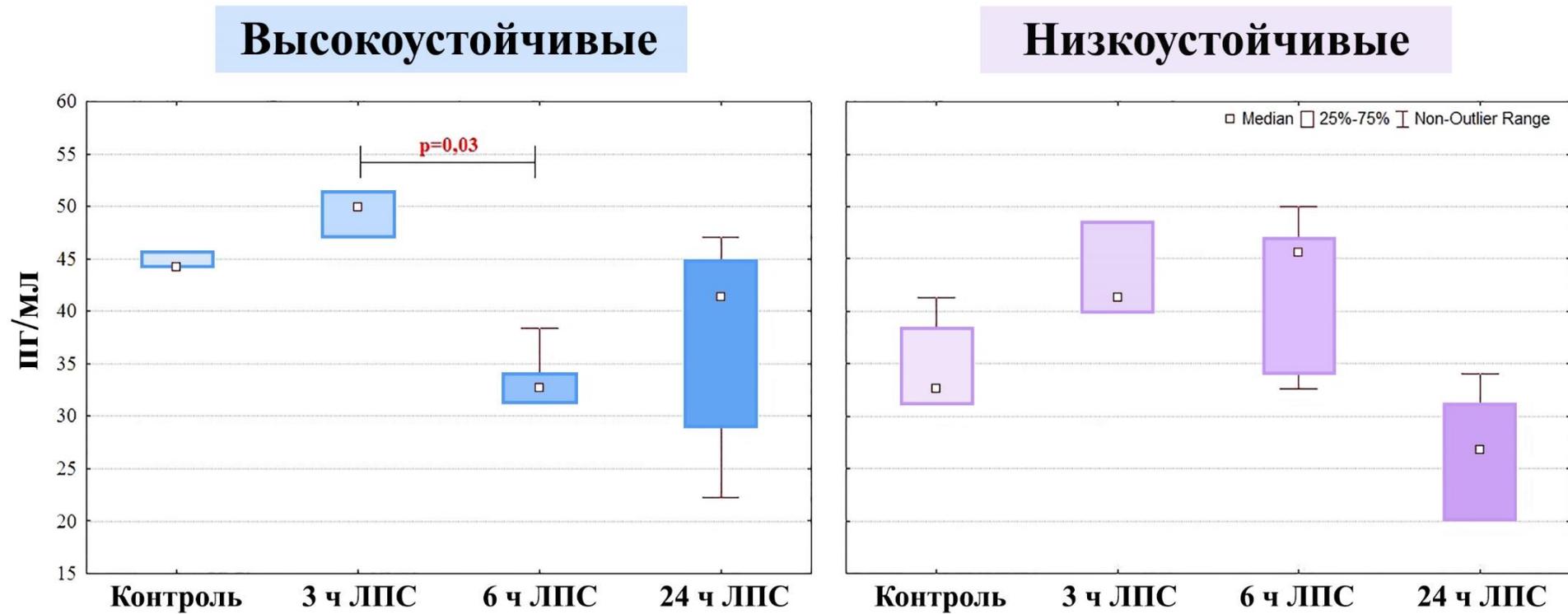


Рис. 39. Продукция IL-10 клетками селезенки у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и в разные сроки (3, 6 и 24 ч) после введения ЛПС, Me (25%;75%). p – статистическая значимость различий, критерии Крускала-Уоллиса и Данна

Таблица 44

Содержание TGF- β в сыворотке крови у высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС, Me (25%; 75%). p – статистическая значимость различий между высокоустойчивыми и низкоустойчивыми к гипоксии крысами Вистар, критерий Манна-Уитни

Группа наблюдения Параметр	Контрольные			Время после введения ЛПС в дозе 1,5 мг/кг								
				3 ч			6 ч			24 ч		
	(1)	(2)	p (1-2)	(3)	(4)	p (3-4)	(5)	(6)	p (5-6)	(7)	(8)	p (7-8)
	ВУ n=5	НУ n=5		ВУ n=5	НУ n=5		ВУ n=5	НУ n=5		ВУ n=8	НУ n=5	
TGF- β , пг/мл	58238,6 (48295,5- 69602,3)	49715,9 (45454,5- 52556,8)	0,29	44034,1 (41193,2- 49715,9)	44744,4 (29474,5- 57528,4)	0,90	35511,4 (28645,8- 48295,5)	24739,6 (22135,4- 31250,0)	0,09	27343,8 (22135,4- 31250,0)	38352,3 (31250,0- 48295,5)	0,25

Таблица 45

Достигнутая значимость различий (p) показателей содержания TGF- β в сыворотке крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС (критерии Крускала-Уоллиса и Данна)

	Высокоустойчивые				Низкоустойчивые			
	Контроль	3 ч ЛПС	6 ч ЛПС	24 ч ЛПС	Контроль	3 ч ЛПС	6 ч ЛПС	24 ч ЛПС
Контроль	-	1,000	0,453	0,008	-	1,000	0,087	1,000
3 ч ЛПС	1,000	-	1,000	0,267	1,000	-	0,469	1,000
6 ч ЛПС	0,453	1,000	-	1,000	0,087	0,469	-	1,000
24 ч ЛПС	0,008	0,267	1,000	-	1,000	1,000	1,000	-

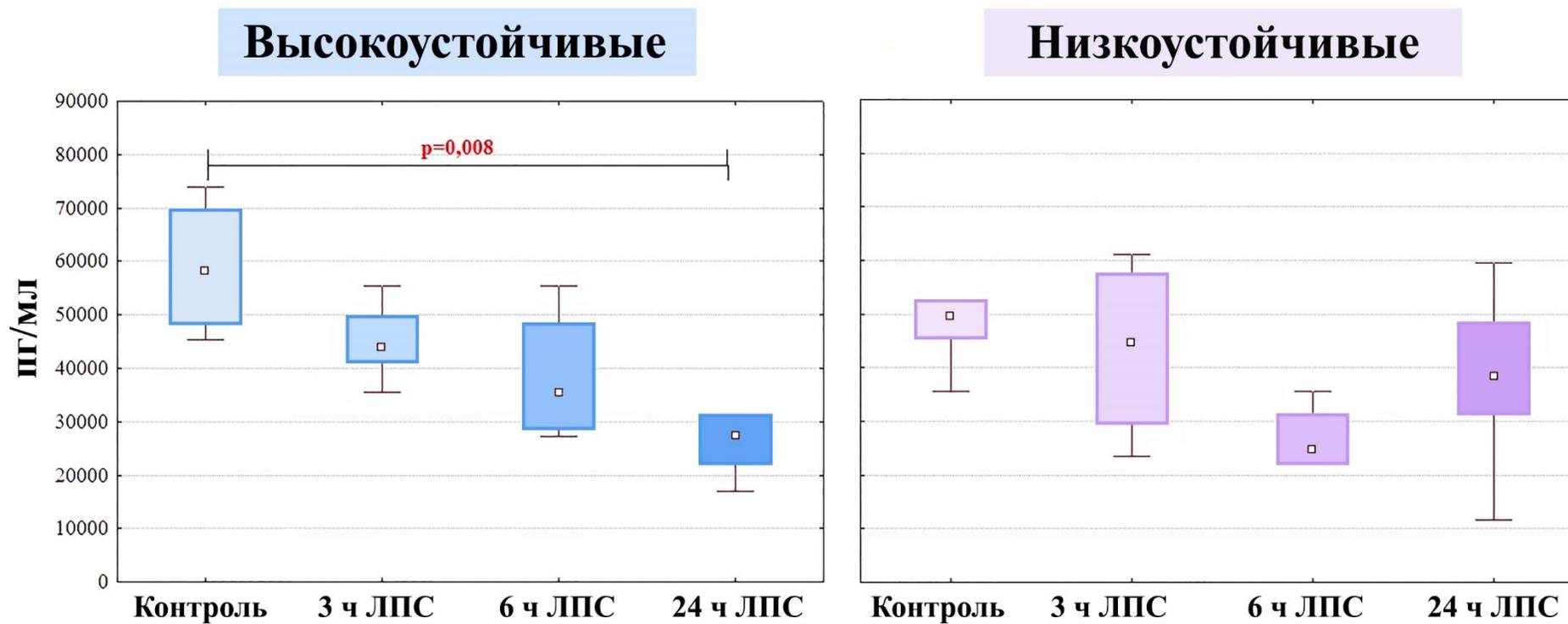


Рис. 40. Содержание TGF- β в сыворотке крови у высокоустойчивых к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и в разные сроки (3, 6 и 24 ч) после введения ЛПС, Me (25%;75%). p – статистическая значимость различий, критерии Крускала-Уоллиса и Данна

3.4.10 Содержание кортикостерона в сыворотке крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС

По данным ИФА, через 3 ч после введения ЛПС содержание кортикостерона в сыворотке крови не изменялось по сравнению с контрольными значениями как у высокоустойчивых, так и у низкоустойчивых к гипоксии крыс (табл. 46, 47).

Через 6 ч после введения ЛПС концентрация кортикостерона в сыворотке крови повышалась только у низкоустойчивых к гипоксии животных (рис. 41).

Через 24 ч после введения ЛПС у низкоустойчивых к гипоксии крыс показатель нормализовался, но был статистически значимо выше, чем у высокоустойчивых животных (табл. 46, 47).

Таблица 46

Содержание кортикостерона в сыворотке крови у высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС, Me (25%; 75%). p – статистическая значимость различий между высокоустойчивыми и низкоустойчивыми к гипоксии крысами Вистар, критерий Манна-Уитни

Группа наблюдения Параметр	Контрольные			Время после введения ЛПС в дозе 1,5 мг/кг								
				3 ч			6 ч			24 ч		
	(1)	(2)	p (1-2)	(3)	(4)	p (3-4)	(5)	(6)	p (5-6)	(7)	(8)	p (7-8)
	ВУ n=5	НУ n=5		ВУ n=5	НУ n=5		ВУ n=5	НУ n=5		ВУ n=8	НУ n=5	
Кортикостерон, нмоль/л	739,6 (384,6- 767,2)	715,2 (701,6- 764,0)	0,92	912,8 (833,2- 1023,6)	902,4 (815,6- 926,4)	0,75	1030,4 (936,8- 1051,2)	1026,8 (930,0- 1078,8)	0,75	426,8 (402,4- 556,0)	701,6 (653,2- 725,6)	0,04

Таблица 47

Достигнутая значимость различий (p) показателей содержания кортикостерона в сыворотке крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС (критерии Крускала-Уоллиса и Данна)

	Высокоустойчивые				Низкоустойчивые			
	Контроль	3 ч ЛПС	6 ч ЛПС	24 ч ЛПС	Контроль	3 ч ЛПС	6 ч ЛПС	24 ч ЛПС
Контроль	-	0,270	0,081	1,000	-	0,208	0,030	1,000
3 ч ЛПС	0,270	-	1,000	0,031	0,208	-	1,000	0,347
6 ч ЛПС	0,081	1,000	-	0,005	0,030	1,000	-	0,057
24 ч ЛПС	1,000	0,031	0,005	-	1,000	0,347	0,057	-

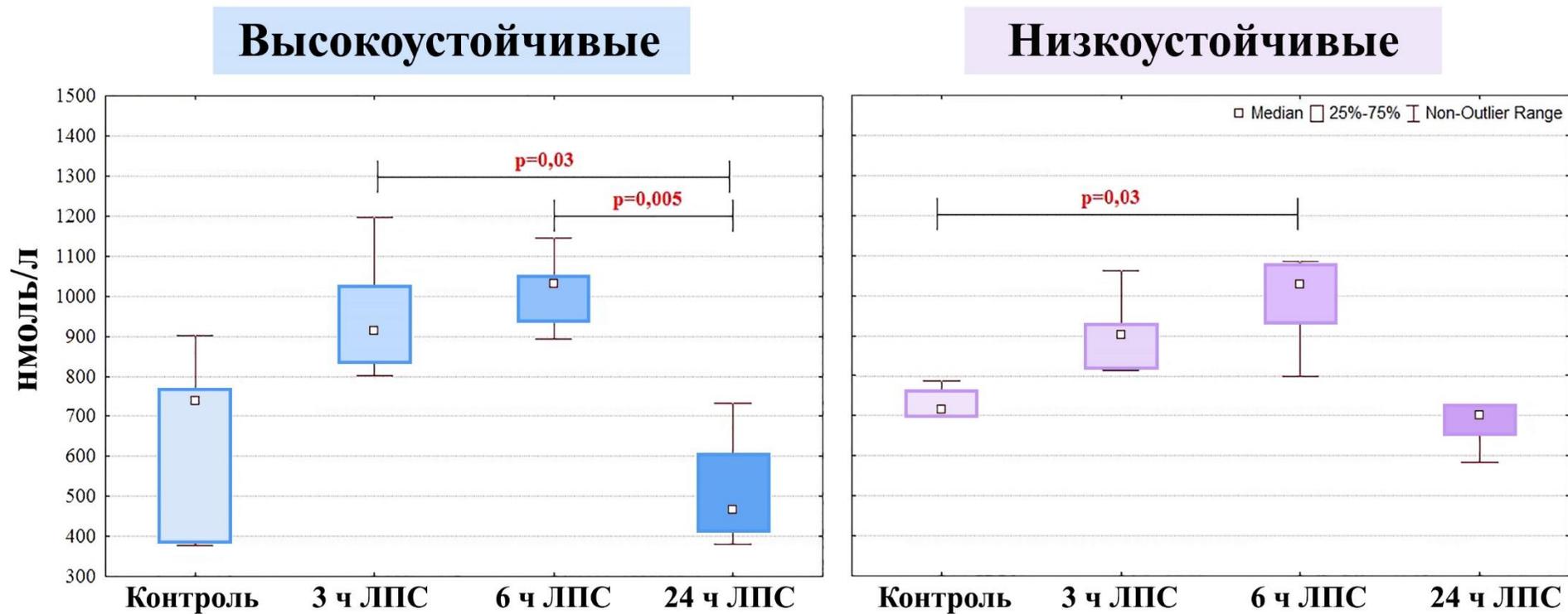


Рис. 41. Содержание кортикостерона в сыворотке крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и в разные сроки (3, 6 и 24 ч) после введения ЛПС, Me (25%;75%). p – статистическая значимость различий, критерии Крускала-Уоллиса и Данна

3.5 Морфофункциональные различия иммунной системы у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС

3.5.1 Морфологическое исследование тимуса у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС

На качественном уровне через 3 и 6 ч после введения ЛПС в тимусе как у высокоустойчивых, так и низкоустойчивых к гипоксии крыс наблюдалась умеренная акцидентальная инволюция, характеризующаяся очаговым сужением коркового и расширением мозгового вещества, выявлялась картина «звездного неба» с гибелью тимоцитов (рис. 42, 43).

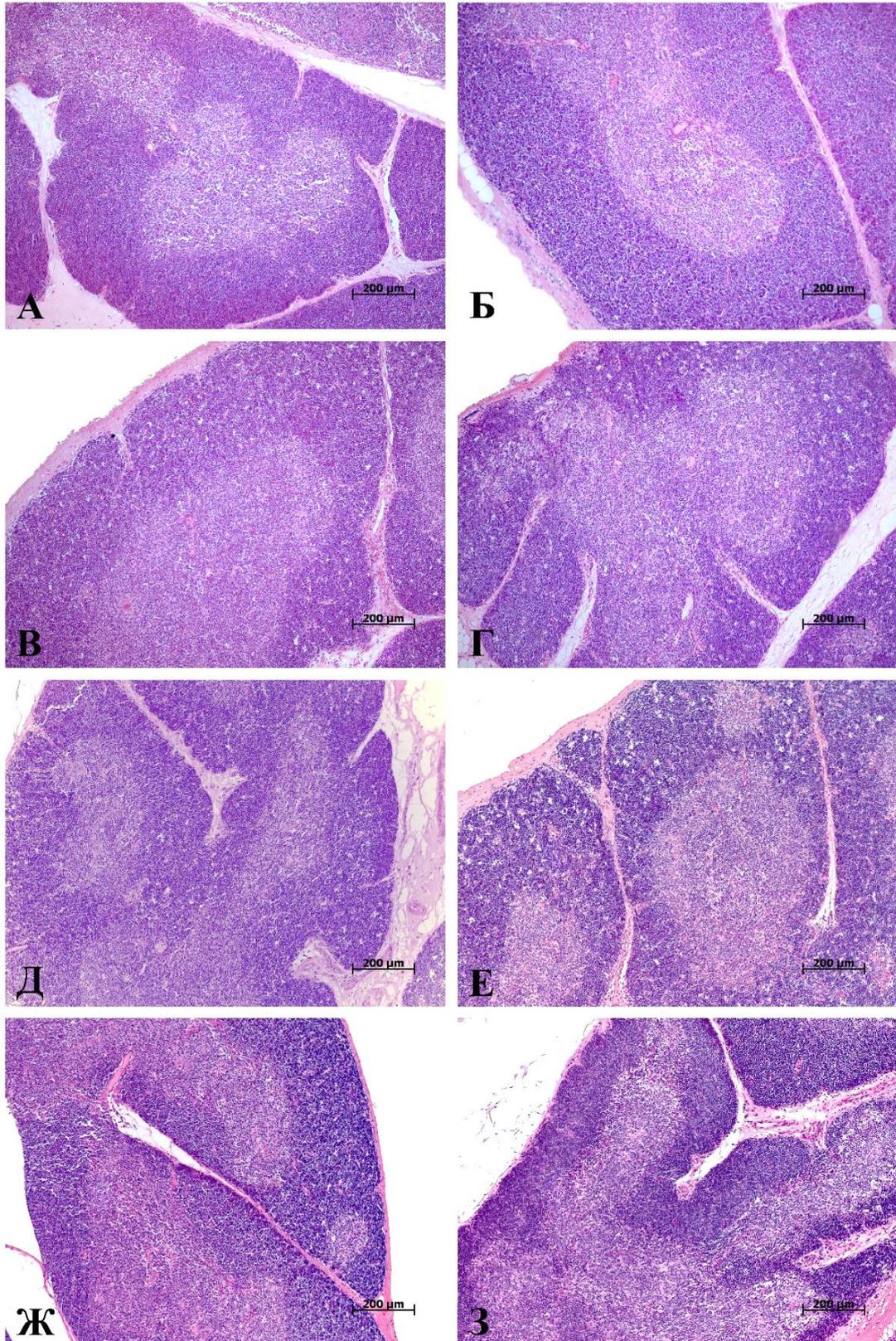


Рис. 42. Морфологические изменения тимуса у высокоустойчивых (А, В, Д, Ж) и низкоустойчивых (Б, Г, Е, З) к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп (А, Б), через 3 (В, Г), 6 (Д, Е) и 24 ч (Ж, З) после введения ЛПС. Контрольные группы – корковое и мозговое вещество плотно «заселено» лимфоцитами, границы между корковым и мозговым веществом четкие; через 3 и 6 ч после введения ЛПС – картина «звездного неба» в корковом веществе. Окраска гематоксилином и эозином

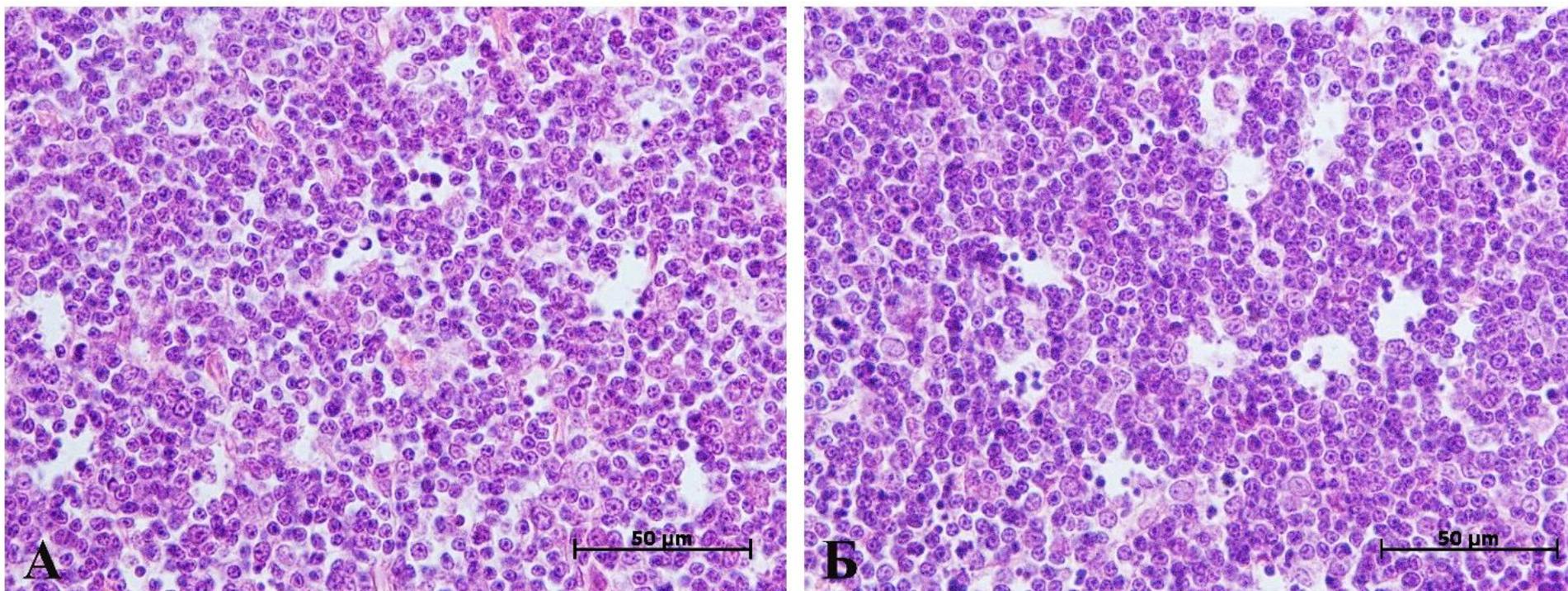


Рис. 43. Морфологические изменения тимуса у высокоустойчивых (А) и низкоустойчивых (Б) к гипоксии крыс через 3 ч после введения ЛПС. Выявляется картина «звездного неба» в корковом веществе, присутствует много фрагментов ядер. Окраска гематоксилином и эозином

3.5.2 Морфометрическое исследование тимуса у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС

При морфометрическом исследовании показано, что показатели объемной доли коркового вещества тимуса, а также отношения коркового к мозговому веществу у низкоустойчивых к гипоксии крыс через 3 ч после введения ЛПС были статистически значимо ниже, чем у высокоустойчивых (табл. 48). Однако статистически значимых изменений объемной доли коркового и мозгового вещества тимуса как у высокоустойчивых, так и низкоустойчивых к гипоксии крыс в разные сроки после введения ЛПС по сравнению с контрольной группой выявлено не было (рис. 44, табл. 49).

Таблица 48

Морфометрическая характеристика тимуса у высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС, Me (25%; 75%). p – статистическая значимость различий между высокоустойчивыми и низкоустойчивыми к гипоксии крысами Вистар, критерий Манна-Уитни

Группа наблюдения	Контрольные			Время после введения ЛПС в дозе 1,5 мг/кг								
				3 ч			6 ч			24 ч		
	(1)	(2)	p (1-2)	(3)	(4)	p (3-4)	(5)	(6)	p (5-6)	(7)	(8)	p (7-8)
	ВУ n=5	НУ n=5		ВУ n=5	НУ n=5		ВУ n=5	НУ n=5		ВУ n=8	НУ n=5	
Параметры												
Корковое вещество, %	59,7 (54,7-64,9)	58,9 (56,7-62,0)	0,81	60,2 (58,1-61,5)	53,1 (50,5-55,5)	0,04	53,2 (52,8-53,5)	52,9 (47,2-59,7)	1,00	58,8 (56,5-61,9)	62,5 (55,6-63,9)	0,50
Мозговое вещество, %	40,8 (35,0-46,0)	38,6 (37,2-41,5)	0,62	35,6 (33,0-36,4)	40,6 (39,1-44,7)	0,02	41,8 (40,7-42,0)	39,6 (32,5-45,6)	1,00	36,6 (33,3-39,0)	32,2 (29,1-38,9)	0,50
Отношение коркового вещества к мозговому	1,7 (1,2-2,1)	1,7 (1,7-2,0)	0,62	2,1 (1,9-2,4)	1,3 (1,2-1,5)	0,02	1,4 (1,3-1,5)	1,5 (1,1-2,0)	1,00	1,8 (1,6-2,2)	2,3 (1,6-2,4)	0,73

Таблица 49

Достигнутая значимость различий (p) показателей коркового и мозгового вещества тимуса, и отношения коркового вещества к мозговому у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения после введения ЛПС (критерий Крускала-Уоллиса и Данна)

Показатели	Высокоустойчивые				Низкоустойчивые				
	Контроль	3 ч ЛПС	6 ч ЛПС	24 ч ЛПС	Контроль	3 ч ЛПС	6 ч ЛПС	24 ч ЛПС	
Корковое вещество	Контроль	-	1,000	0,556	1,000	-	1,000	1,000	1,000
	3 ч ЛПС	1,000	-	0,184	1,000	1,000	-	1,000	0,480
	6 ч ЛПС	0,556	0,184	-	0,171	1,000	1,000	-	0,741
	24 ч ЛПС	1,000	1,000	0,171	-	1,000	0,480	0,741	-
Мозговое вещество	Контроль	-	1,000	1,000	1,000	-	1,000	1,000	1,000
	3 ч ЛПС	1,000	-	0,441	1,000	1,000	-	1,000	0,480
	6 ч ЛПС	1,000	0,441	-	1,000	1,000	1,000	-	1,000
	24 ч ЛПС	1,000	1,000	1,000	-	1,000	0,480	1,000	-
Отношение коркового вещества к мозговому	Контроль	-	1,000	0,465	1,000	-	1,000	1,000	1,000
	3 ч ЛПС	1,000	-	0,077	1,000	1,000	-	1,000	0,741
	6 ч ЛПС	0,465	0,077	-	0,589	1,000	1,000	-	1,000
	24 ч ЛПС	1,000	1,000	0,589	-	1,000	0,741	1,000	-

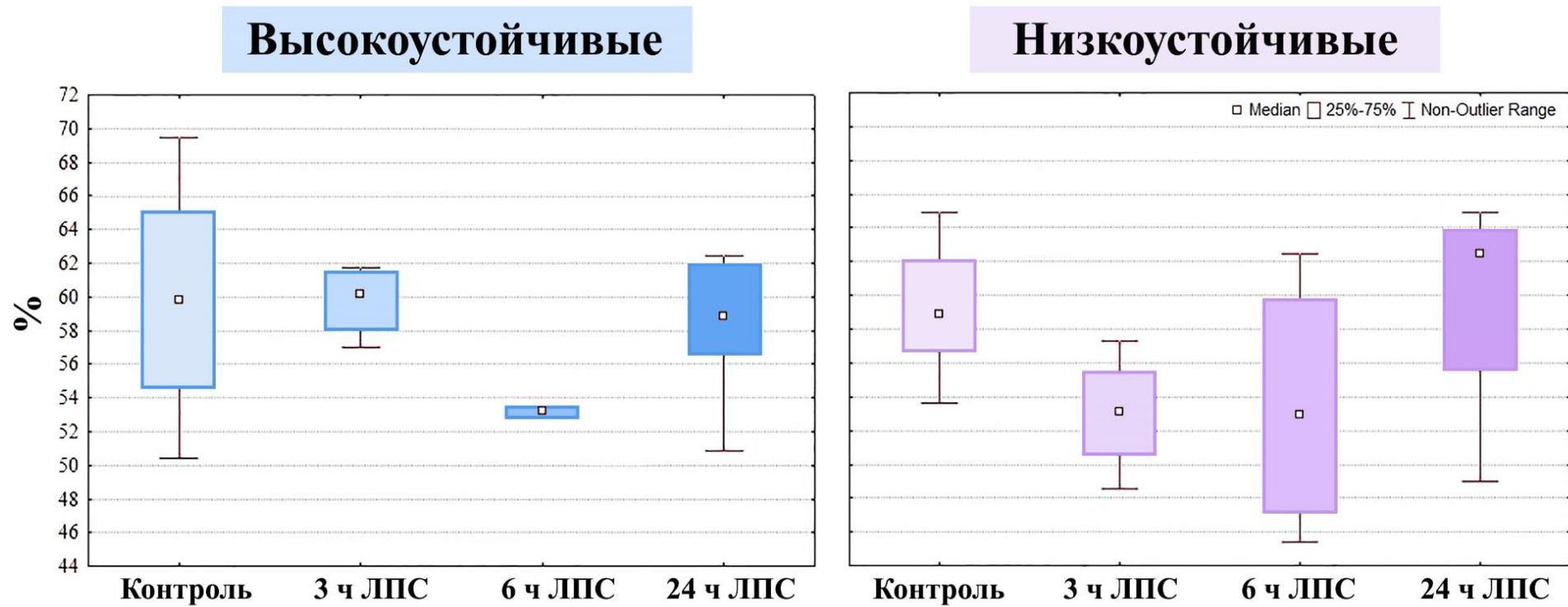


Рис. 44. Объемная доля коркового вещества тимуса у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и в разные сроки (3, 6 и 24 ч) после введения ЛПС, Me (25%;75%)

3.5.3 Определение числа апоптотически гибнущих клеток в тимусе у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС

В контрольных группах высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс количество апоптотически гибнущих CD3⁻ и CD3⁺-клеток в тимусе не различалось (табл. 50).

По сравнению с показателями через 3 ч после введения ЛПС, происходило снижение числа апоптотически гибнущих CD3⁻ клеток в тимусе как у высокоустойчивых, так и у низкоустойчивых к гипоксии животных через 24 ч (табл. 50, 51). Через 6 ч после введения ЛПС, по сравнению с 3 ч, наблюдалось статистически значимое снижение числа апоптотически гибнущих CD3⁺-лимфоцитов в тимусе у низкоустойчивых к гипоксии крыс (рис. 45). Через 24 ч после введения ЛПС происходило статистически значимое повышение числа апоптотически гибнущих CD3⁺-лимфоцитов в тимусе у высокоустойчивых к гипоксии животных по сравнению с показателями через 6 ч, однако относительно контрольной группы изменений выявлено не было.

Через 24 ч после введения ЛПС число апоптотически гибнущих CD3⁺-лимфоцитов в тимусе было статистически значимо выше у высокоустойчивых к гипоксии крыс по сравнению с низкоустойчивыми (табл. 50, 51).

Таблица 50

Число апоптотически гибнущих клеток в тимусе у высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС, Me (25%; 75%). p – статистическая значимость различий между высокоустойчивыми и низкоустойчивыми к гипоксии крысами Вистар, критерий Манна-Уитни

Группа наблюдения	Контрольные		Время после введения ЛПС в дозе 1,5 мг/кг									
			3 ч			6 ч			24 ч			
	(1)	(2)	p (1-2)	(3)	(4)	p (3-4)	(5)	(6)	p (5-6)	(7)	(8)	p (7-8)
	ВУ n=5	НУ n=5		ВУ n=5	НУ n=5		ВУ n=5	НУ n=5		ВУ n=8	НУ n=5	
Все клетки тимуса (CD3-), %	11,3 (10,8-15,1)	12,7 (8,2-15,3)	1,00	14,0 (14,0-14,0)	17,6 (11,7-18,4)	0,92	10,4 (9,7-12,1)	10,5 (10,3-13,3)	0,81	4,9 (3,2-7,7)	5,8 (2,2-8,5)	0,85
CD3+-лимфоциты, %	7,0 (5,4-9,2)	9,0 (6,4-11,0)	0,32	9,0 (7,5-9,8)	8,8 (8,3-8,8)	0,92	5,0 (4,1-5,4)	4,9 (4,8-5,3)	0,62	8,4 (7,8-11,4)	5,9 (5,0-8,0)	0,04

Таблица 51

Достигнутая значимость различий (p) показателей числа апоптотически гибнущих CD3- клеток в тимусе у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС (критерии Крускала-Уоллиса и Данна)

Показатели	Высокоустойчивые				Низкоустойчивые				
	Контроль	3 ч ЛПС	6 ч ЛПС	24 ч ЛПС	Контроль	3 ч ЛПС	6 ч ЛПС	24 ч ЛПС	
Все клетки тимуса (CD3-)	Контроль	-	1,000	1,000	0,055	-	0,958	1,000	0,084
	3 ч ЛПС	1,000	-	0,414	0,002	0,958	-	1,000	0,002
	6 ч ЛПС	1,000	0,414	-	0,987	1,000	1,000	-	0,213
	24 ч ЛПС	0,055	0,002	0,987		0,084	0,002	0,213	
CD3+-лимфоциты	Контроль	-	1,000	0,531	1,000	-	1,000	0,044	0,389
	3 ч ЛПС	1,000	-	0,068	1,000	1,000	-	0,132	1,000
	6 ч ЛПС	0,531	0,068	-	0,034	0,044	0,132	-	1,000
	24 ч ЛПС	1,000	1,000	0,034		0,389	1,000	1,000	

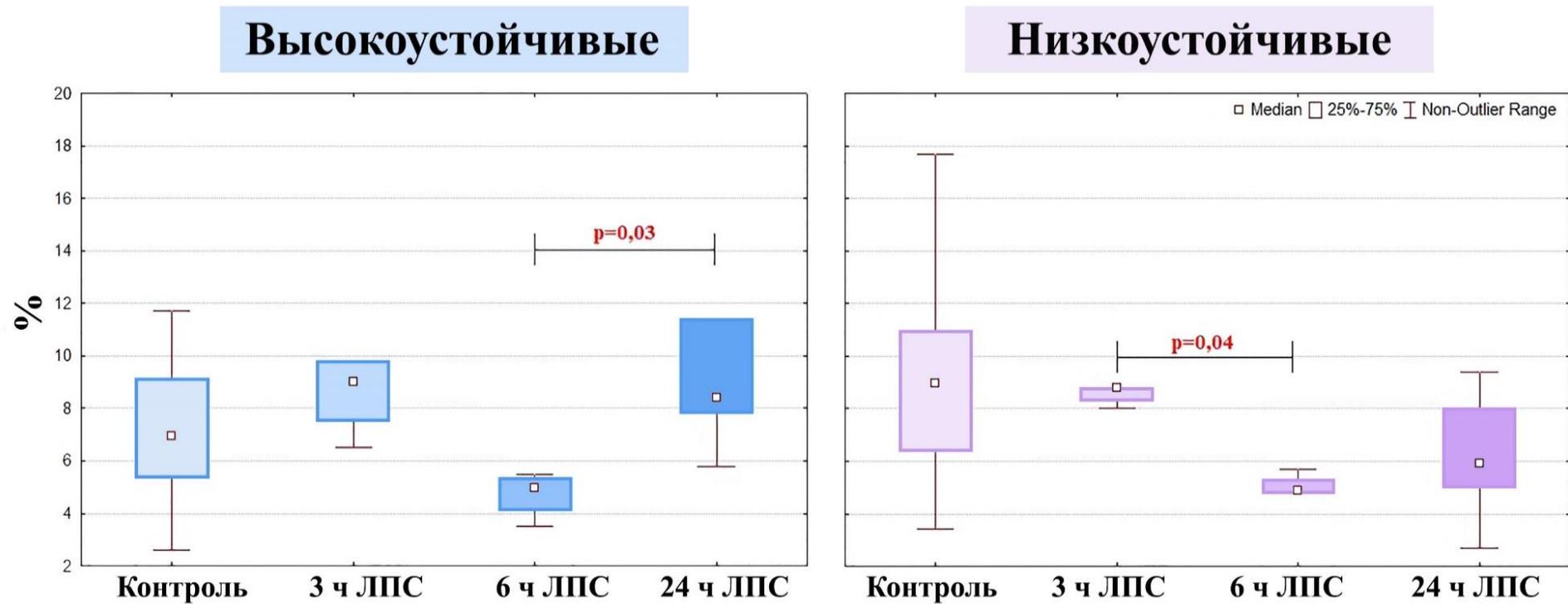


Рис. 45. Число апоптотически гибнущих CD3+-лимфоцитов в тимусе у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и в разные сроки (3, 6 и 24 ч) после введения ЛПС, Me (25%; 75%). p – статистическая значимость различий, критерии Крускала-Уоллиса и Данна

3.5.4 Морфологическое исследование селезенки у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС

На качественном уровне в селезенке контрольной группы низкоустойчивых к гипоксии крыс наблюдались широкие маргинальные зоны лимфоидных узелков, через 3 ч после введения ЛПС выявлялись широкие светлые центры, узкие маргинальные зоны. У высокоустойчивых к гипоксии животных в селезенке через 24 ч после введения ЛПС наблюдались узкие ПАЛМ-зоны (рис. 46).

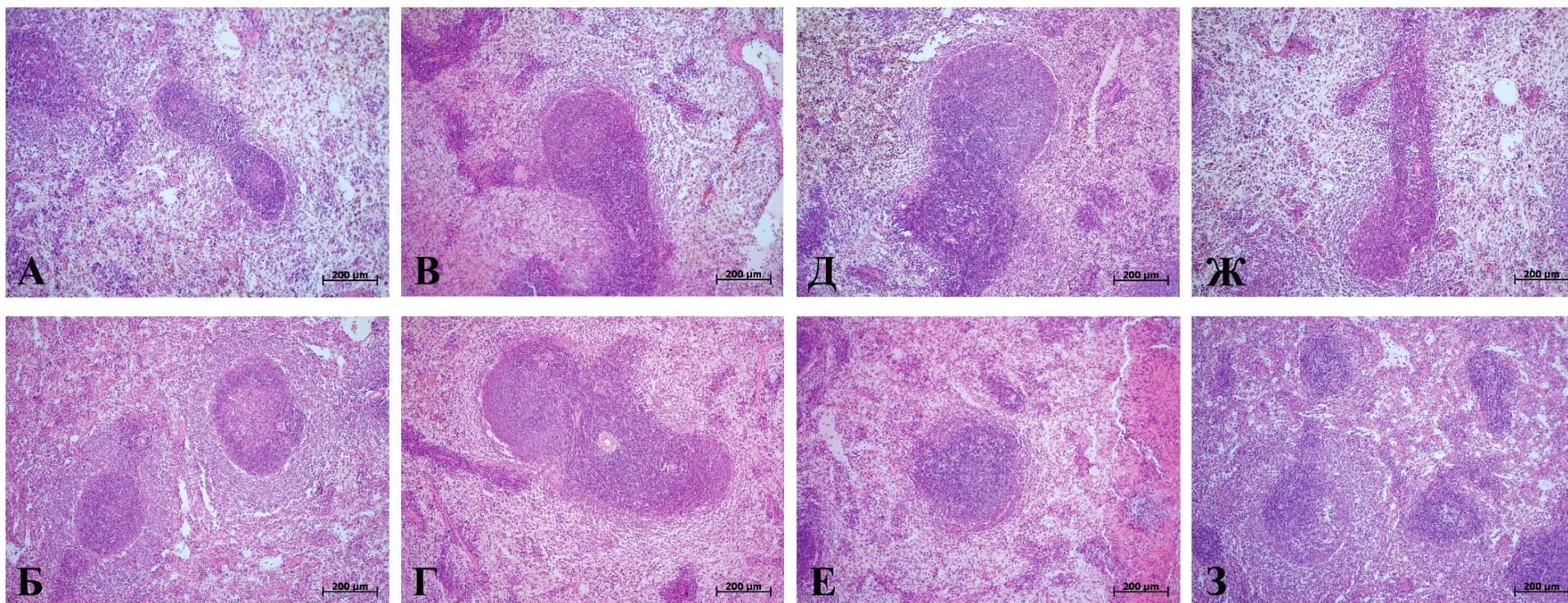


Рис. 46. Морфологические изменения селезенки у высокоустойчивых (А, В, Д, Ж) и низкоустойчивых (Б, Г, Е, З) к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп (А, Б), через 3 (В, Г), 6 (Д, Е) и 24 ч (Ж, З) после введения ЛПС. В контрольной группе низкоустойчивых к гипоксии крыс широкие маргинальные зоны лимфоидных узелков, через 3 ч после введения ЛПС – широкие светлые центры, узкие маргинальные зоны. У высокоустойчивых к гипоксии крыс через 24 ч после введения ЛПС – узкая ПАЛМ-зона. Окраска гематоксилином и эозином

3.5.5 Морфометрическое исследование селезенки у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС

При морфометрическом исследовании селезенки показано, что по сравнению с высокоустойчивыми у низкоустойчивых к гипоксии крыс контрольной группы показатель объемной доли маргинальных зон лимфоидных узелков был больше (табл. 52). Только у низкоустойчивых к гипоксии животных через 3 ч после введения ЛПС наблюдалось сужение маргинальных зон лимфоидных узелков селезенки (рис. 47, табл. 52, 54).

Отношение белой пульпы селезенки к красной изменялось только у низкоустойчивых к гипоксии крыс – через 3 и 24 ч после введения ЛПС показатель статистически значимо повышался (табл. 52, 53).

Только у низкоустойчивых к гипоксии крыс через 3 и 6 ч после введения ЛПС наблюдалось расширение светлых центров лимфоидных узелков селезенки (рис. 48, табл. 55), а через 24 ч – увеличение показателя объемной доли белой пульпы (табл. 52, 53).

В селезенке у высокоустойчивых к гипоксии крыс через 24 ч после введения ЛПС по сравнению с соответствующими показателями через 3 ч наблюдалось увеличение объемной доли лимфоидных узелков (табл. 52, 53) и уменьшение – ПАЛМ-зоны (рис. 49, табл. 52, 56).

Таблица 52

Морфометрическая характеристика селезенки у высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС, Me (25%; 75%). p – статистическая значимость различий между высокоустойчивыми и низкоустойчивыми к гипоксии крысами Вистар, критерий Манна-Уитни

Группа наблюдения	Контрольные			Время после введения ЛПС в дозе 1,5 мг/кг								
				3 ч			6 ч			24 ч		
	(1)	(2)	p (1-2)	(3)	(4)	p (3-4)	(5)	(6)	p (5-6)	(7)	(8)	p (7-8)
	ВУ n=5	НУ n=5		ВУ n=5	НУ n=5		ВУ n=5	НУ n=5		ВУ n=8	НУ n=5	
Объемная доля белой пульпы, %	39,6 (36,1-45,4)	35,6 (35,6-36,6)	0,22	42,9 (41,7-43,3)	45,1 (43,4-48,8)	0,06	45,6 (43,6-49,5)	38,7 (38,4-42,1)	0,08	48,6 (44,0-48,8)	49,3 (43,6-54,0)	0,46
Отношение белой пульпы к красной	0,67 (0,58-0,87)	0,59 (0,56-0,59)	0,33	0,78 (0,74-0,79)	0,87 (0,79-1,01)	0,08	0,89 (0,82-1,1)	0,67 (0,64-0,77)	0,04	0,96 (0,80-0,99)	1,05 (0,83-1,31)	0,46
Объемная доля лимфоидных узелков в белой пульпе, %	37,9 (35,5-39,8)	36,7 (36,1-42,9)	0,81	30,3 (24,9-42,8)	38,8 (30,5-42,6)	0,56	43,2 (35,6-48,8)	46,6 (35,2-57,0)	0,56	61,1 (53,8-62,4)	54,4 (49,5-58,7)	0,33
Объемная доля ПАЛМ в белой пульпе, %	62,1 (60,2-64,5)	63,3 (57,1-63,9)	0,81	69,7 (57,2-75,1)	61,2 (57,4-69,5)	0,56	56,8 (51,2-64,4)	53,4 (43,0-64,8)	0,56	38,9 (37,6-46,2)	45,6 (41,3-50,5)	0,33
Объемная доля маргинальных зон лимфоидных узелков, %	55,3 (50,4-55,9)	59,6 (58,6-60,6)	0,01	47,7 (41,0-54,5)	41,6 (40,7-43,5)	0,39	41,7 (34,8-50,1)	48,6 (46,0-51,0)	0,56	49,4 (47,0-49,4)	52,9 (50,2-53,5)	0,33
Объемная доля светлых центров лимфоидных узелков, %	14,5 (13,5-15,7)	15,9 (13,5-16,6)	0,62	29,4 (20,4-33,3)	33,2 (27,2-39,6)	0,39	31,6 (29,7-38,8)	28,1 (26,8-33,1)	0,25	18,6 (13,3-22,0)	23,0 (21,6-23,9)	0,22

Таблица 53

Достигнутая значимость различий (p) показателей объемной доли белой пульпы, отношения белой пульпы к красной, объемной доли лимфоидных узелков селезенки у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС (критерии Крускала-Уоллиса и Данна)

Показатели	Высокоустойчивые				Низкоустойчивые				
	Контроль	3 ч ЛПС	6 ч ЛПС	24 ч ЛПС	Контроль	3 ч ЛПС	6 ч ЛПС	24 ч ЛПС	
Объемная доля белой пульпы	Контроль	-	1,000	0,599	0,646	-	0,064	1,000	0,013
	3 ч ЛПС	1,000	-	1,000	1,000	0,064	-	1,000	1,000
	6 ч ЛПС	0,599	1,000	-	1,000	1,000	1,000	-	0,412
	24 ч ЛПС	0,646	1,000	1,000	-	0,013	1,000	0,412	-
Отношение белой пульпы к красной	Контроль	-	1,000	0,741	0,840	-	0,043	1,000	0,013
	3 ч ЛПС	1,000	-	1,000	1,000	0,043	-	1,000	1,000
	6 ч ЛПС	0,741	1,000	-	1,000	1,000	1,000	-	0,557
	24 ч ЛПС	0,840	1,000	1,000	-	0,013	1,000	0,557	-
Объемная доля лимфоидных узелков	Контроль	-	1,000	1,000	0,144	-	1,000	1,000	0,224
	3 ч ЛПС	1,000	-	1,000	0,041	1,000	-	1,000	0,086
	6 ч ЛПС	1,000	1,000	-	0,417	1,000	1,000	-	1,000
	24 ч ЛПС	0,144	0,041	0,417	-	0,224	0,086	1,000	-

Достигнутая значимость различий (p) показателей объемной доли маргинальных зон лимфоидных узелков селезенки у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС (критерии Крускала-Уоллиса и Данна)

	Высокоустойчивые				Низкоустойчивые			
	Контроль	3 ч ЛПС	6 ч ЛПС	24 ч ЛПС	Контроль	3 ч ЛПС	6 ч ЛПС	24 ч ЛПС
Контроль	-	1,000	0,480	1,000	-	0,001	0,109	0,840
3 ч ЛПС	1,000	-	1,000	1,000	0,001	-	1,000	0,214
6 ч ЛПС	0,480	1,000	-	1,000	0,109	1,000	-	1,000
24 ч ЛПС	1,000	1,000	1,000	-	0,840	0,214	1,000	-

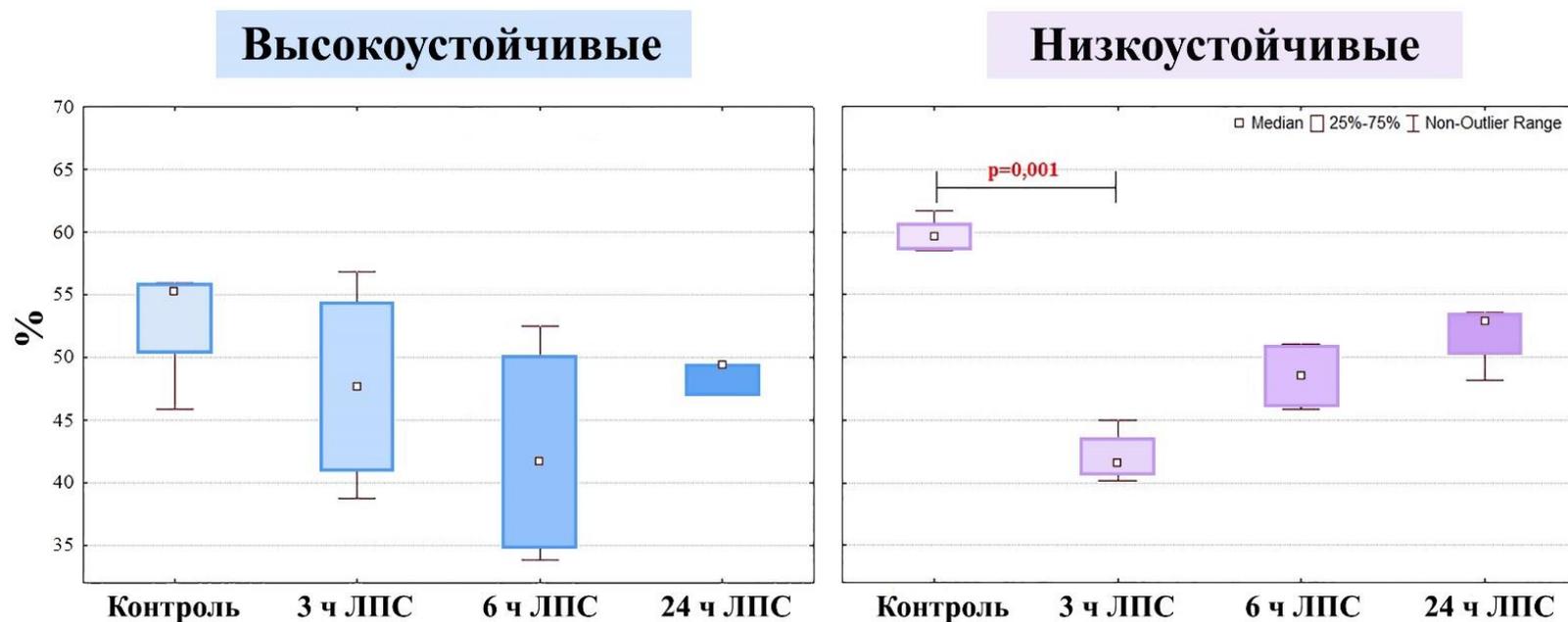


Рис. 47. Показатели объемной доли маргинальных зон лимфоидных узелков селезенки у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и в разные сроки (3, 6 и 24 ч) после введения ЛПС, Me (25%; 75%). p – статистическая значимость различий, критерии Крускала-Уоллиса и Данна

Достигнутая значимость различий (p) показателей объемной доли светлых центров лимфоидных узелков селезенки у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС (критерии Крускала-Уоллиса и Данна)

	Высокоустойчивые				Низкоустойчивые			
	Контроль	3 ч ЛПС	6 ч ЛПС	24 ч ЛПС	Контроль	3 ч ЛПС	6 ч ЛПС	24 ч ЛПС
Контроль	-	0,270	0,140	1,000	-	0,015	0,019	0,727
3 ч ЛПС	0,270	-	1,000	0,662	0,015	-	1,000	0,969
6 ч ЛПС	0,140	1,000	-	0,346	0,019	1,000	-	1,000
24 ч ЛПС	1,000	0,662	0,346	-	0,727	0,969	1,000	-

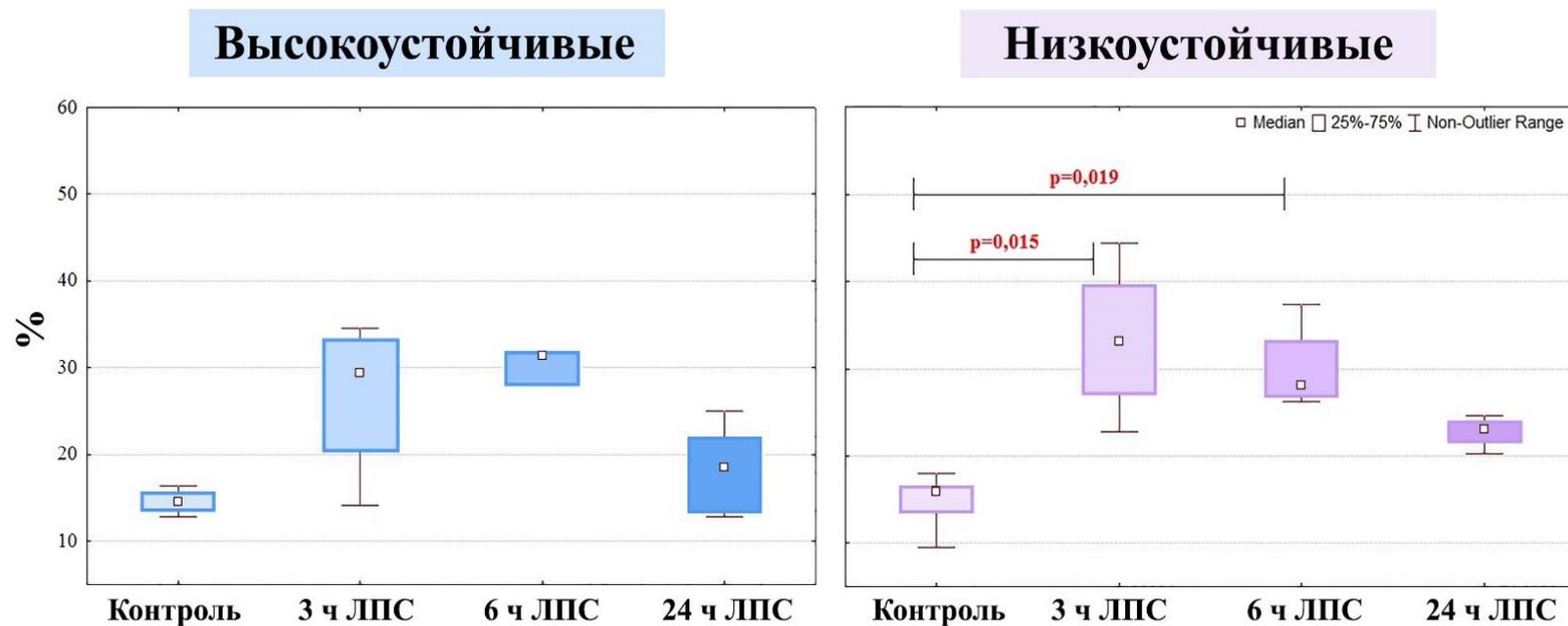


Рис. 48. Показатели объемной доли светлых центров лимфоидных узелков селезенки у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и в разные сроки (3, 6 и 24 ч) после введения ЛПС, Ме (25%; 75%). p – статистическая значимость различий, критерии Крускала-Уоллиса и Данна

Таблица 56

Достигнутая значимость различий (p) показателей объемной доли ПАЛМ в белой пульпе селезенки у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС (критерии Крускала-Уоллиса и Данна)

	Высокоустойчивые				Низкоустойчивые			
	Контроль	3 ч ЛПС	6 ч ЛПС	24 ч ЛПС	Контроль	3 ч ЛПС	6 ч ЛПС	24 ч ЛПС
Контроль	-	1,000	1,000	0,144	-	1,000	1,000	0,224
3 ч ЛПС	1,000	-	1,000	0,041	1,000	-	1,000	0,086
6 ч ЛПС	1,000	1,000	-	0,417	1,000	1,000	-	1,000
24 ч ЛПС	0,144	0,041	0,417	-	0,224	0,086	1,000	-

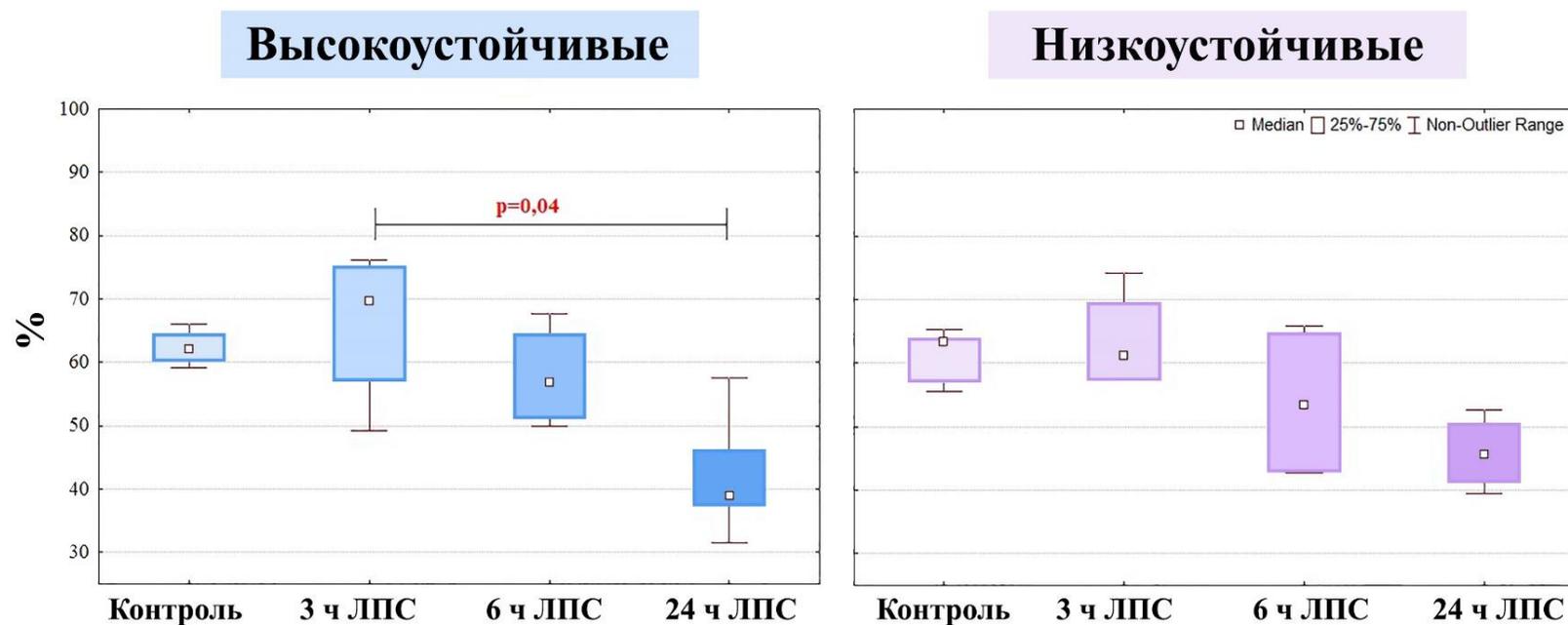


Рис. 49. Показатели объемной доли ПАЛМ в белой пульпе селезенки у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и в разные сроки (3, 6 и 24 ч) после введения ЛПС, Me (25%; 75%). p – статистическая значимость различий, критерии Крускала-Уоллиса и Данна

3.5.6 Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС

При иммунофенотипическом анализе субпопуляций лимфоцитов периферической крови показано, что у высокоустойчивых к гипоксии крыс контрольной группы абсолютное число цитотоксических Т-лимфоцитов и НК клеток было статистически значимо ниже, чем у низкоустойчивых (табл. 57).

Через 3 ч после введения ЛПС только у низкоустойчивых к гипоксии крыс происходило достоверное снижение абсолютного числа цитотоксических Т-лимфоцитов (табл. 58), В-лимфоцитов (табл. 58), и НК клеток (рис. 50, табл. 59) в периферической крови.

Через 6 ч после введения ЛПС в периферической крови у низкоустойчивых к гипоксии крыс статистически значимо снижалось абсолютное число Т-хелперов и Т-регуляторных клеток (табл. 58). При этом у высокоустойчивых к гипоксии крыс через 6 ч после введения ЛПС по сравнению с контрольной группой статистически значимо повышалось относительное количество НК клеток (табл. 60), цитотоксических Т-лимфоцитов (рис. 51, табл. 61) и снижалось относительное число В-лимфоцитов (рис. 52, табл. 62), Т-хелперов (табл. 60) и абсолютное число Т-регуляторных клеток (табл. 58).

Через 24 ч после введения ЛПС показатели нормализовались как у высокоустойчивых, так и у низкоустойчивых крыс, однако у высокоустойчивых животных абсолютное количество Т-лимфоцитов и НК клеток было достоверно выше, а относительное число В-лимфоцитов – ниже, чем у низкоустойчивых (табл. 57).

Таблица 57

Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС, Ме (25%; 75%). p – статистическая значимость различий между высокоустойчивыми и низкоустойчивыми к гипоксии крысами Вистар, критерий Манна-Уитни

Группа наблюдения		Контрольные			Время после введения ЛПС в дозе 1,5 мг/кг								
					3 ч			6 ч			24 ч		
		(1)	(2)	p (1-2)	(3)	(4)	p (3-4)	(5)	(6)	p (5-6)	(7)	(8)	p (7-8)
		ВУ n=5	НУ n=5		ВУ n=5	НУ n=5		ВУ n=5	НУ n=5		ВУ n=8	НУ n=5	
Параметры													
Т-лимфоциты (CD3+)	% от лимфоцитов	38,0 (28,4-45,9)	53,6 (44,2-54,1)	0,14	42,3 (35,1-51,8)	55,8 (48,5-56,4)	0,25	44,6 (25,3-45,2)	43,0 (37,9-45,9)	0,33	51,2 (40,0-57,9)	46,0 (40,2-51,5)	0,38
	10 ⁶ /мл	3,5 (2,7-4,3)	7,0 (4,8-7,7)	0,09	2,7 (2,1-2,8)	2,3 (2,2-3,2)	0,75	1,7 (1,2-2,6)	1,9 (1,7-2,2)	0,81	6,0 (5,4-6,2)	4,6 (3,9-5,2)	0,03
Т-хелперы (CD3+CD4+)	% от Т-лимфоцитов	57,5 (49,0-66,3)	29,8 (23,2-34,4)	0,05	46,1 (42,0-51,5)	44,8 (34,3-61,0)	0,75	20,3 (16,4-21,2)	22,1 (21,3-23,8)	0,33	42,2 (29,8-50,4)	46,3 (43,1-50,5)	0,51
	10 ⁶ /мл	2,2 (1,6-2,4)	1,8 (1,6-2,1)	0,80	1,1 (1,0-1,1)	1,1 (1,0-1,3)	0,60	0,4 (0,3-0,5)	0,4 (0,3-0,5)	0,62	2,7 (1,9-3,1)	2,1 (1,6-2,3)	0,31
Цитотоксические Т-лимфоциты (CD3+CD8a+)	% от Т-лимфоцитов	40,8 (31,8-49,3)	69,5 (63,5-76,1)	0,05	52,7 (47,7-57,2)	53,6 (37,8-62,9)	0,75	76,6 (74,0-82,6)	73,8 (69,4-76,8)	0,62	54,6 (46,3-67,7)	52,9 (46,2-54,6)	0,66
	10 ⁶ /мл	1,2 (1,0-1,8)	5,6 (3,0-5,9)	0,03	1,5 (1,0-1,7)	1,2 (1,2-1,2)	0,75	1,3 (0,8-2,0)	1,4 (0,9-1,7)	0,62	3,0 (2,5-4,1)	2,4 (1,5-3,0)	0,19
Регуляторные Т-лимфоциты (CD4+CD25+ FOXP3+)	% от Т-хелперов	2,1 (2,05-2,4)	1,8 (1,5-2,7)	0,62	1,0 (0,8-1,3)	1,2 (0,6-1,2)	0,92	0,7 (0,5-0,7)	1,1 (1,0-1,2)	0,39	2,2 (1,5-2,7)	1,9 (0,9-2,1)	0,34
	10 ⁶ /мл	0,05 (0,03-0,06)	0,05 (0,02-0,05)	0,81	0,009 (0,006-0,01)	0,01 (0,007-0,01)	0,75	0,003 (0,002-0,005)	0,006 (0,004-0,006)	0,14	0,05 (0,03-0,09)	0,03 (0,01-0,05)	0,24

Таблица 57 (продолжение)

Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС, Ме (25%; 75%). p – статистическая значимость различий между высокоустойчивыми и низкоустойчивыми к гипоксии крысами Вистар, критерий Манна-Уитни

Группа наблюдения		Контрольные			Время после введения ЛПС в дозе 1,5 мг/кг								
					3 ч			6 ч			24 ч		
		(1)	(2)	p (1-2)	(3)	(4)	p (3-4)	(5)	(6)	p (5-6)	(7)	(8)	p (7-8)
		ВУ n=5	НУ n=5		ВУ n=5	НУ n=5		ВУ n=5	НУ n=5		ВУ n=8	НУ n=5	
В-лимфоциты (CD45R+)	% от лимфоцитов	25,3 (19,4- 27,8)	17,1 (13,2- 20,2)	0,09	14,5 (5,9- 15,3)	6,4 (4,9-8,6)	0,33	9,3 (5,6- 11,5)	10,1 (8,9-10,5)	0,88	20,8 (19,5- 22,0)	25,2 (25,2- 27,7)	0,03
	10 ⁶ /мл	2,3 (1,8-2,6)	2,2 (1,9-2,9)	0,81	0,6 (0,3-0,9)	0,3 (0,2-0,5)	0,05	0,7 (0,3-0,8)	0,5 (0,4-0,5)	0,65	2,6 (2,1-3,8)	2,3 (2,2-2,7)	0,88
NK (CD314+)	% от лимфоцитов	8,6 (8,3- 12,7)	15,4 (15,4- 22,1)	0,33	15,6 (11,6- 19,9)	9,6 (6,5- 13,4)	0,14	29,6 (26,0- 37,1)	28,8 (26,1- 30,2)	0,65	27,3 (15,8- 30,7)	17,6 (16,7- 18,1)	0,56
	10 ⁶ /мл	0,78 (0,78- 1,2)	2,2 (1,7-2,5)	0,03	0,7 (0,6-1,2)	0,5 (0,3-0,6)	0,09	1,4 (1,3-2,1)	1,5 (1,0-1,7)	0,65	2,6 (2,1-3,5)	2,0 (1,2-2,0)	0,04

Таблица 58

Достигнутая значимость различий (p) показателей абсолютного числа Т-лимфоцитов, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и регуляторных Т-лимфоцитов в периферической крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС (критерии Крускала-Уоллиса и Данна)

Показатели	Высокоустойчивые					Низкоустойчивые			
		Контроль	3 ч ЛПС	6 ч ЛПС	24 ч ЛПС	Контроль	3 ч ЛПС	6 ч ЛПС	24 ч ЛПС
Т-лимфоциты (CD3+)	Контроль	-	1,000	1,000	0,470	-	0,072	0,004	1,000
	3 ч ЛПС	1,000	-	1,000	0,023	0,072	-	1,000	0,523
	6 ч ЛПС	1,000	1,000	-	0,038	0,004	1,000	-	0,053
	24 ч ЛПС	0,470	0,023	0,038	-	1,000	0,523	0,053	-
Т-хелперы (CD3+CD4+)	Контроль	-	0,619	0,138	1,000	-	0,988	0,017	1,000
	3 ч ЛПС	0,619	-	1,000	0,063	0,988	-	0,653	0,653
	6 ч ЛПС	0,138	1,000	-	0,005	0,017	0,653	-	0,008
	24 ч ЛПС	1,000	0,063	0,005	-	1,000	0,653	0,008	-
Цитотоксические Т-лимфоциты (CD3+CD8a+)	Контроль	-	1,000	1,000	0,130	-	0,038	0,072	1,000
	3 ч ЛПС	1,000	-	1,000	0,085	0,038	-	1,000	0,368
	6 ч ЛПС	1,000	1,000	-	0,296	0,072	1,000	-	0,585
	24 ч ЛПС	0,130	0,085	0,296	-	1,000	0,368	0,585	-
В-лимфоциты (CD45R+)	Контроль	-	0,213	0,316	1,000	-	0,041	0,110	1,000
	3 ч ЛПС	0,213	-	1,000	0,009	0,041	-	1,000	0,025
	6 ч ЛПС	0,316	1,000	-	0,023	0,110	1,000	-	0,069
	24 ч ЛПС	1,000	0,009	0,023	-	1,000	0,025	0,069	-
Регуляторные Т-лимфоциты (CD4+CD25+ FOXP3+)	Контроль	-	0,267	0,042	1,000	-	0,223	0,010	1,000
	3 ч ЛПС	0,267	-	1,000	0,046	0,223	-	1,000	0,585
	6 ч ЛПС	0,042	1,000	-	0,003	0,010	1,000	-	0,038
	24 ч ЛПС	1,000	0,046	0,003	-	1,000	0,585	0,038	-

Достигнутая значимость различий (p) показателей абсолютного числа НК клеток (CD314+) в периферической крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС (критерии Крускала-Уоллиса и Данна)

Высокоустойчивые					Низкоустойчивые			
	Контроль	3 ч ЛПС	6 ч ЛПС	24 ч ЛПС	Контроль	3 ч ЛПС	6 ч ЛПС	24 ч ЛПС
Контроль	-	1,000	0,831	0,062	-	0,014	1,000	1,000
3 ч ЛПС	1,000	-	0,261	0,006	0,014	-	0,456	0,038
6 ч ЛПС	0,831	0,261	-	1,000	1,000	0,456	-	1,000
24 ч ЛПС	0,062	0,006	1,000	-	1,000	0,038	1,000	-

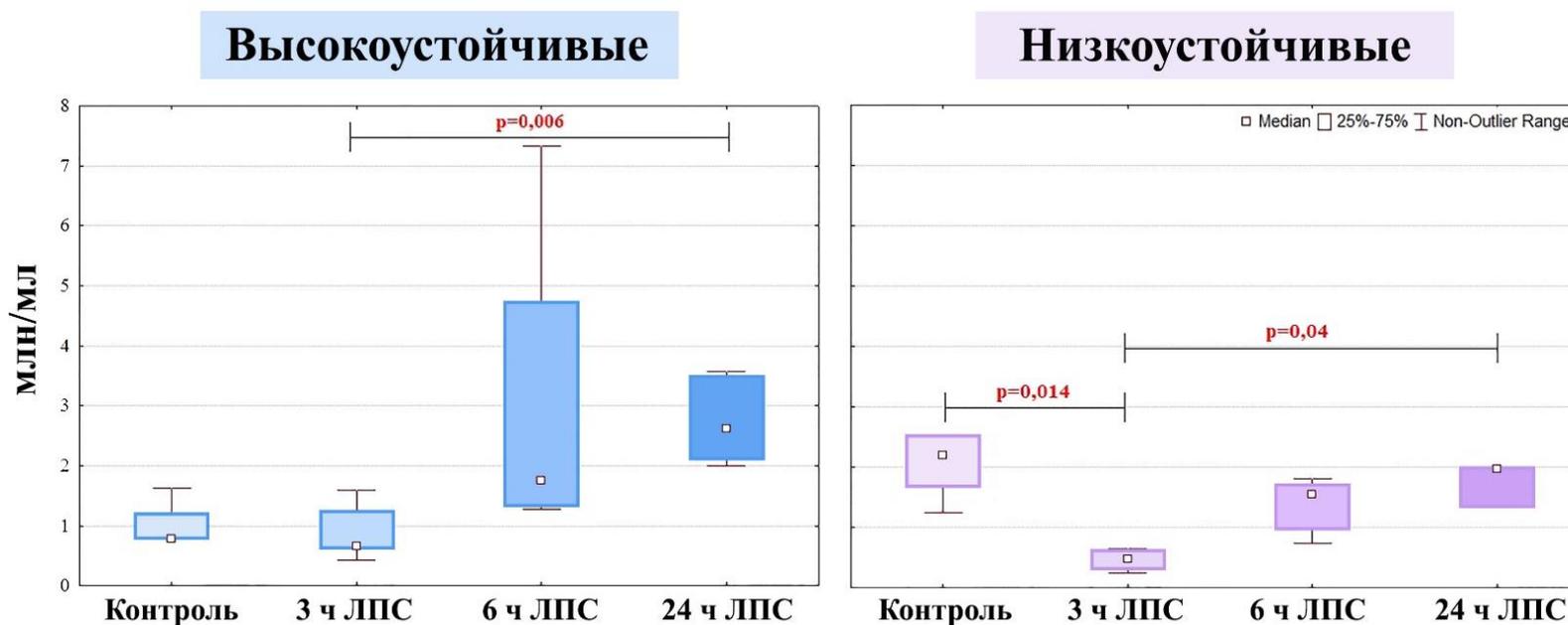


Рис. 50. Абсолютное число НК клеток (CD314+) в периферической крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и в разные сроки (3, 6 и 24 ч) после введения ЛПС, Me (25%; 75%). p – статистическая значимость различий, критерии Крускала-Уоллиса и Данна

Таблица 60

Достигнутая значимость различий (р) показателей относительного количества Т-лимфоцитов, Т-хелперов, НК клеток и регуляторных Т-лимфоцитов в периферической крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС (критерии Крускала-Уоллиса и Данна)

Показатели	Высокоустойчивые					Низкоустойчивые			
		Контроль	3 ч ЛПС	6 ч ЛПС	24 ч ЛПС	Контроль	3 ч ЛПС	6 ч ЛПС	24 ч ЛПС
Т-лимфоциты (CD3+)	Контроль	-	1,000	1,000	0,741	-	1,000	1,000	1,000
	3 ч ЛПС	1,000	-	1,000	1,000	1,000	-	0,368	1,000
	6 ч ЛПС	1,000	1,000	-	1,000	1,000	0,368	-	1,000
	24 ч ЛПС	0,741	1,000	1,000	-	1,000	1,000	1,000	-
Т-хелперы (CD3+CD4+)	Контроль	-	1,000	0,019	0,943	-	0,807	1,000	1,000
	3 ч ЛПС	1,000	-	0,365	1,000	0,807	-	0,149	1,000
	6 ч ЛПС	0,019	0,365	-	0,311	1,000	0,149	-	0,253
	24 ч ЛПС	0,943	1,000	0,311	-	1,000	1,000	0,253	-
НК клетки (CD314+)	Контроль	-	1,000	0,026	0,117	-	0,962	0,170	1,000
	3 ч ЛПС	1,000	-	0,144	0,615	0,962	-	0,003	0,179
	6 ч ЛПС	0,026	0,144	-	1,000	0,170	0,003	-	1,000
	24 ч ЛПС	0,117	0,615	1,000	-	1,000	0,179	1,000	-
Регуляторные Т-лимфоциты (CD4+CD25+ FOXP3+)	Контроль	-	0,243	0,113	1,000	-	0,585	0,988	1,000
	3 ч ЛПС	0,243	-	1,000	0,163	0,585	-	1,000	1,000
	6 ч ЛПС	0,113	1,000	-	0,063	0,988	1,000	-	1,000
	24 ч ЛПС	1,000	0,163	0,063	-	1,000	1,000	1,000	-

Таблица 61

Достигнутая значимость различий (p) показателей относительного количества цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3+CD8a+) в периферической крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС (критерии Крускала-Уоллиса и Данна)

	Высокоустойчивые				Низкоустойчивые			
	Контроль	3 ч ЛПС	6 ч ЛПС	24 ч ЛПС	Контроль	3 ч ЛПС	6 ч ЛПС	24 ч ЛПС
Контроль	-	1,000	0,021	1,000	-	0,466	1,000	0,988
3 ч ЛПС	1,000	-	0,587	1,000	0,466	-	0,253	1,000
6 ч ЛПС	0,021	0,587	-	0,207	1,000	0,253	-	0,585
24 ч ЛПС	1,000	1,000	0,207	-	0,988	1,000	0,585	-

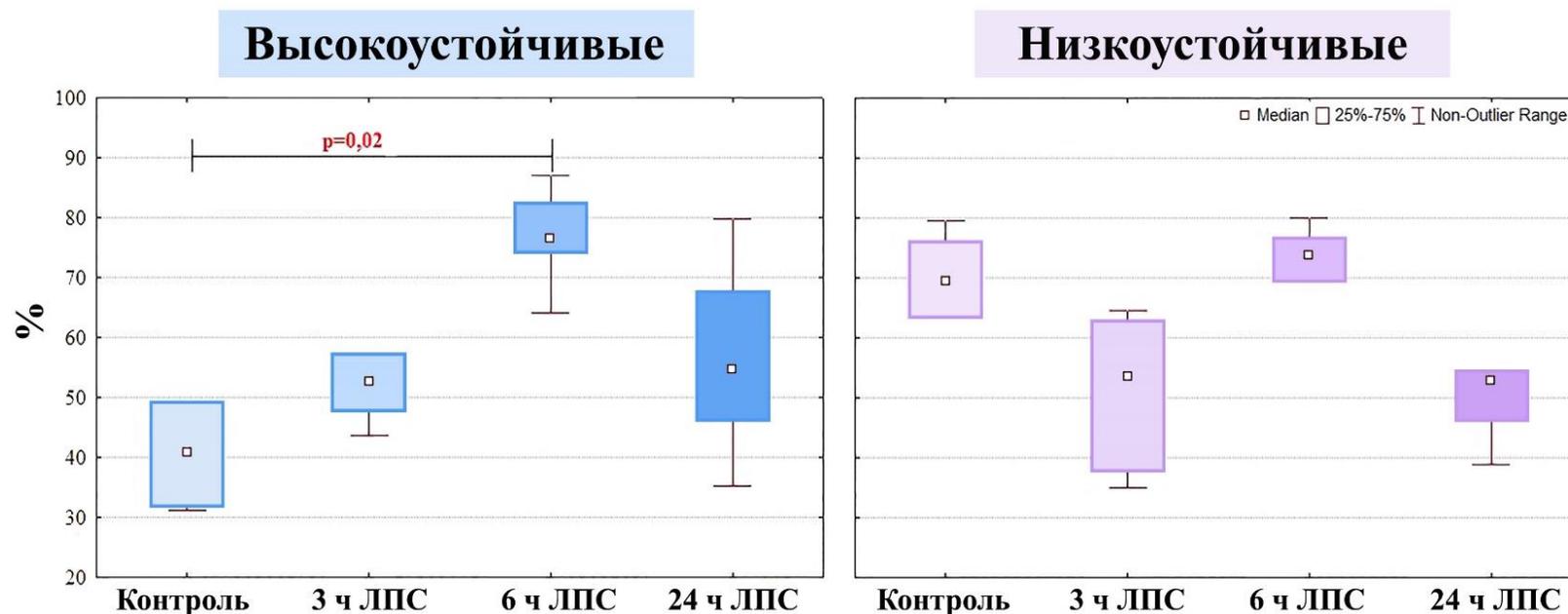


Рис. 51. Относительное количество цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3+CD8a+) в периферической крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и в разные сроки (3, 6 и 24 ч) после введения ЛПС, Me (25%; 75%). p – статистическая значимость различий, критерии Крускала-Уоллиса и Данна

Достигнутая значимость различий (p) показателей относительного количества В-лимфоцитов (CD45R+) в периферической крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и через 3, 6 и 24 ч после введения ЛПС (критерии Крускала-Уоллиса и Данна)

	Высокоустойчивые				Низкоустойчивые			
	Контроль	3 ч ЛПС	6 ч ЛПС	24 ч ЛПС	Контроль	3 ч ЛПС	6 ч ЛПС	24 ч ЛПС
Контроль	-	0,091	0,026	1,000	-	0,291	1,000	0,619
3 ч ЛПС	0,091	-	1,000	0,120	0,291	-	1,000	0,003
6 ч ЛПС	0,026	1,000	-	0,031	1,000	1,000	-	0,025
24 ч ЛПС	1,000	0,120	0,031	-	0,619	0,003	0,025	-

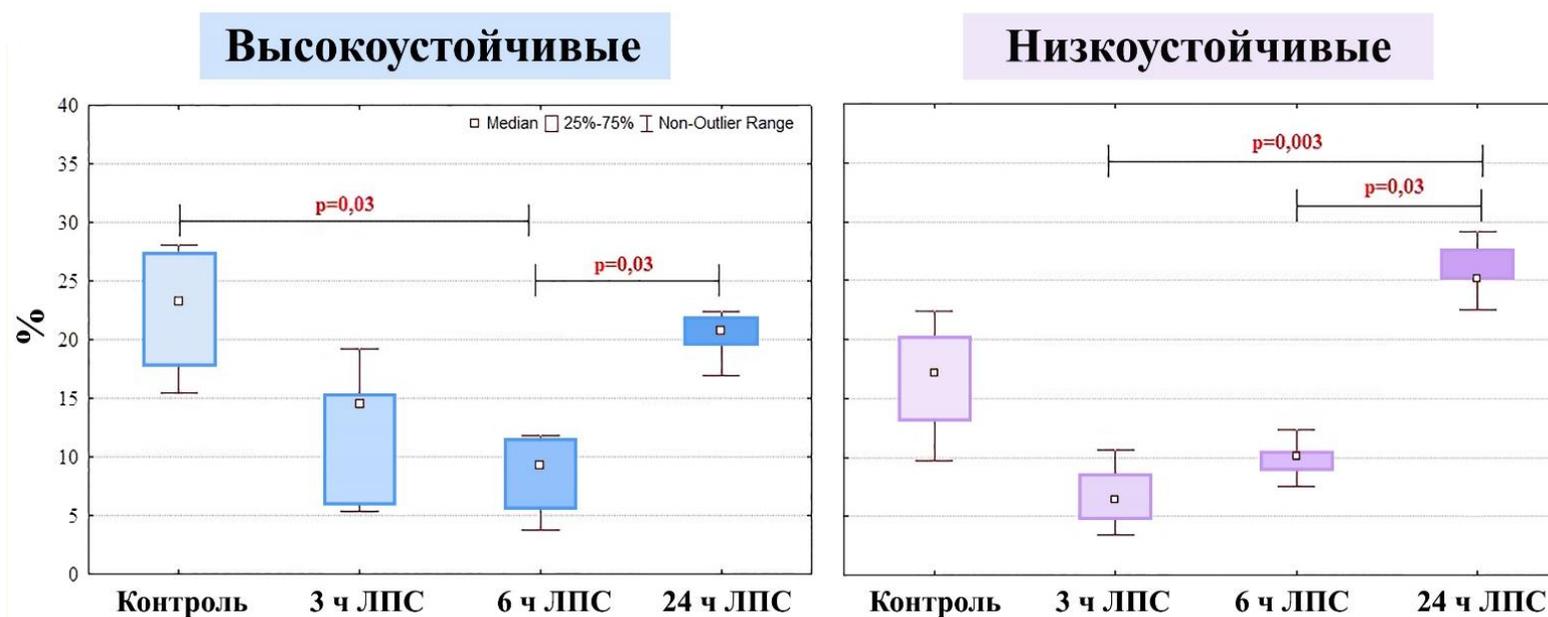


Рис. 52. Относительное количество В-лимфоцитов (CD45R+) в периферической крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс (n=43) контрольных групп и в разные сроки (3, 6 и 24 ч) после введения ЛПС, Me (25%; 75%). p – статистическая значимость различий, критерии Крускала-Уоллиса и Данна

3.5.7 Содержание гранулоцитов в периферической крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар контрольных групп и через 24 ч после введения ЛПС

Относительное и абсолютное число гранулоцитов периферической крови между высокоустойчивыми и низкоустойчивыми к гипоксии крысами контрольных и опытных групп не различалось.

Через сутки после введения ЛПС только у высокоустойчивых к гипоксии животных происходило статистически значимое повышение относительного числа гранулоцитов в крови (табл. 63).

Таблица 63

Относительное и абсолютное число гранулоцитов в периферической крови у высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии крыс (n=23) контрольных групп и через 24 ч после введения ЛПС (ВУ ЛПС, НУ ЛПС), Ме (25%; 75%). p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Параметры	Группа	Контрольные (1)	24 ч ЛПС (2)	p (1-2)
% гранулоцитов	ВУ (n=13)	15,3 (13,3-25,5)	40,9 (36,0-42,9)	0,01
	НУ (n=10)	21,1 (19,6-23,2)	33,0 (22,1-43,3)	0,07
	p	0,28	0,42	
Гранулоциты, млн/мл	ВУ (n=13)	3,3 (2,9-6,9)	7,7 (5,9-8,3)	0,33
	НУ (n=10)	4,1 (2,9-4,4)	6,0 (2,5-9,1)	0,30
	p	0,67	0,66	

3.5.8 Определение фагоцитарной активности клеток периферической крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар контрольных групп и через 24 ч после введения ЛПС

Фагоцитарную активность характеризовали по фагоцитарному показателю – % клеток (нейтрофилов и моноцитов), участвующих в фагоцитозе, и индексу стимуляции – средней степени флуоресценции FITC-*E. coli* в фагоцитирующих клетках (Назаренко Г.И. и Кишкун А.А., 2006).

Показано, что в контрольной группе низкоустойчивых к гипоксии крыс фагоцитарный показатель был статистически значимо выше, чем у высокоустойчивых животных (рис. 53, А, табл. 64).

Через 24 ч после введения ЛПС фагоцитарный показатель был также выше у низкоустойчивых к гипоксии крыс по сравнению с высокоустойчивыми. По отношению к контрольным группам через 24 ч после введения ЛПС статистически значимых различий значений фагоцитарного показателя выявлено не было как у высокоустойчивых, так и низкоустойчивых к гипоксии крыс (табл. 64).

Индекс стимуляции фагоцитарной активности клеток периферической крови в контрольных группах высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии животных не различался (рис. 53, Б, табл. 64).

Однако через 24 ч после введения ЛПС только у низкоустойчивых к гипоксии крыс наблюдалось увеличение этого показателя, в то время как у высокоустойчивых животных изменений значения индекса стимуляции фагоцитарной активности обнаружено не было. При этом через 24 ч после введения ЛПС показатель был статистически значимо выше у низкоустойчивых к гипоксии животных по сравнению с высокоустойчивыми (табл. 64).

Фагоцитарный показатель и фагоцитарный индекс стимуляции клеток периферической крови у высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии крыс (n=23) контрольных групп и через 24 ч после введения ЛПС (ВУ ЛПС, НУ ЛПС), Me (25%; 75%). p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Параметры	Группа	Контрольные (1)	24 ч ЛПС (2)	p (1-2)
Фагоцитарный показатель, %	ВУ (n=13)	64,5 (49,0-71,5)	58,0 (40,0-70,0)	0,75
	НУ (n=10)	80,0 (78,0-84,0)	80,5 (76,5-87,0)	0,70
	p	0,03	0,01	
Фагоцитарный индекс стимуляции, усл.ед.	ВУ (n=13)	0,8 (0,7-1,4)	1,2 (1,0-2,2)	0,09
	НУ (n=10)	1,4 (0,9-2,1)	3,3 (1,6-4,8)	0,04
	p	0,20	0,04	

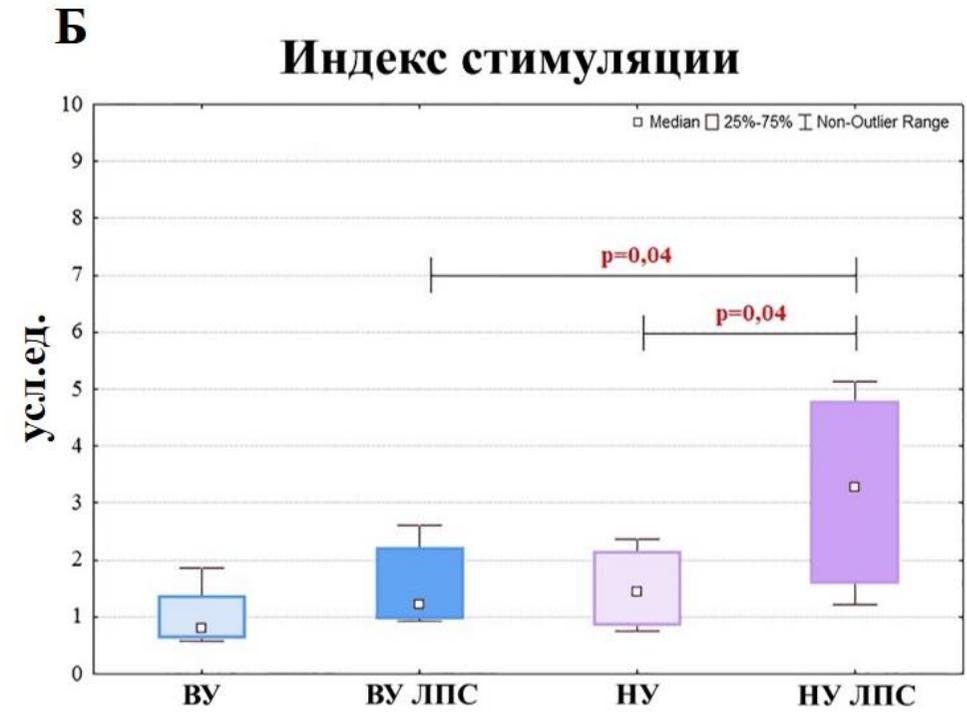
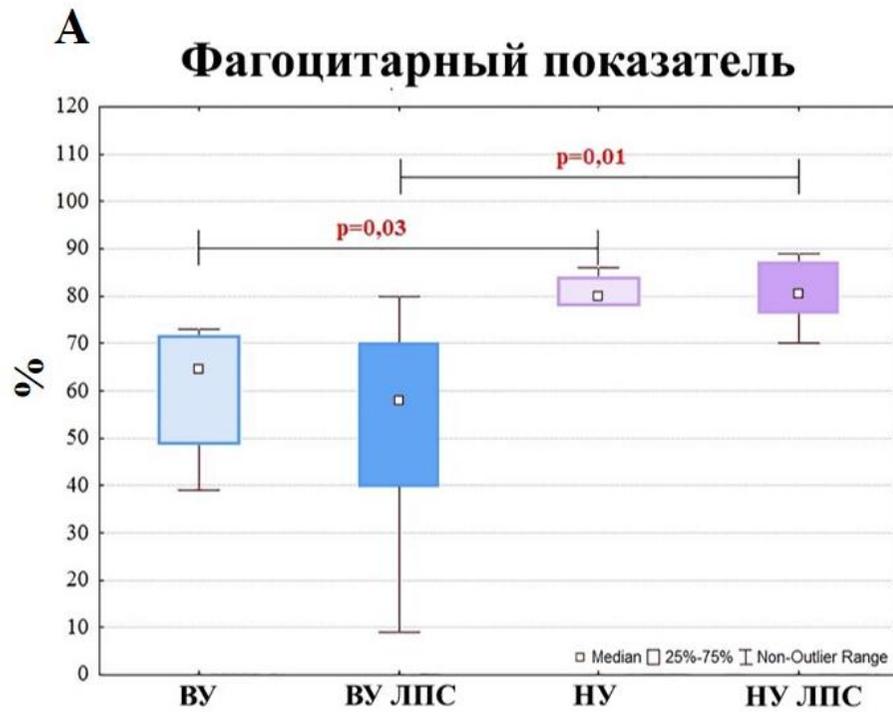


Рис. 53. Фагоцитарный показатель (А) и индекс стимуляции (Б) клеток периферической крови у высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии крыс (n=23) контрольных групп и через 24 ч после введения ЛПС (ВУ ЛПС, НУ ЛПС), Me (25%; 75%). p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

3.5.9 Содержание неоптерина в сыворотке крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар контрольных групп и через 24 ч после введения ЛПС

По данным ИФА, по сравнению с контрольной группой концентрация неоптерина в сыворотке крови снижалась через 24 ч после введения ЛПС только у низкоустойчивых к гипоксии крыс (рис. 54, табл. 65). Статистически значимых различий показателей содержания неоптерина между высокоустойчивыми и низкоустойчивыми к гипоксии животными контрольных и опытных групп выявлено не было (табл. 65).

Содержание неоптерина в сыворотке крови у высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии крыс (n=23) контрольных групп и через 24 ч после введения ЛПС, Me (25%;75%). p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Группа наблюдения	Контрольные			Через 24 ч после введения ЛПС в дозе 1,5 мг/кг			p	
	(1)	(2)	p (1-2)	(3)	(4)	p (3-4)	(1-3)	(2-4)
	ВУ n=5	НУ n=5		ВУ n=8	НУ n=5			
Неоптерин, нмоль/л	1,91 (1,70-1,96)	2,15 (1,94-2,60)	0,12	1,85 (1,64-2,03)	1,76 (1,65-1,87)	0,94	0,66	0,04

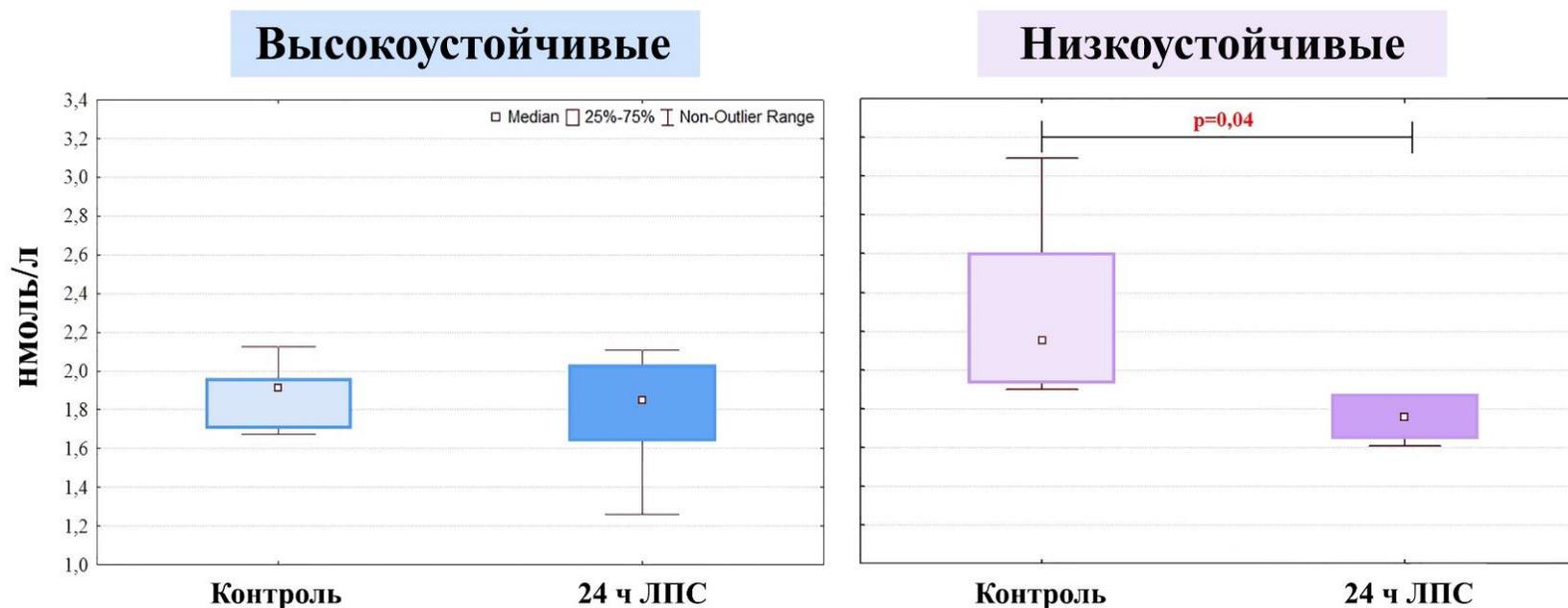


Рис. 54. Содержание неоптерина в сыворотке крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс (n=23) контрольных групп и через 24 ч после введения ЛПС, Me (25%;75%). p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Таким образом, в разные сроки после введения ЛПС у низкоустойчивых к гипоксии крыс происходит быстрое и выраженное повышение уровня эндотоксина, увеличивается экспрессия генов *Hif-1 α* и *Nf- κ b* в печени, содержание IL-1 β и С-реактивного белка в сыворотке крови, что сопровождается повышенной инфильтрацией нейтрофилов в легких, а также большей площадью некрозов в печени по сравнению с высокоустойчивыми животными. У низкоустойчивых к гипоксии крыс наблюдается расширение светлых центров лимфоидных узелков селезенки, повышение числа В-лимфоцитов в периферической крови, концентрации кортикостерона и снижение содержания неоптерина в сыворотке крови.

У высокоустойчивых к гипоксии животных повышение уровня эндотоксина в сыворотке крови менее выражено, отсутствует статистически значимое увеличение экспрессии гена *Nf- κ b* в печени, не изменяются уровни продукции IL-1 β и С-реактивного белка в сыворотке крови. Содержание противовоспалительных цитокинов IL-10 и TGF- β снижается. У высокоустойчивых к гипоксии крыс выявлено сужение ПАЛМ-зоны селезенки, повышение числа НК клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов в периферической крови.

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

По данным литературы, индивидуальные различия реакции организма на гипоксическое воздействие определяются генотипическими и фенотипическими особенностями (Березовский В.А., 1978; Serebrovskaya T.V. и Xi L., 2012). О генетической детерминированности устойчивости к гипоксии свидетельствует существование многочисленных полиморфизмов генов, регулирующих продукцию индуцируемого гипоксией фактора *HIF-1 α* , фактора роста сосудистого эндотелия (*VEGF*), супероксиддисмутазы (*SOD2*) и других (Lorenzo V.F. et al., 2009; Kobayashi N. et al., 2013; De Carvalho Fraga C.A. et al., 2013; Strauss E. et al., 2015; Koyasu S. et al., 2018). Зависимость устойчивости к гипоксии от некоторых внешних факторов подтверждается рядом работ, в которых показано существование суточной и сезонной ритмичности чувствительности к недостатку кислорода (Рафиков А.М. и Агаджанян Н.А., 1971; Чернобаева Г.Н. и Лукьянова Л.Д., 1989; Kwarecki K. et al., 1984; Masukawa T. и Tochino Y., 1993). Показано также наличие взаимосвязи между гипоксией и воспалением: ключевой транскрипционный фактор, активирующийся при недостатке кислорода – *HIF-1 α* , взаимосвязан с ядерным фактором *NF- κ B*, регулирующим воспалительные процессы (Kiers H.D. et al., 2016; Taylor C.T. и Colgan S.P., 2017; Fratantonio D. et al., 2018; Krzywinska E. и Stockmann C., 2018; Stothers C.L. et al., 2018). Гипоксия может инициировать развитие воспаления, в то же время любой воспалительный процесс, особенно с выраженными системными проявлениями, сопровождается кислородной недостаточностью, обусловленной, главным образом, нарушениями микроциркуляции и диссеминированным внутрисосудистым свертыванием (Муздубаева Б.Т., 2016; Cinel I. и Orpal S.M., 2009). В связи с этим в отдельных исследованиях показано, что тяжесть течения сепсиса зависит от устойчивости к гипоксии, при этом повышение продукции *HIF-1 α* способствует увеличению содержания в сыворотке крови провоспалительных цитокинов (*IL-1 β* , *TNF α*), высокой смертности животных и рассматривается как неблагоприятный фактор (Косырева А.М. и соавт., 2018; Peyssonnaud C. et al., 2007; Holley H.S. et al., 2012; Textoris J. et al., 2012).

Данные о молекулярно-биологических и биохимических параметрах у животных, отличающихся по устойчивости к гипоксии, противоречивы, и исследования выполнены на разных линиях крыс, что затрудняет возможность их сравнительной оценки. По сравнению с высокоустойчивыми у низкоустойчивых к недостатку кислорода животных после гипоксического воздействия выше уровень окислительного повреждения клеток, что может определять их предрасположенность к развитию воспалительных заболеваний. Однако сведения о молекулярно-биологических и биохимических особенностях системной воспалительной реакции у животных с разной устойчивостью к гипоксии в литературе не представлены. Вместе с тем, представляется актуальным выявить особенности течения инфекционно-воспалительных

заболеваний с учетом устойчивости к гипоксии, поскольку вариабельность реакции на недостаток кислорода широко известна и для человека. В то же время такие различия не учитываются при терапии воспалительных процессов, что зачастую ухудшает прогноз и исход заболевания.

В соответствии с этим, целью настоящей работы было охарактеризовать морфологические и молекулярно-биологические особенности индуцированной введением ЛПС системной воспалительной реакции у половозрелых самцов крыс с разной устойчивостью к гипоксии.

В работе изучена взаимосвязь устойчивости к гипоксии и инфрадианного биоритма содержания кортикостерона, охарактеризована динамика молекулярно-биологических и биохимических параметров у высокоустойчивых и низкоустойчивых к недостатку кислорода крыс в разные сроки после гипоксического воздействия. Проведено сравнительное исследование морфологических изменений легких, печени, лимфоидных органов и молекулярно-биологических и иммунологических особенностей у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар через один месяц после определения устойчивости к недостатку кислорода. Изучена динамика морфологических, молекулярно-биологических и биохимических особенностей системной воспалительной и иммунных реакций у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС.

4.1 Взаимосвязь устойчивости к гипоксии крыс Вистар и Спрейг-Доули и 4-суточного биоритма изменений концентрации кортикостерона в сыворотке крови

Устойчивость организма к дефициту кислорода зависит как от генетических, так и от фенотипических свойств: характера энергетического обмена, особенностей регуляторных механизмов и способности приспосабливаться к гипоксическим условиям, сохраняя жизнеспособность особи. Индивидуальные особенности реакции организма на гипоксию играют существенную роль в развитии, течении и исходе возникающего при этом патологического состояния (Лукьянова Л.Д., 2003). Помимо индивидуальных особенностей, на устойчивость к недостатку O_2 может влиять множество факторов, таких как: прием лекарственных препаратов, курение, сердечно-сосудистые заболевания и болезни легких, сопровождающиеся развитием хронической гипоксии (в частности, гипоксия при хронической обструктивной болезни легких), а также исходный уровень метаболизма. Установлена взаимосвязь устойчивости к гипоксии и метаболических процессов, активность которых во многом определяется функциональным состоянием щитовидной железы (Грек О.Р. и соавт., 2007). Известно, что существует суточная и сезонная ритмичность устойчивости к гипоксии (Рафиков А.М. и Агаджанян Н.А., 1971; Kwarecki K. et al., 1984; Чернобаева Г.Н. и Лукьянова Л.Д., 1989; Masukawa T. и Tochino Y., 1993).

Гипоксическое воздействие является стрессовым фактором и приводит к активации симпатoadреналовой и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой систем (Меерсон Ф.З., 1993; Кубасов Р.В., 2014; Sapolsky R.M. et al., 2000; Elenkov I.J. и Chrousos G.P., 2006; de Kloet E.R., 2016). Активация продукции катехоламинов влияет на обмен веществ и энергии и формирует процессы кратковременной адаптации, а высокая продукция глюкокортикоидов способствует становлению долговременной адаптации (Меерсон Ф.З., 1993). При стрессорных воздействиях глюкокортикоиды обеспечивают мобилизацию энергетических ресурсов, стабилизацию клеточных мембран и снижение уровня перекисного окисления липидов, мощный противовоспалительный эффект и усиление эритропоза, что способствует адаптации (Кубасов Р.В., 2014; Sapolsky R.M. et al., 2000). В системе *in vitro* установлено, что глюкокортикоиды увеличивают экспрессию HIF-1 α -зависимых генов, ответственных за развитие адаптационных механизмов в ответ на гипоксию (Kodama T. et al., 2003). Показано, что профилактическое назначение синтетических аналогов глюкокортикоидов при кислородной недостаточности предотвращает развитие горной болезни (Johnson T.S. et al., 1984). А.М. Рафиковым и Н.А. Агаджаняном (1971) установлено, что преднизолон повышает устойчивость животных к острой гипоксии на фоне низкого суточного уровня кортикостерона. Ранее у млекопитающих и птиц М.Е. Диатроповым и соавт. (2014) был установлен инфрадианный 4-суточный биоритм

концентрации глюкокортикоидных гормонов и связанные с ним колебания ряда физиологических показателей: митотического индекса эпителия пищевода, двигательной активности, субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови, морфофункционального состояния селезенки и тимуса. По данным Д.Ш. Джалиловой и соавт. (2018), в акрофазу 4-суточного биоритма концентрации кортикостерона устойчивость крыс Вистар к диссоциативному анестетику выше, чем в батифазу. Кроме того, показано, что выраженность системной ЛПС-индуцированной воспалительной реакции зависит от инфрадианного 4-суточного биоритма концентрации кортикостерона в сыворотке крови: проявления системной воспалительной реакции более выражены при введении ЛПС за сутки до батифазы биоритма (Диатроптов М.Е. и соавт., 2013). В отдельных исследованиях установлено, что тяжесть течения сепсиса также зависит от устойчивости к гипоксии (Косырева А.М. и соавт., 2018; Holley H.S. et al., 2012). Однако данные по изменению чувствительности организма к гипоксии в зависимости от фазы 4-суточного биоритма кортикостерона в литературе отсутствуют.

Ранее было показано, что крысы Вистар более устойчивы к гипоксическому воздействию, чем крысы линии Спрейг-Доули (Макарова О.В., 1997; Макарова О.В. и соавт., 2012). В нашей работе как на крысах Вистар, так и Спрейг-Доули установлено, что устойчивость к гипоксии зависит от фазы 4-суточного биоритма концентрации кортикостерона, а именно: в акрофазу время жизни крыс на критической «высоте» больше, чем в батифазу (рис. 55). При однократном определении устойчивости к недостатку кислорода самцов крыс Вистар показатели времени жизни на «высоте» в акрофазу были в 2,6 раза выше, чем в батифазу, в то время как при многократном ежедневном тестировании – в 1,5 раза. Уменьшение различий значений показателей времени жизни на «высоте» в акрофазу и батифазу при многократном определении устойчивости к гипоксии, вероятно, связано с адаптацией: среднее значение времени жизни животных увеличивается от 42 до 60 сек. Несмотря на адаптационный процесс, 4-суточная ритмичность показателей времени жизни сохранялась. При этом среди крыс выявлена одна особь, которая характеризовалась значительно большим увеличением показателя времени жизни – от 60 до 520 сек, что, вероятно, связано с высоким адаптационным резервом. Напротив, у одной крысы наблюдался процесс дизадаптации – время жизни на «высоте» к концу эксперимента уменьшалось от 50 до 22 сек. В нашей работе эти две крысы отличались по исходному времени жизни на 10 сек, что позволяет отнести их к близкой по устойчивости к гипоксии группе, однако к концу эксперимента показатели различались в 23,6 раза. Эти данные согласуются с результатами работы Н.А. Агаджаняна и соавт. (1999), в которой предполагается различная способность к адаптации у животных, относящихся к одной группе устойчивости. Вероятно,

такие различия могут быть обусловлены вариациями в экспрессии гена *Hif-1α*, обеспечивающего реакцию на гипоксическое воздействие, а также его полиморфизмами.

При многократном определении чувствительности к гипоксии крыс Вистар выявлены синфазные 4-суточные колебания устойчивости к недостатку кислорода и концентрации кортикостерона в сыворотке крови. При максимальной концентрации кортикостерона в крови в акрофазу время жизни на «высоте» было также максимальным, а при минимальном содержании кортикостерона в батифазу – минимальным. Таким образом, нами впервые выявлена зависимость устойчивости к гипоксии от 4-суточного биоритма концентрации кортикостерона.

По результатам экспериментов на крысах Спрейг-Доули (рис. 55) оказалось, что при определении устойчивости к гипоксии в акрофазу инфрадианного 4-суточного биоритма кортикостерона количество высокоустойчивых животных больше (66%), чем низкоустойчивых (11%), тогда как при тестировании этих же крыс через месяц в батифазу биоритма число высокоустойчивых животных меньше (33%), а низкоустойчивых – больше (55%).

4-суточный биоритм содержания кортикостерона

	А К Р О Ф А З А	Б А Т И Ф А З А
	Содержание кортикостерона больше	Содержание кортикостерона меньше
Крысы Вистар	Большее время жизни в барокамере 67 (57–102) сек	Меньшее время жизни в барокамере 26 (17–48) сек
Крысы Спрейг-Доули	Переход от НУ к ВУ ВУ (66%) > НУ (11%)	Переход от ВУ к НУ ВУ (33%) < НУ (55%)

Рис. 55. Схема. Взаимосвязь устойчивости к гипоксии и 4-суточного биоритма содержания кортикостерона в сыворотке крови

По нашим данным, в батифазу 4-суточного биоритма среднеустойчивые особи могут становиться низкоустойчивыми, а часть высокоустойчивых – среднеустойчивыми и даже низкоустойчивыми. Эти данные согласуются с исследованием Н.А. Агаджаняна и соавт. (1999), в котором при повторном тестировании в отдаленные сроки (до 39 суток) исходная устойчивость к гипоксии обнаружена у 79% высокоустойчивых, только у 33% среднеустойчивых и 41% низкоустойчивых крыс, то есть исходно однородные по типу устойчивости к дефициту O_2 группы крыс при повторном тестировании оказались смешанными. Авторы связывают это с различной способностью к адаптации даже у животных одной группы устойчивости (Агаджанян Н.А. и

соавт., 1999). Как упоминалось выше, Березовским В.А. еще в 1978 г. показано, что при повторном (через 2-3 недели после первого) помещении крыс Вистар на «высоту» 12000 м над уровнем моря доля животных, которые стабильно воспроизводят принадлежность к ВУ или НУ группе, значительно уменьшается. После первого гипоксического воздействия структура распределения ВУ-СУ-НУ животных составляла соответственно 26-47-27%, а после второго она изменялась до 15-69-16%. При этом происходило уменьшение количества ВУ и НУ животных за счет перехода части из них в СУ группу (Березовский В.А., 1978). Результаты третьего испытания (через 2-3 недели после второго) практически не изменяли соотношения численности групп. Авторы связывали это с устранением при двукратном испытании из групп высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии животных случайных среднеустойчивых особей, однократно проявивших «в силу неучтенных обстоятельств опыта» признаки высокоустойчивых или низкоустойчивых (Березовский В.А., 1978). Возможно, эти результаты объясняются не только способностью крыс адаптироваться после первого гипоксического воздействия, но и определяются календарной датой, когда проводилось тестирование – акрофазой или батифазой 4-суточного биоритма кортикостерона.

Методика определения устойчивости к гипоксии различных лабораторных животных была описана еще в прошлом веке (Березовский В.А., 1978; Чернобаева Г.Н. и Лукьянова Л.Д., 1989; Bhatia V. et al., 1966; Kugimiya T. et al., 1984). Показано, что устойчивость к дефициту кислорода зависит от таких внешних факторов, как солнечная активность (Хачатурьян М.Л., 2012), а также варьирует в разное время суток и сезоны года (Чернобаева Г.Н. и Лукьянова Л.Д., 1989; Masukawa T. и Tochino Y., 1993). Установлена суточная ритмичность чувствительности к недостатку кислорода: в условиях гипобарической гипоксии в темное время суток время жизни животных меньше, чем в дневное (Рафиков А.М. и Агаджанян Н.А., 1971; Kwarecki K. et al., 1984; Masukawa T. и Tochino Y., 1993). На чувствительность к гипоксии оказывают влияние внутренние факторы: выявлена отрицательная зависимость устойчивости животных к дефициту O_2 от температуры тела и уровня глюкозы в крови (Masukawa T. и Tochino Y., 1993). Эти факторы учитываются при определении устойчивости к гипоксии в большинстве экспериментальных исследований. Однако зависимость чувствительности к кислородной недостаточности от фазы 4-суточного биоритма концентрации кортикостерона, выявленная нами впервые, ранее не учитывалась при определении устойчивости животных к недостатку кислорода в различных экспериментах, в том числе, при изучении терапевтической эффективности антигипоксантов. Нами установлен 4-суточный биоритм устойчивости крыс Вистар и Спрейг-Доули к гипоксии, синфазный с биоритмом кортикостерона. В период акрофазы инфрадианного 4-суточного биоритма кортикостерона время жизни животных на «высоте» выше, чем в период его батифазы, что было показано как на крысах Вистар, так и Спрейг-Доули, которые различаются по устойчивости к

гипоксии. При проведении исследований по определению чувствительности к дефициту O_2 необходимо учитывать существование 4-суточных колебаний этого показателя. В зависимости от поставленных задач, целесообразно проводить разделение животных на группы по устойчивости к гипоксии в определенную фазу 4-суточного биоритма, установить которую можно по содержанию кортикостерона в сыворотке крови. С целью выделения из популяции группы наименее устойчивых к гипоксии особей, определение следует проводить в период акрофазы инфрадианного 4-суточного биоритма, если необходимо выделить наиболее устойчивых – то в период батифазы. Для нивелирования ложного включения среднеустойчивых животных в группы высокоустойчивых и низкоустойчивых целесообразно проводить определение устойчивости к недостатку кислорода в дни между акрофазой и батифазой 4-суточного биоритма кортикостерона. В последующих экспериментах определение устойчивости к гипоксии мы проводили в промежуточные дни между батифазой и акрофазой инфрадианного биоритма кортикостерона, которые определяли по календарному методу, описанному М.Е. Диатроптовым и соавт. (2014).

4.2 Сравнительная характеристика динамики молекулярно-биологических и биохимических показателей у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс после гипоксического воздействия

По данным литературы, высокоустойчивые и низкоустойчивые к гипоксии животные после гипоксической нагрузки отличаются по многим параметрам, в том числе по содержанию белка HIF-1 α , уровню эндотелина – вазоконстриктора, продуцируемого эндотелием в ответ на гипоксический стресс, карбонилированных белков, норадреналина и пролактина (Кирова Ю.И. и соавт., 2012; Ghosh D. et al., 2012; Jain K. et al., 2013; 2014). К. Jain et al. (2013) показано, что в сердце крыс Спрейг-Доули «сразу» после (временной интервал в работе не указан) трехкратного определения устойчивости к гипоксии на «высоте» 9250 м содержание белка HIF-1 α возрастало и по сравнению с низкоустойчивыми животными было выше у высокоустойчивых. Ранее в исследованиях *in vitro* было выявлено, что экспрессия *Hif-1 α* в легких мышей повышалась в течение 30 мин после двухчасового воздействия острой нормобарической гипоксии, была максимальной через час после воздействия и возвращалась к исходному уровню через 4 ч. При этом содержание белка HIF-1 α возрастало в ответ на гипоксию через 30 мин и оставалось повышенным в течение 8 ч после гипоксического воздействия (Stroka D.M. et al., 2001; Blouin C.C et al., 2004; BelAiba R.S. et al., 2007).

В нашей работе у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар на «высоте» 11500 м над уровнем моря оценивали различия динамики реакции на острое гипоксическое воздействие. Через 5 и 90 мин после гипоксической нагрузки определяли уровни экспрессии *Hif-1 α* , *Nf- κ b* и *Vegf* в печени, содержание HIF-1 α , эритропоэтина, VEGF, TGF- β и 8-изопростана в сыворотке крови.

Методом ПЦР нами показано, что через 5 мин после критического гипоксического воздействия уровень экспрессии гена *Hif-1 α* в печени у высокоустойчивых крыс Вистар был значительно выше, чем у низкоустойчивых, а через 90 мин как у низкоустойчивых, так и у высокоустойчивых животных оставался повышенным. По результатам проведенного иммуноферментного анализа, также, как и при определении уровня экспрессии гена *Hif-1 α* в печени, выявлены различия в содержании белка HIF-1 α в сыворотке крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс через 5 и 90 мин после гипоксического воздействия (рис. 56). Через 5 мин после критического гипоксического воздействия у высокоустойчивых к гипоксии животных содержание белка HIF-1 α в сыворотке крови статистически значимо повышалось, а у низкоустойчивых – не изменялось. Через 90 мин после гипоксической нагрузки у высокоустойчивых к гипоксии крыс содержание белка HIF-1 α нормализовалось.

Таким образом, как у высокоустойчивых, так и у низкоустойчивых к гипоксии животных уровень экспрессии мРНК *Hif-1α* в печени повышался через 5 мин после воздействия, однако у высокоустойчивых показатель был выше, чем у низкоустойчивых. Содержание белка HIF-1α в сыворотке крови статистически значимо увеличивалось только у высокоустойчивых крыс, а через 90 мин – нормализовалось. Отсутствие увеличения содержания HIF-1α в сыворотке крови у низкоустойчивых к гипоксии крыс при повышенной экспрессии его гена в печени может быть обусловлено недостаточностью систем синтеза белка и его пост-трансляционными модификациями.

Повышение уровня экспрессии мРНК и содержания белка HIF-1α после гипоксического воздействия у высокоустойчивых к гипоксии крыс Вистар, по-видимому, способствует их быстрой и более эффективной острой адаптации к недостатку кислорода, поскольку известно, что HIF-1 стимулирует синтез белков, вовлеченных в адаптивную реакцию: гликолитических ферментов, VEGF, а также эритропоэтина *de novo* в почках и печени (Fandrey J., 2004; Semenza G.L., 2007; Haase V.H., 2010; Cavadas M.A.S. et al., 2017). По данным литературы, адаптация к гипоксии была более эффективной у людей и животных с высоким уровнем экспрессии *Hif-1α* (Pialoux V. et al., 2009). У гетерозиготных нокаутных по HIF-1α мышей была снижена чувствительность каротидных телец к изменению парциального давления кислорода и адаптивный ответ на хроническую гипоксию (Kline D.D. et al., 2002). Жители высокогорья имеют более высокие уровни экспрессии *Hif-1α* и регулируемых им белков, включая эритропоэтин, что является приспособительной реакцией к недостатку O₂ (Rodriguez F.A. et al., 2000; Scheinfeldt L.V. et al., 2012). Показано, что острая гипобарическая гипоксия (5486 м) индуцирует более выраженную активацию HIF-1 в легких устойчивых к гипоксии крыс Хилтоп по сравнению с менее устойчивыми крысами Спрейг-Доули (Engebretsen B.J. et al., 2007).

HIF-1α стимулирует гликолиз и подавляет потребление кислорода митохондриями, регулирует экспрессию генов глюкозных переносчиков (Wenger R.H. et al., 2005; Papandreou I. et al., 2006; Cavadas M.A.S. et al., 2017). Ранее было показано, что усиленная экспрессия глюкозного переносчика GLUT1 наблюдается у высокоустойчивых к гипоксии крыс, что повышает их сопротивляемость к гипоксическому стрессу (Jain K. et al., 2013).

Известно, что при остром гипоксическом стрессе HIF-1α индуцирует ряд гематологических изменений, которые улучшают транспорт O₂ кровью и способствуют насыщению им тканей, в том числе через связывание отвечающих на гипоксию элементов (HREs) он активирует транскрипцию гена *Vegf* и эритропоэтина (Haase V.H., 2010; Cavadas M.A.S. et al., 2017; Suzuki N. et al., 2017). Нами обнаружено, что через 5 мин после гипоксического воздействия содержание в сыворотке крови ключевого фактора ангиогенеза VEGF статистически значимо возрастало как у высокоустойчивых, так и у низкоустойчивых животных (рис. 56), но у высокоустойчивых более

значительно – в 9 раз, в то время как у низкоустойчивых – только в 2,8 раза. Через 90 мин содержание VEGF нормализовалось. По нашим данным, через 5 мин после острого гипоксического воздействия содержание ключевого фактора эритропоэза – эритропоэтина в сыворотке крови было выше у высокоустойчивых к гипоксии крыс Вистар по сравнению с низкоустойчивыми. По данным литературы, уровень экспрессии эритропоэтина выше в сердце высокоустойчивых к недостатку кислорода крыс Спрейг-Доули сразу после гипоксического воздействия (Jain K. et al., 2013). Эритропоэтин оказывает кардиопротекторный эффект при ишемическом повреждении, в частности, при гипоксическом стрессе (Burger D. et al., 2009). По-видимому, высокоустойчивые крысы реализуют более быструю и эффективную стратегию ответа на гипоксическое воздействие, так как эритропоэтин и VEGF повышают оксигенацию тканей (Fandrey J., 2004).

Гипоксия сопровождается окислительным стрессом, характеризующимся повышением уровней АФК и дезорганизацией клеточных мембран, что приводит к образованию поврежденных молекул ДНК (Askew E.W., 2002; McGarry T. et al., 2018). Накопление этих молекул способствует активации NF-κB, синтезу провоспалительных цитокинов и хемокинов (Aguilera-Aguirre L. et al., 2014; Lee E.J. et al., 2017). Методом иммуноферментного анализа нами обнаружено, что только у низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар через 90 мин после гипоксического воздействия в сыворотке крови повышалось содержание 8-изопростана, который является маркером окислительного стресса (рис. 56). 8-изопростан образуется при свободнорадикальном окислении фосфолипидов клеточных мембран, и его концентрация увеличивается при различных заболеваниях, связанных с окислительным повреждением (Roberts L.J. и Morrow J.D., 2002). Таким образом, повышение содержания 8-изопростана в сыворотке крови у низкоустойчивых к гипоксии крыс свидетельствует об окислительном повреждении клеточных макромолекул у этих животных. В целом наши результаты согласуются с данными G. Padhy и соавт. (2013), которые показали, что содержание карбонилированных белков, характеризующих окислительный стресс, повышается в плазме крови у низкоустойчивых к гипоксии крыс Спрейг-Доули «сразу после» гипоксического воздействия более значительно, чем у высокоустойчивых. В сердце у низкоустойчивых к гипоксии крыс Спрейг-Доули также повышаются уровни АФК и малонового диальдегида (Jain K. et al., 2013). При этом обнаружено, что у высокоустойчивых к гипоксии крыс Спрейг-Доули в сердце выше активность ферментов антиоксидантной защиты: супероксиддисмутазы и каталазы (Jain K. et al., 2013). Эти данные согласуются с исследованиями жителей высокогорья: у них, по сравнению с людьми, живущими на равнинах, активность супероксиддисмутазы, способствующей защите от свободных радикалов, была выше (Sinha S. et al., 2009). Высокие уровни антиоксидантов у высокоустойчивых к недостатку кислорода животных способны ингибировать индуцированный

гипоксией окислительный стресс (Askew E.W., 2002). Более мощная антиоксидантная защита, которая существует у высокоустойчивых к гипоксии животных, предотвращает развитие окислительного стресса и воспалительных заболеваний.

Поскольку общеизвестно о взаимодействии молекулярных путей HIF-1 α и NF- κ B, и установлена тесная связь гипоксии и воспаления (Cummins E.P. et al., 2006; Rius J. et al., 2008; Krzywinska E. и Stockmann C., 2018), у крыс Вистар, отличающихся по устойчивости к гипоксии, мы исследовали уровень экспрессии гена *Nf- κ b*, регулирующего развитие воспалительных реакций. Нами обнаружено, что уровень экспрессии мРНК *Nf- κ b* в печени повышался через 5 мин после гипоксической нагрузки как у высокоустойчивых, так и у низкоустойчивых животных (рис. 56), но у высокоустойчивых показатель был выше по сравнению с низкоустойчивыми в 6,3 раза. Через 90 мин после гипоксического воздействия экспрессия гена *Nf- κ b* возвращалась к исходному уровню, однако у высокоустойчивых животных показатель был в 2,3 раза выше, чем у низкоустойчивых. Вероятно, более выраженное и длительное повышение экспрессии гена *Nf- κ b* у высокоустойчивых крыс связано с более значительным увеличением экспрессии и содержания HIF-1 α после гипоксического воздействия, поскольку известна их взаимосвязь и взаимное регулирование (Hirota K., 2015; Krzywinska E. и Stockmann C., 2018). При гипоксии активация HIF-1 α приводит к индукции NF- κ B посредством регуляции пролилгидроксилаз, которые обеспечивают чувствительность к O₂ этих двух путей и контролируют активность киназного комплекса, отвечающего за регуляцию активности NF- κ B (Cummins E.P. et al., 2006; Eltzschig H.K. и Carmeliet P., 2011).

По данным литературы, один из ключевых противовоспалительных факторов – TGF- β взаимосвязан как с HIF-1, так и с окислительным стрессом. HIF-1 α может инициировать транскрипцию TGF- β (Saed G. et al. 2002; Jiang Y. et al. 2007). Показано, что TGF- β также может активироваться в ответ на окислительный стресс, индуцируемый гипоксией (Cui Y. et al., 2011; Liu R.-M. и Desai L.P., 2015). Содержание фактора TGF- β в сыворотке крови через 5 мин после гипоксической нагрузки было статистически значимо выше у высокоустойчивых к гипоксии крыс по сравнению с низкоустойчивыми. Через 90 мин у высокоустойчивых к гипоксии крыс содержание TGF- β в сыворотке крови снижалось по сравнению с показателями через 5 мин после гипоксического воздействия, а у низкоустойчивых – повышалось (рис. 56). TGF- β может регулировать различные процессы в организме: клеточный рост, пролиферацию, миграцию, выживание, дифференцировку клеток, ангиогенез, воспалительные и иммунные реакции (Chambaz E.M. et al., 1996; Roberts A.B. 1998; Poniatowski L.A. et al., 2015). В нормальных эпителиальных клетках TGF- β действует как потенциальный опухолевый супрессор посредством регуляции множества физиологических процессов, включающих ингибирование пролиферации и стимуляцию апоптоза (Siegel P. и Massague J., 2003). Вероятно, повышение содержания TGF- β

у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии животных опосредуется двумя разными механизмами. У высокоустойчивых крыс усиление экспрессии и содержания HIF-1 α после гипоксического воздействия способствует кратковременному и незначительному повышению уровня TGF- β , в то время как у низкоустойчивых статистически значимое увеличение этого показателя наблюдается только через 90 мин после воздействия и обусловлено выраженным окислительным стрессом и повреждением клеточных мембран, что сопровождается повышенным содержанием 8-изопростана.

Таким образом, у самцов крыс Вистар с разной устойчивостью к недостатку кислорода после острого гипоксического воздействия выявлены различия молекулярно-биологических и биохимических параметров – уровней экспрессии генов *Hif-1 α* и *Nf- κ b*, содержания эритропоэтина, VEGF, TGF- β , 8-изопростана в сыворотке крови (рис. 56). Показано, что у высокоустойчивых к гипоксии крыс через 5 мин после гипоксической нагрузки уровни экспрессии *Hif-1 α* и *Nf- κ b*, содержание эритропоэтина, VEGF и TGF- β в сыворотке крови выше, чем у низкоустойчивых животных. Высокий уровень экспрессии *Hif-1 α* у высокоустойчивых к гипоксии крыс, по-видимому, обуславливает активацию транскрипции *Nf- κ b* и увеличение концентрации эритропоэтина, VEGF и TGF- β в сыворотке крови. По сравнению с высокоустойчивыми низкоустойчивые к дефициту O₂ животные через 5 мин после гипоксической нагрузки характеризовались более низкими уровнями экспрессии *Hif-1 α* и *Nf- κ b* в печени, а через 90 мин у них наблюдалось увеличение концентрации эритропоэтина, 8-изопростана и TGF- β в сыворотке крови.

Выявленные различия в уровне экспрессии *Nf- κ b* и содержании цитокина TGF- β , модулирующих воспалительные реакции, у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс, могут обуславливать особенности их течения у этих животных. Полученные данные свидетельствуют о том, что животные, отличающиеся по устойчивости к гипоксии, имеют различные адаптационные возможности, молекулярно-биологические и биохимические пути их реализации, а также предрасположенность к развитию воспалительных заболеваний: у высокоустойчивых крыс активация HIF-1 α через 5 мин после гипоксического воздействия вызывает более выраженное повышение NF- κ B, регулирующего процессы воспаления. При этом у низкоустойчивых животных через 90 мин после гипоксической нагрузки повышается содержание 8-изопростана, что сопряжено с повреждением клеточных макромолекул, окислительным стрессом и увеличением концентрации TGF- β . Согласно данным литературы, прерывистая гипоксия способствует окислительному стрессу, что приводит к развитию NF- κ B-зависимого воспаления (Ryan S. et al., 2005; Taylor C.T. et al., 2014; Nanduri J. et al., 2015).



Рис. 56. Схема. Сравнительная характеристика динамики молекулярно-биологических и биохимических параметров у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар через 5 и 90 мин после определения устойчивости к недостатку кислорода

Поскольку по результатам наших исследований можно предположить, что высокоустойчивые и низкоустойчивые к гипоксии животные, очевидно, отличаются по течению воспалительных заболеваний, задачей дальнейшего исследования было моделирование системной воспалительной реакции у крыс, отличающихся по устойчивости к недостатку кислорода, и выявление ее молекулярно-биологических, биохимических и морфофункциональных особенностей.

При воспалении в различных тканях развивается локальная гипоксия, обусловленная микроциркуляторными нарушениями, а также увеличением потребности иммунных клеток очага воспаления в кислороде (Hirota K., 2015). Гипоксия активирует транскрипционный фактор HIF, который вовлечен в регуляцию воспалительного ответа (Kiers H.D. et al., 2016). Ранее была выявлена взаимосвязь молекулярных путей гипоксии и воспаления – NF-κB влияет на экспрессию HIF-1α как в условиях гипоксии, так и в ответ на воспалительные стимулы, так как в промотере гена HIF-1α содержится NF-κB-связывающий сайт (Bonello S. et al., 2007; Rius J. et al., 2008; van Uden P. et al., 2008). Показано, что ЛПС может вызывать NF-κB-зависимое повышение уровней мРНК и белка HIF-1α (Frede S. et al., 2006), а HIF-1α, в свою очередь, может активировать NF-κB (Cummins E.P. et al., 2006; Oliver K.M. et al., 2009).

По данным литературы, HIF в условиях воспаления может играть как противовоспалительную, так и провоспалительную роль (Kiers H.D. et al., 2016; Devraj G. et al., 2017). У мышей HIF-1α был описан как защитный фактор в модели острого колита: дефицит HIF-1α у животных с колитом приводил к высокой смертности, а у выживших мышей – к более

тяжелым клиническим проявлениям (Karhausen J. et al., 2004). Напротив, при системных инфекциях, таких как сепсис, усугубление гипоксии и повышение активности HIF-1 α приводит к усилению врожденного иммунного ответа для выраженной элиминации патогена, увеличению продукции провоспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF α) в сыворотке крови, снижению синтеза противовоспалительного цитокина IL-10 и высокой смертности (Peyssonaux C. et al., 2007).

В соответствии с изложенным, для изучения взаимосвязи устойчивости к гипоксии с особенностями течения воспалительных реакций в нашей работе была использована модель системной воспалительной реакции, индуцированной введением ЛПС.

4.3 Сравнительная характеристика морфологических изменений и молекулярно-биологических показателей у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар через один месяц после определения устойчивости к недостатку кислорода

В литературе отсутствуют данные о каких-либо функциональных нарушениях у животных, подвергшихся воздействию гипоксии на критической «высоте», поэтому срок проведения эксперимента после разделения животных на высокоустойчивых и низкоустойчивых не является строго определенным. Как правило, устойчивость животных к гипоксии определяют один раз, некоторые авторы – дважды с интервалом в две недели (Сатурская А.С., 2015). Эксперимент проводят «сразу» после определения устойчивости (временной интервал в работах не указан) (Ghosh D. et al., 2012; Jain K. et al., 2013), спустя час (Лукьянова Л.Д. и Богомолов В.И., 1992), неделю (Крыжановский Г.Н. и соавт., 1991; Kumar S. et al., 2014), две недели (Лукьянова Л.Д. и Курлаев С.Н., 1992; Грек О.Р. и соавт., 2007), или месяц после воздействия (Свинов М.М. и соавт., 2001; Лукьянова Л.Д. и соавт., 2009; Лукьянова Л.Д. и Кирова Ю.И., 2011). В соответствии с рекомендациями Н.Н. Каркищенко (2017) включать животных в эксперимент следует не ранее, чем через 12-15 дней после тестирования, однако данный срок авторами никак не обоснован (Каркищенко Н.Н., 2017). Некоторые исследователи рекомендуют включать животных в эксперимент через один месяц после определения устойчивости, но они также не обосновывают этот срок (Лукьянова Л.Д. и соавт., 2009; Лукьянова Л.Д. и Кирова Ю.И., 2011). В то же время, по данным О.В. Макаровой (1997), после многократного гипоксического воздействия газовой смесью, содержащей 10% O₂ (10 ежедневных воздействий), у крыс Спрейг-Доули выявляется очаговая бронхопневмония, поэтому, очевидно, целесообразно проводить эксперимент в отдаленные сроки после определения устойчивости к гипоксии и осуществлять морфологический контроль. С учетом того, что гипоксия оказывает провоспалительное действие, а острый воспалительный процесс разрешается в сроки 21-24 сут, нами был выбран срок в один месяц после гипоксической нагрузки. По нашим данным, через один месяц после определения устойчивости к недостатку кислорода патологических и воспалительных изменений в легких и печени у высокоустойчивых и низкоустойчивых крыс Вистар выявлено не было. Показатели числа гранулоцитов периферической крови как у высокоустойчивых, так и у низкоустойчивых к гипоксии животных соответствовали нормальным значениям. Поскольку по результатам наших исследований патологических изменений в легких и печени крыс Вистар через один месяц после определения устойчивости к гипоксии выявлено не было, в соответствии с этим и рекомендациями Л.Д. Лукьяновой и соавт. (2009), Л.Д. Лукьяновой и Ю.И. Кировой (2011), в

нашей работе животных включали в эксперимент по моделированию системной воспалительной реакции спустя один месяц после определения устойчивости к недостатку O₂.

С целью выявления возможных различий между высокоустойчивыми и низкоустойчивыми к гипоксии крысами через один месяц после определения устойчивости к гипоксии, кроме морфологического исследования легких и печени, определяли содержание воспалительных маркеров. По уровню экспрессии гена *Nf-κb* в печени, содержанию эндотоксина, С-реактивного белка, HIF-1α, IL-1β, TGF-β, кортикостерона, неоптерина в сыворотке крови не было обнаружено различий между сравниваемыми группами животных. В то же время уровни экспрессии генов *Hif-1α* и *Vegf* в печени были выше у низкоустойчивых к гипоксии крыс по сравнению с высокоустойчивыми (рис. 57). Сведения о содержании в периферической крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии животных интерлейкинов, иммуноглобулинов и гормонов противоречивы (Грек О.Р. и соавт., 2007; Комелькова М.В., 2015; Кузина О.В. и др., 2014; Сатурская А.С., 2015). По данным А.С. Сатурской (2015), у высокоустойчивых к гипоксии крыс было выше содержание IL-10 в сыворотке крови по сравнению с низкоустойчивыми животными, а концентрация IL-1β и TNFα не различалась, однако срок проведения исследования после определения устойчивости к гипоксии в работах не указан. Содержание иммуноглобулинов М, G и А также не различалось у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс (Сатурская А.С. и соавт., 2015). По данным литературы, выявлено наличие обратной зависимости между базовым содержанием белка HIF-1α в неокортексе и устойчивостью беспородных самцов крыс к гипоксии: у неустойчивых особей в нормоксических условиях уровень HIF-1α был в 1,7 раза выше, чем у высокоустойчивых (Кирова Ю.И. и др., 2012). По-видимому, более высокий уровень экспрессии гена *Hif-1α* через 5 мин после гипоксического воздействия у высокоустойчивых к гипоксии крыс, описанный в предыдущей главе, обеспечивает их быструю и эффективную адаптацию к гипоксии. У низкоустойчивых к гипоксии крыс повышенный уровень экспрессии гена *Hif-1α* сохраняется через один месяц после гипоксического воздействия, что свидетельствует о предрасположенности к развитию воспалительных заболеваний, поскольку показана положительная роль HIF-1 в адаптации к недостатку кислорода и отрицательная – в развитии воспаления (Ratcliffe P. et al., 2017; Fratantonio D. et al., 2018). Возможно, что низкоустойчивые к гипоксии животные до разделения на группы по устойчивости и помещения их в барокамеру на критическую «высоту» также имеют предсуществующий повышенный уровень экспрессии *Hif-1α*. Однако в настоящее время методические подходы, которые позволили бы изучать экспрессию генов в печени *in vivo* ограничены, поэтому необходимо проведение дополнительных исследований в будущем. В литературе имеются данные о связи генных полиморфизмов молекул, участвующих в адаптации к гипоксии, с тяжестью течения и предрасположенностью к развитию воспалительных

заболеваний. Так, установлено, что полиморфизм гена HIF1A (1772T allele), определяющий его высокий уровень экспрессии, является фактором риска развития красного плоского лишая и аневризма брюшной аорты (De Carvalho Fraga C.A. et al., 2013; Strauss E. et al., 2015), а генный полиморфизм HIF1A rs11549467 связан с развитием хронической обструктивной болезни легких (Yu Z.G. et al., 2017). Риск гибели от острого респираторного дистресс-синдрома увеличен в 3,3 раза при полиморфизме PHD2 rs516651 (ТТ генотип) (Dotsch A. et al., 2017). В развитии ревматоидного артрита генетический полиморфизм rs12434439 GG HIF-1A является защитным фактором (Paradowska-Goryuska A. et al., 2018). Полиморфизм +896G TLR4, взаимосвязанного с HIF-1, связан с более тяжелым течением послеожогового сепсиса (Barber R.C. et al., 2006). Таким образом, генетический полиморфизм и повышенный уровень экспрессии HIF-1 α и зависимых от него генов во многом определяют тяжесть течения и исход инфекционно-воспалительных заболеваний.

Выявленный в нашей работе повышенный уровень экспрессии фактора роста сосудистого эндотелия *Vegf* в печени у низкоустойчивых к гипоксии крыс через один месяц после гипоксического воздействия также может вносить вклад в предрасположенность к развитию воспалительных заболеваний, так как известно, что VEGF регулирует воспалительные реакции: повышает проницаемость сосудов, ангиогенез, пролиферацию эндотелиальных клеток, хемотаксис и миграцию нейтрофилов и макрофагов. Показано, что предрасположенность к развитию ревматоидного артрита определяет генный полиморфизм VEGF (-1154 A/G, -2578 A/C) (Paradowska-Goryuska A. et al., 2016). Установлена связь между риском острого повреждения почек и полиморфизмом VEGF +936 CC генотипа у пациентов с тяжелой формой сепсиса (Cardinal-Fernandez P. et al., 2013).

В нашей работе у низкоустойчивых к недостатку кислорода крыс Вистар по сравнению с высокоустойчивыми через месяц после определения устойчивости к гипоксии объемная доля маргинальных зон лимфоидных узелков селезенки, абсолютное число цитотоксических Т-лимфоцитов и NK клеток, а также фагоцитарный показатель клеток периферической крови были выше (рис. 57). В литературе представлены данные об отсутствии различий лейкоцитарной формулы у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии животных, а также клеточного состава костного мозга и содержания лимфоцитов в тимусе (Комелькова М.В., 2015). Однако в работе Комельковой М.В. (2015) не учитывались половые различия и исследования проводили на смешанной группе, состоящей из самцов и самок.



Рис. 57. Сравнительная характеристика морфологических изменений и молекулярно-биологических показателей у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар через один месяц после определения устойчивости к недостатку кислорода

Большая объемная доля маргинальных зон лимфоидных узлов селезенки, высокий фагоцитарный показатель и большее число цитотоксических Т-лимфоцитов и НК клеток в периферической крови у низкоустойчивых к гипоксии крыс могут быть обусловлены высоким уровнем экспрессии гена *Hif-1α*, поскольку известно, что HIF-1 способствует активации клеток, участвующих в иммунных и воспалительных реакциях: базофилов, эозинофилов, нейтрофилов и тучных клеток, Т- и В-лимфоцитов, миграции нейтрофилов и макрофагов, повышению продукции провоспалительных цитокинов дендритными клетками, поляризации макрофагов в М1 тип (Anand R.J. et al., 2007; Thompson A.A., 2013; Krzywinska E. и Stockmann C., 2018). По данным литературы, HIF-1 стимулирует цитотоксические функции НК клеток, гипоксия и/или генетическая гиперэкспрессия HIF-1α усиливает фагоцитарную способность активированных макрофагов (Anand R.J. et al., 2007; Krzywinska E. и Stockmann C., 2018). Эти факты могут объяснять выявленные нами особенности низкоустойчивых к гипоксии животных.

По сравнению с высокоустойчивыми к гипоксии крысами обнаруженные в нашей работе более высокие уровни экспрессии генов *Hif-1α* и *Vegf* в печени, а также функциональная активация иммунной системы у низкоустойчивых животных через один месяц после определения устойчивости к недостатку кислорода могут быть как последствием гипоксического воздействия на критической «высоте», так и обусловлены предсуществующими особенностями. Однако необходимо проведение дальнейших экспериментов для выяснения причины таких различий между высокоустойчивыми и низкоустойчивыми к гипоксии животными.

Таким образом, через один месяц после определения устойчивости к гипоксии у высокоустойчивых и низкоустойчивых к недостатку кислорода крыс воспалительных и патологических изменений в легких и печени не выявлено. По сравнению с высокоустойчивыми у низкоустойчивых к гипоксии крыс через месяц после гипоксического воздействия выше экспрессия генов *Hif-1 α* и *Vegf* в печени, а также объемная доля маргинальных зон лимфоидных узелков селезенки, абсолютное число цитотоксических Т-лимфоцитов, НК клеток и фагоцитарный показатель клеток периферической крови.

4.4 Молекулярно-биологические, биохимические показатели системной воспалительной и иммунной реакций, морфологические изменения легких, печени и органов лимфоидной системы у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар

Одной из экспериментальных моделей системной воспалительной реакции является эндотоксинемия, вызванная введением высоких доз ЛПС *E. coli*, которая приводит к развитию острого респираторного дистресс-синдрома – «шокового» легкого, увеличению коагуляции с развитием ДВС-синдрома, дистрофическим изменениям и некрозам в печени, и, в конечном итоге, к полиорганной недостаточности и развитию сепсиса (Cinel I. и Opal С.М., 2009; Kosyreva А.М. et al., 2012; Fang H. et al., 2015).

В развитии системной воспалительной реакции ключевую роль играет гипоксия, возникающая в результате микроциркуляторных нарушений и диссеминированного внутрисосудистого свертывания (Муздубаева Б.Т., 2016; Cinel I. и Opal С.М., 2009). Однако выраженность гипоксических повреждений тканей и органов зависит не только от микроциркуляторных нарушений, но и, во многом, определяется индивидуальной устойчивостью организма к гипоксии (Косырева А.М. и соавт., 2018; Holley H.S. et al., 2012), что до сих пор не учитывается в клинических и экспериментальных исследованиях. Поэтому задачей этого раздела работы было изучение различий тяжести течения системной воспалительной и иммунных реакций, вызванных введением ЛПС, у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии самцов крыс Вистар.

Выбор сроков выведения животных из эксперимента (3, 6 и 24 ч) обусловлен тем, что, по данным литературы, продукция провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, а также экспрессия *Hif-1 α* и *Nf-kb* повышаются через 1-3 и 6 ч после введения ЛПС (Blackwell T.S. et al., 2000; Blouin С.С. et al., 2004), а выраженные патологические изменения органов-мишеней развиваются через 24 ч (Писарев В.Б. и соавт., 2008; Косырева А.М., 2018).

В течение суток после введения ЛПС отмечалась гибель части животных, связанная с развитием эндотоксинового шока, которая была максимальной в первые 6 ч эксперимента. Гибель высокоустойчивых к гипоксии животных составила 10% (2 из 20), а низкоустойчивых – 17% (3 из 18), сравниваемые показатели статистически значимо не различались.

В разные сроки после введения ЛПС оценивали морфологические изменения в легких, печени, тимусе и селезенке, определяли уровни экспрессии *Hif-1 α* , *Nf-kb* и *Vegf* в печени, содержание эндотоксина, С-реактивного белка, IL-1 β , TGF- β , кортикостерона, неоптерина в сыворотке крови, абсолютное и относительное количество гранулоцитов, субпопуляционный

состав лимфоцитов и фагоцитарную активность клеток периферической крови, апоптотическую гибель в тимусе, продукцию IL-10 клетками селезенки.

По нашим данным, у низкоустойчивых к гипоксии крыс через 3 ч после введения ЛПС происходило многократное повышение (в 64 раза) уровня эндотоксина в сыворотке крови, в то время как у высокоустойчивых его содержание не изменялось. Через 6 ч после введения ЛПС уровень эндотоксина в сыворотке крови у высокоустойчивых к гипоксии крыс повышался, но только в 8 раз. Согласно данным литературы, высокий уровень эндотоксина в сыворотке крови свидетельствует о неблагоприятном прогнозе и развитии септического шока, его терапевтическая элиминация уменьшает риск возникновения полиорганной недостаточности и увеличивает выживаемость больных (Yaguchi A. et al., 2012; Adamik B. et al., 2015).

Известно, что при введении эндотоксина грамотрицательных бактерий – ЛПС, происходит активация TLR4-рецепторов, приводящая к индукции ИКК и разрушению в протеасоме IκB, что обуславливает повышение экспрессии ядерного фактора NF-κB, его стабилизацию и транслокацию в ядро (Blackwell T.S. et al., 2000; Cinel I. и Opal S.M., 2009; van der Poll T. et al., 2017). В нашей работе в ранние сроки после введения ЛПС повышение экспрессии гена *Nf-κb* в печени наблюдалось только у низкоустойчивых к гипоксии крыс (рис. 58). У высокоустойчивых животных во все сроки после введения ЛПС не было выявлено достоверных отличий по сравнению с соответствующей контрольной группой, при этом уровень экспрессии гена *Nf-κb* через 6 и 24 ч после введения ЛПС был статистически значимо ниже, чем у низкоустойчивых крыс. Вероятно, многократное увеличение уровня эндотоксина в сыворотке крови у низкоустойчивых к гипоксии животных приводит к значительному повышению экспрессии гена *Nf-κb*, что обуславливает развитие выраженной воспалительной реакции.

Повышение экспрессии гена *Nf-κb* в печени у низкоустойчивых к гипоксии крыс свидетельствует о развитии более выраженного ЛПС-индуцированного воспаления и сопровождается увеличением содержания провоспалительного цитокина IL-1β в сыворотке крови (в 13 раз), которое наблюдалось только у низкоустойчивых животных через 3 ч после введения ЛПС (рис. 58). У высокоустойчивых к гипоксии крыс содержание провоспалительного цитокина IL-1β в сыворотке крови повышалось только в 8 раз, и различия не были статистически значимыми. Через 24 ч у низкоустойчивых крыс его содержание нормализовалось, но оставалось в 6 раз выше, чем у высокоустойчивых животных. Известно, что транскрипционный фактор NF-κB индуцирует продукцию провоспалительных цитокинов – IL-1β, TNFα, IL-6, которые через 4-6 ч после воздействия активируют синтез белков острой фазы воспаления в печени, таких как сывороточный амилоид А, прокальцитонин и С-реактивный белок (Cannon J.G. et al., 1990; Esteban E. et al., 2013). Кроме того, введение ЛПС индуцирует продукцию противовоспалительных цитокинов – IL-10, а также IL-4 и IL-13, которые блокируют активацию

NF-κB по механизму отрицательной обратной связи (Wang P. et al., 1995; van der Poll T. et al., 2017).

По нашим данным, достоверное повышение содержания С-реактивного белка в сыворотке крови через 24 ч происходило только у низкоустойчивых к гипоксии крыс (рис. 58). В соответствии с литературными сведениями, введение ЛПС и повышение синтеза провоспалительных цитокинов приводит к значительному увеличению содержания С-реактивного белка через 10-12 ч после инъекции. Пик концентрации С-реактивного белка наблюдается через 24-48 ч после введения ЛПС (Ng P.C. et al., 1997; Makhoul I.R. et al., 2006; Hofer N. et al., 2012; Slaats J. et al., 2016). С-реактивный белок является одним из клинических маркеров тяжести инфекционно-воспалительных заболеваний, в том числе, его содержание повышается при сепсисе (Uzzan B. et al., 2006; Poroa P. et al., 2011), и отражает тяжесть воспалительного процесса (Vigushin D.M. et al., 1993). Высокая концентрация С-реактивного белка при сепсисе свидетельствует о неблагоприятном прогнозе заболевания (Beltempo M. et al., 2018). В соответствии с этим, низкоустойчивые к гипоксии крысы характеризуются более выраженной воспалительной реакцией в ответ на введение ЛПС. По-видимому, повышение содержания С-реактивного белка у низкоустойчивых к гипоксии животных связано с активацией провоспалительных реакций, о чем свидетельствует увеличение продукции IL-1β через 3 ч после введения ЛПС у этих крыс, поскольку известно, что он способствует синтезу белков острой фазы воспаления (Slaats J. et al., 2016).

Таким образом, в ответ на введение ЛПС у низкоустойчивых к гипоксии крыс наблюдается развитие более выраженной системной воспалительной реакции, сопровождающейся многократным повышением уровня эндотоксина, увеличением концентрации провоспалительного цитокина IL-1β и С-реактивного белка в сыворотке крови, экспрессии гена *Nf-κb* в печени. У высокоустойчивых к гипоксии животных реакция менее выражена – наблюдается лишь незначительное повышение уровня эндотоксина, при этом содержание провоспалительного цитокина IL-1β и С-реактивного белка в сыворотке крови, экспрессия гена *Nf-κb* в печени статистически значимо не изменяются.

По нашим данным, через 6 ч после введения ЛПС происходило статистически значимое повышение уровня экспрессии гена *Hif-1α* в печени как у низкоустойчивых, так и у высокоустойчивых к гипоксии крыс (рис. 58), однако у низкоустойчивых животных он был в 2 раза выше. При стимуляции макрофагов ЛПС было показано, что экспрессия мРНК *Hif-1α* максимальна через 6 ч, а содержание белка – через 8 ч (Blouin C.C. et al., 2004). В нашем исследовании экспрессия гена *Hif-1α* была также максимальна через 6 ч после введения ЛПС как у высокоустойчивых, так и у низкоустойчивых к гипоксии крыс.

Механизмы регуляции белка HIF-1 α липополисахаридом недостаточно изучены. Показано, что при стимуляции ЛПС HIF-1 α стабилизируется активными формами кислорода и азота, образующимися в результате развития индуцированной микроциркуляторными нарушениями гипоксии (Chandel N.S. et al., 2000; Sumbayev V.V. и Yasinska I.M., 2007). По данным литературы, воспалительный ответ на введение ЛПС включает образование каскада реакций, которые способствуют развитию нарушений микроциркуляции и повышению уровней АФК в крови (Cuzzocrea S. et al. 1998; Javesghani D. et al. 2003; Jung Y.J. et al. 2003; Gunnett C.A. et al. 2005). При снижении эффективности антиоксидантной защиты вероятность окислительного повреждения увеличивается (Askew E.W., 2002). По нашим данным, низкоустойчивые к гипоксии крысы характеризуются повышенным уровнем маркера окислительного стресса – 8-изопростана через 90 мин после гипоксического воздействия, а также, по данным литературы, высокоустойчивые к недостатку O₂ крысы имеют большую степень антиоксидантной защиты (Jain K. et al., 2013). По-видимому, большая чувствительность к развитию системной воспалительной реакции у низкоустойчивых к гипоксии животных обусловлена более значительным окислительным стрессом, поскольку известно, что он играет важную роль в ее развитии (Macdonald J. et al., 2003; Kallapura G. et al., 2014). Вероятно, более выраженное повышение уровня экспрессии гена *Hif-1 α* в печени у низкоустойчивых к гипоксии крыс может быть обусловлено большими уровнями АФК и окислительного стресса у этих животных.

Увеличение продукции молекул воспаления приводит к активации коагуляции с повышением синтеза NO, нарушению гемодинамики и развитию гипоксии, которой подвергаются и клетки иммунной системы (Cohen J., 2002). При развитии воспаления блокирование протеасомной деградации HIF-1 α и его стабилизация могут происходить также из-за локальной гипоксии, возникающей, помимо микроциркуляторных нарушений, в результате увеличения потребления кислорода мигрирующими в очаг воспаления иммунными клетками (Муздубаева Б.Т., 2016; Cinel I. и Opal S.M., 2009; Hirota K., 2015; Guo Y. et al., 2017). Ранее была выявлена взаимосвязь молекулярных путей гипоксии и воспаления – NF- κ B влияет на экспрессию HIF-1 α как в условиях гипоксии, так и в ответ на воздействие флоготенных факторов (Bonello S. et al., 2007; Rius J. et al., 2008; van Uden P. et al., 2008). Показано, что ЛПС может вызывать TLR4- и NF- κ B-зависимое повышение уровня мРНК и содержания белка HIF-1 α (Frede S. et al., 2006), а HIF-1 α , в свою очередь, может активировать NF- κ B, так как ингибиторы, способствующие убиквитин-зависимому разрушению HIF-1 α , также контролируют функционирование киназного комплекса ИКК, ответственного за регуляцию NF- κ B (Cummins E.P. et al., 2006; Oliver K.M. et al., 2009).

Известно, что результат стабилизации HIF-1 через NF- κ B путь отличается от активации через недостаток кислорода (Jantsch J. et al., 2011). Если HIF-1 активируется в результате

гипоксии, усиливается транскрипция генов, ответственных за адаптацию к дефициту O_2 . При активации через NF- κ B-зависимый путь стимулируется экспрессия генов провоспалительных цитокинов. Вероятно, у низкоустойчивых к гипоксии крыс HIF-1 α активируется через NF- κ B-зависимый путь, что подтверждается повышенным уровнем экспрессии гена *Nf- κ b* в печени, а также продукции IL-1 β и С-реактивного белка. У высокоустойчивых к гипоксии животных статистически значимого увеличения экспрессии гена *Nf- κ b* в печени не наблюдалось, поэтому можно предположить, что у этих крыс повышение уровня мРНК *Hif-1 α* связано с развитием локальной гипоксии. Поэтому у низкоустойчивых к гипоксии крыс повышенный уровень экспрессии гена *Hif-1 α* обуславливает прогрессирование воспалительного процесса, а у высокоустойчивых – способствует адаптации и не вызывает развития выраженных воспалительных реакций.

В условиях воспаления HIF может играть как противовоспалительную, так и провоспалительную роль (Kiers H.D. et al., 2016; Devraj G. et al., 2017). На модели острого колита у мышей было показано, что дефицит HIF-1 α приводил к высокой смертности, а у выживших животных – к более тяжелым клиническим проявлениям заболевания (Karhausen J. et al., 2004). Провоспалительная функция HIF-1 была показана при системных инфекциях, таких как сепсис: усугубление гипоксии и повышение содержания HIF-1 α приводило к выраженной активации иммунного ответа, увеличению продукции провоспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF α) в сыворотке крови, уменьшению синтеза противовоспалительного цитокина IL-10 и большей смертности (Peyssonaux C. et al., 2007). В литературе обсуждается возможность оценки уровня активации HIF-1 как потенциального прогностического маркера сепсиса, а оптимизация оксигенации тканей для предотвращения гипоксии и активного синтеза белка HIF-1 α является одной из важнейших целей терапии системных инфекций (Textoris J. et al., 2012; Kiers H.D. et al., 2016). Повышение уровней мРНК и белка HIF-1 α , которое оказывает провоспалительное влияние, было показано в моделях грамм-положительной и грамм-отрицательной инфекций, перитонита (Frede S. et al., 2006; Peyssonaux C. et al., 2007; Kiss J. et al., 2012; Mahabeleshwar G.H. et al., 2012). Таким образом, более выраженное повышение экспрессии гена *Hif-1 α* в печени может быть инициальным механизмом, определяющим более тяжелое течение системной воспалительной реакции у низкоустойчивых к гипоксии животных.

Поскольку известно, что HIF-1 α регулирует большое число генов, принимающих участие в метаболизме, клеточном цикле, воспалении, адаптации и других клеточных процессах, его активация оказывает значительное влияние на течение системной воспалительной реакции на разных уровнях регуляции. Повышение активности HIF-1 α может, дополнительно к провоспалительным эффектам NF- κ B, стимулировать синтез различных цитокинов и факторов, регулирующих воспалительные реакции (Ratcliffe P. Et al., 2017; Fratantonio D. et al., 2018).

В частности, было показано, что при гипоксии увеличивается индуцированная ЛПС экспрессия белка IL-1 β (Pan H. и Wu X., 2012; Tannahill G.M. et al., 2013). Ингибитор пролилгидроксилаз – DMOG, который стабилизирует HIF-1 α , приводил к повышению ЛПС-индуцированного уровня мРНК IL-1 β (Tannahill G.M. et al., 2013). Напротив, при искусственном увеличении активности PHD и удалении HIF-1 α значительно уменьшалась индуцированная ЛПС экспрессия IL-1 β . Изучение человеческого (*IL1B*) и мышиного (*Il1b*) последовательностей генов показало существование консервативного канонического HIF-1 α -связывающего сайта. Это свидетельствует о том, что IL-1 β – прямая мишень для HIF-1 α , что подтверждается несколькими работами (Zhang W. et al., 2006; Peyssonnaud C. et al., 2007; Tannahill G.M. et al., 2013). Таким образом, высокий уровень продукции IL-1 β у низкоустойчивых к гипоксии крыс обусловлен, по-видимому, не только повышением экспрессии NF- κ B, но и существенным вкладом HIF-1 α в индукцию синтеза провоспалительных цитокинов.

В то же время показано, что IL-1 β стимулирует ДНК-связывающую активность HIF-1, предотвращает его протеасомную деградацию (Hellwig-Burgel T. et al., 1999; Jung Y.J. et al., 2003; Hellwig-Burgel T. et al., 2005). Кроме того, гипоксия и IL-1 β увеличивают продукцию VEGF через увеличение связывания HIF-1 с HREs в промотере его гена, что способствует повышению проницаемости сосудов и миграции моноцитов (El Awad B. et al., 2000). Это согласуется с данными другого исследования, в котором обнаружено, что IL-1 активировал HIF-1 в фибробластах, полученных из десны и синовиальной оболочки (Thornton R.D. et al., 2000). Стимуляция ЛПС индуцирует изменения метаболизма: происходит активация гликолиза, накопление сукцината и цитрата, которые прямо или опосредованно стабилизируют HIF-1 α , что формирует положительную обратную связь и способствует увеличению синтеза IL-1 β макрофагами, продукции АФК и повышению активности миелоидных клеток (Jha A.K. et al., 2015; Stothers C.L. et al., 2018).

Следует отметить, что выраженность системной воспалительной реакции во многом зависит от эффективности инактивации эндотоксина и, в частности, ЛПС. Существует несколько способов элиминации эндотоксина из организма: фагоцитоз нейтрофилами и макрофагами, нейтрализация ЛПС-связывающими белками и др. Ключевым механизмом передачи сигнала через TLR4-рецепторы является фагоцитоз ЛПС иммунокомпетентными клетками. Стимуляция нейтрофилов и макрофагов ЛПС приводит к их активации и развитию провоспалительных реакций. По данным литературы, гипоксия и повышение продукции HIF-1 приводят к увеличению экспрессии TLR4 макрофагами (Kim S.Y. et al., 2010). ЛПС-индуцированная активация HIF-1 α и опосредованная HIF-1 α экспрессия TLR4 формируют положительную обратную связь и увеличивают активацию макрофагов, кроме того, гипоксия увеличивает их фагоцитарные и бактерицидные свойства (Anand R.J. et al., 2007). Эти факторы повышают

чувствительность иммунной системы к инфекциям и воспалительным сигналам. Вероятно, обнаруженное нами у низкоустойчивых к гипоксии крыс выраженное увеличение экспрессии гена *Hif-1α* после введения ЛПС приводит к повышению экспрессии TLR4 макрофагами. Это, в свою очередь, способствует большему связыванию ЛПС и развитию воспаления. Очевидно, многократное увеличение содержания эндотоксина у низкоустойчивых к гипоксии крыс, который в большей степени связывается с TLR4, также оказывает влияние на развитие системной воспалительной реакции.

Ключевую роль в развитии воспаления, вызванного введением ЛПС, играют реакции врожденного иммунитета, реализуемые нейтрофилами и макрофагами, которые активируются при повышении экспрессии NF-κB и HIF-1α. Гранулоциты способствуют развитию выраженной воспалительной реакции путем продукции медиаторов воспаления, цитокинов и хемокинов (Белоцкий С.М., Авталион Р.Р., 2008; Kruger P. et al., 2015). По нашим данным, число гранулоцитов в периферической крови увеличивалось только у высокоустойчивых к гипоксии крыс через 24 ч после введения ЛПС. В контрольной группе низкоустойчивых к недостатку кислорода животных фагоцитарный показатель клеток периферической крови был статистически значимо выше, чем у высокоустойчивых крыс. Через 24 ч после введения ЛПС фагоцитарный показатель был также выше у низкоустойчивых к гипоксии животных, только у них наблюдалось увеличение индекса стимуляции фагоцитарной активности, в то время как у высокоустойчивых крыс изменений обнаружено не было. При этом через 24 ч после введения ЛПС показатель был статистически значимо выше у низкоустойчивых к гипоксии животных по сравнению с высокоустойчивыми.

Возможно, высокий фагоцитарный показатель клеток крови у низкоустойчивых к гипоксии крыс как в норме, так и после введения ЛПС, определяется исходной высокой генетически запрограммированной продукцией HIF-1α в гранулоцитах. Однако в литературе данные о содержании HIF-1α в гранулоцитах животных, отличающихся по устойчивости к гипоксии, не представлены, но, как упоминалось ранее, известно, что у низкоустойчивых животных в норме содержание HIF-1 в неокортексе (Кирова Ю.И. и соавт., 2012), а, по нашим данным, и в печени, выше.

Полученные нами результаты согласуются с данными по исследованию пациентов с системным воспалительным ответом: в их крови увеличивалось число нейтрофилов и моноцитов, но не повышался фагоцитоз *E. coli*. L.A. Flores-Mejia et al. (2018) показали, что увеличение числа активных фагоцитов в крови может не отражать их высокую функциональную активность, поэтому, вероятно, у высокоустойчивых к гипоксии крыс повышение числа гранулоцитов, очевидно, связано с особенностями механизмов их миграции, а у низкоустойчивых повышенный уровень фагоцитарной активности без увеличения числа гранулоцитов в крови – с усилением

фагоцитоза эндотоксина после введения ЛПС, что обуславливает быстрое уменьшение его содержания в крови.

Выявленная нами ЛПС-индуцированная стимуляция фагоцитарной активности гранулоцитов только у низкоустойчивых к гипоксии животных может определяться более выраженным воспалительным ответом, характеризующимся, в том числе, повышенным уровнем NF-κB-зависимой продукции провоспалительных цитокинов и активацией HIF-1α (Taylor C.T. et al., 2016; Liu T. et al., 2017), так как S. Frede et al. (2006) показали, что активация HIF-1α может осуществляться как непосредственно ЛПС, так и транскрипционным фактором NF-κB (Rius J. et al., 2008; van Uden P. et al., 2008). ЛПС-индуцированный высокий уровень продукции и стабилизации HIF-1α в гранулоцитах у низкоустойчивых к гипоксии крыс в результате развивающейся гипоксии при системном воспалительном ответе, по-видимому, определяет высокую фагоцитарную активность клеток периферической крови у этих животных, что, вероятно, является реакцией в ответ на высокую активность воспалительного процесса (Frede S. et al., 2006). В свою очередь, избыточная фагоцитарная активность моноцитов и гранулоцитов, направленная на нейтрализацию ЛПС, может приводить к повреждениям органов и тканей и развитию полиорганной недостаточности.

При системной воспалительной реакции поражаются такие паренхиматозные органы-мишени как легкие, печень, почки и др. (Мишнев О.Д. и соавт., 2003; Kosyreva A.M. et al., 2018). В нашей работе для сравнительной оценки выраженности системной воспалительной реакции проводили морфологическое исследование легких и печени. Кроме того, выраженность поражения печени определяли с помощью биохимического исследования активности ферментов АСТ и АЛТ в сыворотке крови. По данным ряда авторов, основным механизмом эффекторной фазы повреждения легких и печени является активация и миграция нейтрофилов в ткани с последующим высвобождением протеолитических ферментов и образованием кислородных радикалов.

По нашим данным, через 3 и 6 ч после введения ЛПС выявлялась значительная инфильтрация межальвеолярных перегородок легких нейтрофилами как у высокоустойчивых, так и у низкоустойчивых к гипоксии крыс (рис. 58). По сравнению с высокоустойчивыми через 6 ч после введения ЛПС у низкоустойчивых к гипоксии крыс количество нейтрофилов в межальвеолярных перегородках было статистически значимо выше. Миелоидные клетки, включая нейтрофилы и моноциты/макрофаги, содержат множество протеолитических ферментов, и способны быстро генерировать АФК для разрушения патогенов, следовательно, их активация может вызывать гипериммунный ответ и нарушение целостности и жизнедеятельности клеток (Brown K.A. et al., 2006; Fang H. et al., 2015; Lumb A.V., 2017). По данным ряда авторов, нейтрофилы вызывают повреждение тканей легких, печени и других

органов при сепсисе (Kabay B. et al., 2007; Stehr S.N. et al., 2008). Миграция и активация нейтрофилов лежит в основе развития острого воспаления, в том числе острого респираторного дистресс-синдрома (Kruger P. et al., 2015). По данным литературы, HIF-1 α способствует выживанию нейтрофилов и стимулирует их бактерицидную активность (Peyssonaux C. et al., 2005; Walmsley S.R. et al., 2005; Stothers C.L. et al., 2018). Отсутствие HIF-1 α в нейтрофилах ингибирует продукцию АТФ, уменьшает их способность проникать в ткани и уничтожать бактерии (Cramer T. et al., 2003; Peyssonaux C. et al., 2005). В нашем исследовании у низкоустойчивых к гипоксии крыс по сравнению с высокоустойчивыми наблюдается более высокое количество нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких через 6 ч после введения ЛПС, сопряженное с более выраженным повышением экспрессии гена *Hif-1 α* , что может свидетельствовать о большем повреждении легких у этих животных.

Увеличение числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких обусловлено повышением синтеза хемокинов (например, IL-8) и молекул адгезии (в частности, ICAM-1) эндотелиальными клетками в ответ на введение ЛПС (Brown K.A. et al., 2006; Remick D.G., 2007; Lumb A.V., 2017). По-видимому, более выраженное увеличение числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у низкоустойчивых к гипоксии животных связано с более высокой экспрессией *Hif-1 α* , который усиливает миграцию и уменьшает апоптоз нейтрофилов (Thompson A.A. et al., 2013). Повышение уровня мРНК *Hif-1 α* приводит к увеличению экспрессии гена *Nf- κ b*, который регулирует воспалительные процессы и, в частности, усиливает синтез молекул адгезии и хемокинов (Hirota K., 2015).

Известно, что нейтрофилы и макрофаги быстро реагируют на патогены или сигналы повреждения, способствуют поддержанию воспалительной ниши путем высвобождения литических ферментов из гранул, генерирования АФК и фагоцитоза, что помогает уничтожить микроорганизмы (Vorregaard N., 2010). Накапливается все больше доказательств того, что гипоксия и HIF-1 α являются критическими факторами для выживания и функционирования нейтрофилов и макрофагов (Thompson A.A., 2013; Stothers C.L. et al., 2018). Белок HIF-1 α в нестимулированных нейтрофилах присутствует только в небольших количествах, несмотря на обилие его мРНК, поэтому предполагается, что активность HIF-1 α регулируется, аналогично другим клеткам, РНД-опосредованным пост-трансляционным разрушением (Harris A.J., 2014). Инактивированные нейтрофилы находятся в состоянии покоя в кровеносных сосудах, в условиях относительно высокого содержания O₂, что минимизирует активность HIF-1 α . Когда нейтрофилы мигрируют в очаг воспаления, воздействие гипоксической среды вызывает увеличение продукции HIF-1 α с последующей их активацией (Thompson A.A., 2013). HIF-1 α играет важную роль в антимикробном действии нейтрофилов. Нейтрофильные внеклеточные ловушки (Neutrophil Extracellular Traps – NETs) являются сложными матрицами антимикробных белков,

ДНК и гистонов, которые способствуют захвату и лизису бактериальных клеток (Brinkmann V. et al., 2004). Установлено, что HIF-1 α необходим для формирования NETs нейтрофилами человека, стимулированными ЛПС (McInturff A.M. et al., 2012). В ответ на ЛПС они активируют mTOR, который на пост-трансляционном уровне стабилизирует HIF-1 α и впоследствии способствует образованию NETs. Для нарушения высвобождения NETs достаточно ингибирования активности mTOR или HIF-1 α , что препятствует уничтожению бактерий нейтрофилами *in vitro*. Кроме того, L. Vollger и соавт. (2016) установили, что прямой стабилизации HIF-1 α достаточно, чтобы вызвать образование NETs в нейтрофилах *ex vivo* (Vollger L. et al., 2016). Установлено, что формирование и выброс NETs зависит от гликолиза – процесса, который регулируется HIF-1 α (Rodriguez-Espinosa O. et al., 2015). Кроме того, гипоксия или генетически обусловленная повышенная экспрессия HIF-1 α усиливает фагоцитарную способность активированных макрофагов, частично путем стимулирования сигнального пути киназы p38-MAP (Anand R.J. et al., 2007). Дефицит HIF-1 α в макрофагах нарушает их фагоцитарную способность *in vitro* (Fensterheim V.A. et al., 2017). Несмотря на важную роль активации HIF-1 α в миграции макрофагов и фагоцитозе, эффекторные мишени HIF-1 α , которые способствуют этим процессам, в настоящее время не изучены (Stothers C.L. et al., 2018).

Вероятно, помимо показанного нами повышения уровня экспрессии гена *Hif-1 α* в клетках печени у низкоустойчивых к гипоксии крыс, он также повышается в легких и клетках иммунной системы, что обуславливает большую фагоцитарную активность клеток крови и инфильтрацию межальвеолярных перегородок легких нейтрофилами.

Кроме элиминации ЛПС нейтрофилами и макрофагами, существует множество способов его нейтрализации: различные ЛПС-связывающие белки и липопротеины, которые быстро нейтрализуют ЛПС в плазме крови и не позволяют ему взаимодействовать с TLR4; деацетилирование, дефосфорилирование.

ЛПС очень быстро концентрируется в печени: 80% введенного эндотоксина аккумулирует в ней в течение нескольких часов. В элиминации ЛПС участвуют клетки Купфера, быстро удаляющие его из крови (Ruiter D.J. et al., 1981; Knolle P.A. и Gerken G., 2000). По данным морфологического исследования, площадь некрозов в печени через 24 ч после введения ЛПС была статистически значимо выше у низкоустойчивых к гипоксии крыс по сравнению с высокоустойчивыми. Патологические аспекты дисфункции печени при системной воспалительной реакции являются сложными и недостаточно изученными. Печень играет существенную роль в нейтрализации эндотоксинов и бактерий, детоксикации и синтезе белков для метаболических, иммунных функций и функции коагуляции. В этих процессах участвуют гепатоциты, клетки Купфера и синусоидальные эндотелиальные клетки. При развитии воспаления печень способствует защите и восстановлению тканей через взаимосвязь клеток

печени и крови. Метаболический путь гепатоцитов переключается на регуляцию воспалительного ответа, который отвечает за увеличение синтеза белков острой фазы, опосредованного преимущественно IL-6 (Vary T.C. et al., 1992). Это приводит к увеличению синтеза С-реактивного белка, α -1-антитрипсина, повышению уровней фибриногена, протромбина и гаптоглобина, тогда как продукция альбумина, трансферрина и антитромбина уменьшается. При системной воспалительной реакции происходят глубокие изменения в балансе факторов коагуляции, что приводит к прокоагулянтной активности. Кроме того, метаболические изменения и воспалительный ответ вызывают снижение активности цитохрома P450. Клетки Купфера являются ключевыми клетками, вовлеченными в поглощение бактерий и элиминацию эндотоксина. Клиренс эндотоксина нарушается при заболеваниях печени, что может объяснять более высокую восприимчивость организма к инфекциям (Nakatani Y. et al., 2001). Клетки Купфера могут продуцировать различные провоспалительные медиаторы, включая TNF α , усиливать синтез белков острой фазы и продукцию NO (Fong Y.M. et al., 1990). Они также взаимодействуют с форменными элементами крови – тромбоцитами, эритроцитами и лейкоцитами, что активизирует их и усиливает провоспалительный ответ (Dhainaut J.F. et al., 2001; Nessler N. et al., 2012).

Известно, что повреждение гепатоцитов печени развивается в ответ на прямое действие ЛПС, микроциркуляторные нарушения, повышение синтеза цитокинов (IL-1 β , IL-6, TNF α , TGF- β , IFN γ , IL-10), белков острой фазы, АФК и NO (Муздубаева Б.Т., 2016; Коо D.J. et al., 1999; Cohen J., 2002; Cinel I. и Opal S.M., 2009). Нами было показано, что концентрация С-реактивного белка и некоторых провоспалительных цитокинов, в частности, IL-1 β в крови у низкоустойчивых к гипоксии крыс выше по сравнению с высокоустойчивыми, что может определять большие повреждения гепатоцитов у низкоустойчивых к гипоксии животных, о чем свидетельствует высокий показатель площади некрозов печени.

Альтеративные изменения в печени сопровождаются повышением активности аспаратаминотрансферазы (АСТ) и аланинаминотрансферазы (АЛТ). В нашем исследовании уровни активности этих ферментов повышались через 24 ч после введения ЛПС как у высокоустойчивых, так и у низкоустойчивых к гипоксии животных (рис. 58). Однако у низкоустойчивых к гипоксии крыс после введения ЛПС уровни активности АСТ и АЛТ были, соответственно, в 5,6 и 5,2 раза выше по сравнению с высокоустойчивыми, что свидетельствует о выраженных повреждениях гепатоцитов у этих животных (Lee T.H. et al., 2012; Nessler N. et al., 2012).

Противовоспалительные цитокины, такие как IL-10 и TGF- β , продуцируемые макрофагами и периферическими мононуклеарными клетками при воздействии ЛПС, регулируют развитие воспалительной реакции. IL-10 ограничивает воспалительный ответ, а TGF- β играет важную роль

в супрессии функциональной активности клеток врожденного иммунитета и активации T-регуляторных клеток (Sanjabi S. et al., 2009; Clambey E.T. et al., 2012). Нами показано, что у высокоустойчивых к гипоксии крыс происходило достоверное снижение уровня продукции клетками селезенки IL-10 через 6 ч после введения ЛПС и содержания TGF- β в сыворотке крови – через 24 ч. Противовоспалительные цитокины способны ингибировать продукцию IL-1 β и TNF α (Castellheim A. et al., 2009). Опосредованная IL-10 супрессия продукции провоспалительных цитокинов может усугублять течение бактериальной инфекции и сепсиса, так как IL-10 ингибирует пролиферацию Th1 клеток и синтез IFN γ (Taga K. и Tosato G., 1992; de Vries J.E., 1995). Высокая продукция противовоспалительных цитокинов, таких как IL-10 и TGF- β может способствовать развитию иммунодефицитного состояния, повышению чувствительности к вторичным инфекциям и хронизации воспаления, а также увеличению риска развития полиорганной недостаточности (Opal S.M. и DePalo V.A., 2000; Cavaillon J.M. и Annane D., 2006; Couper K.N. et al., 2008; Ono S. et al., 2018). По данным литературы, нейтрализация активности IL-10 повышает выживаемость животных в модели сепсиса, развившегося на фоне пневмонии (van der Poll T. et al., 1996). У умерших пациентов с послеожоговым сепсисом выявлен более высокий уровень IL-10 по сравнению с выжившими больными (Yeh F.L. et al., 2000). Повидимому, у высокоустойчивых к гипоксии крыс снижение уровня продукции клетками селезенки IL-10 через 6 ч после введения ЛПС и содержания TGF- β в сыворотке крови через 24 ч предотвращает развитие иммуносупрессии и повышает выживаемость животных. У низкоустойчивых к гипоксии животных содержание противовоспалительных цитокинов не изменялось, что свидетельствует о развитии интенсивной воспалительной реакции в ответ на введение ЛПС. Кроме того, IL-10 является одним из цитокинов Th2-типа иммунного ответа (Муздубаева Б.Т., 2016; Castellheim A. et al., 2009). Как и глюкокортикоиды, он ингибирует продукцию провоспалительных цитокинов макрофагами и Th1 клетками. Снижение уровня продукции IL-10 у высокоустойчивых к гипоксии крыс после введения ЛПС косвенно свидетельствует о преобладании у них клеточного типа иммунного ответа. Показано, что активация NIF-1 α прямо стимулирует продукцию IL-10 В-лимфоцитами (Meng X. et al., 2018). Вероятно, у низкоустойчивых к гипоксии крыс повышенный уровень экспрессии *Hif-1 α* наблюдается не только в печени, но и В-лимфоцитах, что способствует поддержанию продукции ими IL-10. У высокоустойчивых к гипоксии крыс меньший уровень экспрессии *Hif-1 α* повидимому, обуславливает снижение продукции IL-10 через 6 ч после введения ЛПС.

По нашим данным, концентрация кортикостерона в сыворотке крови через 6 ч после введения ЛПС статистически значимо повышалась только у низкоустойчивых к гипоксии крыс (рис. 58). При этом через 24 ч после введения ЛПС у этих животных его содержание было достоверно выше по сравнению с высокоустойчивыми крысами. Известно, что активация синтеза

глюкокортикоидов сопровождается многие бактериальные и вирусные заболевания, при этом она является критической для выживания организма, так как при блокаде глюкокортикоидных рецепторов или удалении надпочечников инфекционные заболевания часто приводят к гибели (Webster J.I. и Sternberg E.M., 2004). Согласно данным литературы, эндотоксины, в том числе ЛПС, стимулируют синтез АКТГ и кортикостерона гипофизом и надпочечниками, как напрямую, так и опосредованно, через повышение продукции провоспалительных цитокинов (Ma X.C. et al. 2000; Bornstein S.R. et al., 2006). Глюкокортикоиды оказывают выраженный противовоспалительный эффект несколькими путями: взаимодействуют с коактиваторами (например, CBP – CREB-Binding Protein), необходимыми для запуска транскрипции NF-κB и ответных генов; активируют синтез противовоспалительных цитокинов; изменяют гормональный баланс (Barnes P.J., 2010). Глюкокортикоиды подавляют синтез провоспалительных цитокинов иммунными клетками, что способствует защите организма от разрушительных последствий гипериммунного ответа (таких как повреждение ткани, аутоиммунные заболевания, септический шок). Кроме того, глюкокортикоиды играют важную роль в формировании иммунитета, влияя на миграцию иммунных клеток в очаг воспаления и поляризуя иммунный ответ преимущественно по гуморальному типу (Chrousos G.P., 2000). Обнаруженное нами увеличение содержания кортикостерона в исследуемые сроки после введения ЛПС только у низкоустойчивых к гипоксии крыс также косвенно свидетельствует о смещении баланса иммунных реакций у этих животных в сторону гуморальных. По данным литературы, IL-1β стимулирует выброс кортикостерона из надпочечников крыс (Silverman M.N. et al., 2005). По-видимому, значительное повышение содержания этого цитокина в сыворотке крови у низкоустойчивых к гипоксии животных через 3 ч после введения ЛПС способствует активации синтеза кортикостерона надпочечниками и обуславливает его повышение через 6 ч. Вероятно, у низкоустойчивых к гипоксии крыс более высокая концентрация кортикостерона по сравнению с высокоустойчивыми связан с активацией компенсаторных реакций в ответ на более выраженный ЛПС-индуцированный системный воспалительный ответ, однако, его протекторные функции подавляются преобладающими воспалительными реакциями и цитокинами, что, в частности, приводит к развитию некротических изменений в печени.

Стимулированное ЛПС повышение содержания кортикостерона является одним из механизмов инволюции тимуса (Chrousos G.P., 1995). Кроме того, ЛПС оказывает прямое негативное действие на клетки тимуса, в частности, на двойные позитивные лимфоциты (CD4+CD8+) коркового вещества (Tsuji T. et al., 2000), а провоспалительные цитокины вызывают развитие акцидентальной инволюции тимуса при различных инфекциях (Savino W., 2006). В экспериментальных исследованиях показано, что при развитии системных проявлений воспалительных реакций в тимусе наблюдаются различные стадии акцидентальной инволюции

– от гиперплазии коркового вещества до его опустошения разной выраженности (Косырева А.М., 2018; Billard M.J. et al., 2011; Solti I. et al., 2015; Zhou Y.J. et al., 2016). В нашей работе более значительное сужение коркового вещества тимуса по сравнению с высокоустойчивыми к гипоксии крысами наблюдалось у низкоустойчивых животных через 3 ч после введения ЛПС (рис. 58). Сужение коркового вещества может свидетельствовать о процессах миграции или о более активной гибели клеток тимуса у низкоустойчивых к недостатку кислорода крыс в ответ на гипоксию и введение ЛПС, высокое содержание кортикостерона, эндотоксина и провоспалительных цитокинов в сыворотке крови. Однако по сравнению с показателями через 3 ч после введения ЛПС, по данным оценки апоптотической гибели клеток тимуса, через 24 ч происходило снижение числа гибнущих CD3- клеток в тимусе как у высокоустойчивых, так и у низкоустойчивых к гипоксии животных. Через 6 ч после введения ЛПС, по сравнению с 3 ч, наблюдалось снижение числа апоптотически гибнущих CD3+-лимфоцитов в тимусе у низкоустойчивых к гипоксии животных. Поскольку при морфологическом исследовании тимуса выявлена картина «звездного неба», а количество апоптотически гибнущих клеток не увеличивалось, а, напротив, снижалось, вероятно, акцидентальная инволюция обусловлена в большей степени усилением миграции лимфоцитов в периферические лимфоидные органы. Через 24 ч после введения ЛПС наблюдалось статистически значимое повышение числа апоптотически гибнущих CD3+-лимфоцитов в тимусе у высокоустойчивых к гипоксии животных по сравнению с показателями через 6 ч, однако показатели не отличались от контрольной группы. По сравнению с низкоустойчивыми у высокоустойчивых к гипоксии крыс через 24 ч после введения ЛПС число апоптотически гибнущих CD3+-лимфоцитов в тимусе было статистически значимо выше. Это данные, вероятно, свидетельствуют о восстановлении баланса процессов пролиферации и апоптоза в тимусе у высокоустойчивых к гипоксии крыс, так как известно, что дифференцировка Т-лимфоцитов в норме сопровождается положительной и отрицательной селекцией и происходит с участием апоптоза (Quaglini D. и Ronchetti I.P., 2001).

По данным литературы, HIF-1 α -зависимая экспрессия анти-апоптотического белка Bcl-2 предотвращает апоптоз (Loginova N.P. et al., 2013). Показано, что активация HIF-1 α способствует опухолевой прогрессии и ухудшает прогноз из-за ингибирования апоптоза и индукции ангиогенеза (Сеуган А.В. et al., 2015). S.B. Cohen et al. в 1997 г. показали, что IL-10 супрессирует апоптоз Т-лимфоцитов крови *in vitro* через усиление экспрессии Bcl-2 (Cohen S.B. et al., 1997). Индуцированная аденовирусом экспрессия IL-10 в тимусе увеличивает уровень Bcl-2 и уменьшает число апоптотически гибнущих клеток (Oberholzer C. et al., 2001). Поскольку только у высокоустойчивых к гипоксии крыс уровень продукции IL-10 снижался через 6 ч после введения ЛПС, а у низкоустойчивых не изменялся, вероятно, это обуславливает снижение числа апоптотически гибнущих CD3+ клеток только у низкоустойчивых животных. Как обсуждалось

ранее, известно, что у низкоустойчивых животных в норме содержание HIF-1 в неокортексе (Кирова Ю.И. и соавт., 2012), а, по нашим данным, и в печени, выше. Повышенные уровни экспрессии гена и синтеза белка HIF-1 α также могут ингибировать апоптоз клеток тимуса у низкоустойчивых к гипоксии крыс.

Для того, чтобы предотвратить связывание ЛПС с TLR4 и не допустить активации выраженной воспалительной реакции в организме существует несколько защитных механизмов (Buttenschoen K. et al., 2010). Антитела классов IgM и IgG, могут связывать и нейтрализовать эндотоксин, а также активировать классический путь комплемента. По данным литературы, низкоаффинные антитела играют важнейшую роль в ранней элиминации патогенов. Они продуцируются В-клетками маргинальных зон лимфоидных узелков селезенки (Andersson J. et al., 1973; Zouali M. и Richard Y., 2011; Cerutti A. et al., 2013). По нашим данным, в контрольной группе у низкоустойчивых к гипоксии крыс объемная доля маргинальных зон лимфоидных узелков селезенки была значительно выше, чем у высокоустойчивых животных, что косвенно свидетельствует о возможно большем уровне продукции низкоаффинных антител у этих крыс. При этом уровень эндотоксина, который многократно повышался в сыворотке крови у низкоустойчивых к гипоксии крыс через 3 ч после введения ЛПС, через 6 ч нормализовался, а у высокоустойчивых оставался повышенным. По-видимому, у низкоустойчивых к гипоксии крыс одним из механизмов, обуславливающих быструю элиминацию эндотоксина из крови, является продукция антител В-лимфоцитами маргинальных зон лимфоидных узелков селезенки.

Известно, что дендритные клетки, а также В-лимфоциты маргинальных зон лимфоидных узелков селезенки могут захватывать антиген, мигрировать и презентировать его лимфоцитам (Bronte V. и Pittet M.J., 2013). По нашим данным, только у низкоустойчивых к гипоксии крыс через 3 ч после введения ЛПС наблюдалось статистически значимое уменьшение объемной доли маргинальных зон лимфоидных узелков селезенки (рис. 58), что может свидетельствовать об активных процессах миграции лимфоцитов.

В нашей работе сужение ПАЛМ-зоны селезенки происходило только у высокоустойчивых к гипоксии крыс через 24 ч после введения ЛПС (рис. 58). Это может свидетельствовать о миграции Т-лимфоцитов в периферические органы и очаг воспаления, преимущественном смещении баланса иммунных реакций в сторону клеточных. Отсутствие изменений объемной доли ПАЛМ-зоны селезенки у низкоустойчивых к гипоксии крыс объясняется активацией преимущественно миграции Т-лимфоцитов из тимуса в периферические лимфоидные органы, в частности, в селезенку, о чем свидетельствует большее опустошение коркового вещества у этих животных при отсутствии увеличения и даже снижении показателей апоптотической гибели, описанных выше.

По нашим данным, только у низкоустойчивых к гипоксии крыс через 3 и 6 ч после введения ЛПС наблюдалось расширение светлых центров лимфоидных узелков селезенки, а через 24 ч – гиперплазия белой пульпы, что свидетельствует об активации пролиферации и миграции Т- и В-лимфоцитов. Через 24 ч после введения ЛПС по сравнению с высокоустойчивыми и низкоустойчивыми к гипоксии животных относительное число В-лимфоцитов в периферической крови было статистически значимо выше. Согласно данным литературы, ЛПС активирует пролиферацию В-лимфоцитов, переключение продуцируемых ими классов антител и дифференцировку в плазматические клетки. Кроме того, гипоксия и активация НФ в клетках светлых центров лимфоидных узелков способствуют дифференцировке В-лимфоцитов в плазматические клетки, переключению классов продуцируемых антител и изменению уровня их синтеза (Abbott R.K. et al., 2016). Таким образом, в исследуемые нами сроки после введения ЛПС более выраженные изменения В-зоны селезенки и повышение относительного количества В-лимфоцитов в периферической крови были выявлены у низкоустойчивых к гипоксии крыс, что, по-видимому, связано с преимущественной активацией гуморального звена иммунитета.

Помимо активации В-лимфоцитов, при воздействии ЛПС происходит пролиферация CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов, которые секретируют лимфокины Th1-типа (Mattern T. et al., 1994). По нашим данным, по сравнению с контрольной группой только у низкоустойчивых к гипоксии животных через 3 ч после введения ЛПС наблюдалось уменьшение абсолютного числа CD3+CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов в периферической крови, а у высокоустойчивых крыс через 6 ч – повышение их относительного количества. По данным литературы, снижение количества цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3+CD8+) в периферической крови коррелирует с тяжестью течения абдоминального сепсиса у мышей (Condotta S.A. et al., 2013). Выраженное снижение цитотоксических Т-лимфоцитов у пациентов с сепсисом свидетельствует об иммуносупрессии, которая увеличивает возможность присоединения вторичных инфекций (Harty J.T. et al., 2000; Danahy D.V. et al., 2016). Показано, что у мышей ЛПС стимулирует пролиферацию и дифференцировку CD8+ Т-лимфоцитов, которые способны супрессировать гуморальный иммунный ответ на бактериальные липополисахариды (Baker P.J., 1993). Повышение относительного количества цитотоксических Т-лимфоцитов у высокоустойчивых к гипоксии крыс может обуславливать активную их миграцию из ПАЛМ-зоны селезенки и смещение баланса иммунных реакций преимущественно в сторону клеточных. В то же время снижение числа цитотоксических Т-лимфоцитов в периферической крови у низкоустойчивых к гипоксии животных в ответ на введение ЛПС может свидетельствовать о развитии иммуносупрессии и более тяжелом течении системной воспалительной реакции у этих крыс.

Снижение абсолютного числа CD3+ Т-лимфоцитов в периферической крови наблюдалось только у низкоустойчивых к гипоксии крыс через 6 ч после введения ЛПС. По данным

литературы, у больных сепсисом и септическим шоком снижение числа Т-лимфоцитов в периферической крови свидетельствует об иммуносупрессии (Pravda J., 2014), причем более выраженное снижение числа Т-лимфоцитов на ранних сроках сепсиса и септического шока коррелируют с неблагоприятным прогнозом (Rimmele T. et al., 2016).

По нашим данным, относительное число НК клеток в периферической крови повышалось по сравнению с контрольной группой только у высокоустойчивых к гипоксии крыс через 6 ч после введения ЛПС, что свидетельствует об их миграции в органы-мишени и подтверждается данными литературы: быстрая миграция НК клеток в очаг инфекции наблюдается через 4-6 ч после ее начала (Guo Y. et al., 2017). Снижение абсолютного числа НК клеток в периферической крови наблюдалось только у низкоустойчивых к гипоксии крыс через 3 ч после введения ЛПС. Снижение числа НК клеток может происходить в результате их гибели или миграции и приводить к более тяжелому течению воспалительных реакций (Guo Y. et al., 2017). В исследованиях у больных при синдроме системного воспалительного ответа было показано, что снижение числа НК клеток и $IFN\gamma$ может приводить к иммуносупрессии (Gogos C. et al., 2010; Chiche L. et al., 2011; Pastille E. et al., 2015). Данные литературы о взаимосвязи НК клеток и HIF-1 α противоречивы: показано, что их функционирование и дифференцировка положительно коррелирует с уровнем экспрессии HIF-1 α (Krzywinska E. и Stockmann C., 2018), однако другими исследователями выявлено негативное влияние гипоксии на количество и цитолитическую активность НК клеток (Sceneay J. et al., 2012). Роль НК клеток активно изучается в настоящее время. F. Souza-Fonseca-Guimaraes et al. (2012) предположили, что они оказывают как защитное, так и провоспалительное действие при системных инфекционно-воспалительных заболеваниях в зависимости от тяжести процесса. При этом нарушение функции НК клеток снижает противоинфекционный иммунный ответ (Bohannon J. et al., 2012). По данным литературы, основной функцией НК клеток в различных моделях инфекционных заболеваний является контактный цитолиз, а также синтез $IFN\gamma$ и TNF α (Varma T.K. et al., 2002; Souza-Fonseca-Guimaraes F. et al., 2012; Mandal A. и Viswanathan C., 2015). Известно, что нейтрализация противовоспалительного цитокина IL-10 восстанавливает способность НК клеток секретировать $IFN\gamma$ и повышает выживаемость мышей при сепсисе (Hiraki S. et al., 2012). Как упоминалось выше, снижение продукции клетками селезенки IL-10 после введения ЛПС происходило только у высокоустойчивых к гипоксии крыс. Синтез $IFN\gamma$ и TNF α НК клетками позволяет им регулировать ответ на бактериальные инфекции, усиливая противомикробные функции миелоидных клеток, особенно макрофагов (Guo Y. et al., 2017). $IFN\gamma$ является маркером поляризации иммунного ответа по Th1-типу (Schoenborn J.R. и Wilson C.B., 2007). Повышенное число НК клеток, продуцирующих $IFN\gamma$, косвенно свидетельствует о более высоком уровне его

синтеза у высокоустойчивых к гипоксии крыс, что отражает активацию преимущественно врожденного и клеточного иммунитета.

По нашим данным, содержание неспецифического маркера активации клеточного иммунитета – неоптерина – в сыворотке крови у низкоустойчивых к гипоксии крыс снижалось через 24 ч после введения ЛПС, а у высокоустойчивых животных – не изменялось. Главными клетками, синтезирующими неоптерин под воздействием $IFN\gamma$, являются моноциты и макрофаги, а также дендритные клетки (Свиридов Е.А. и Телегина Т.А., 2005). Поскольку продукция неоптерина активированными моноцитами/макрофагами коррелирует с продукцией АФК данными клетками, неоптерин может служить непрямым маркером развития окислительного стресса в организме при воспалении (Murt C. et al., 1999; Widner B. et al., 2000). Поскольку $IFN\gamma$ – цитокин Th1 профиля, то неоптерин также отражает преимущественную поляризацию иммунного ответа по клеточному типу (Fuchs D. et al., 1993). То, что неоптерин можно рассматривать как маркер Th1 поляризации, подтверждает выявленная M. Ledochowski et al. (2001) сильная обратная корреляционная связь между концентрацией в крови неоптерина и иммуноглобулина Е – маркера Th2-типа иммунного ответа: уменьшение содержания неоптерина в сыворотке крови сопровождается увеличением концентрации иммуноглобулина Е. Таким образом, снижение содержания неоптерина в сыворотке крови у низкоустойчивых к гипоксии крыс через 24 ч после введения ЛПС может косвенно свидетельствовать о преимущественном смещении баланса иммунных реакций в сторону Th2-типа.

Таким образом, у высокоустойчивых к гипоксии крыс повышение относительного количества цитотоксических Т-лимфоцитов и NK клеток в периферической крови через 6 ч после введения ЛПС, а также большее абсолютное количество Т-лимфоцитов и NK клеток через 24 ч по сравнению с низкоустойчивыми, свидетельствуют о смещении баланса иммунных реакций в сторону врожденных и клеточных. По-видимому, у высокоустойчивых к гипоксии крыс отсутствие многократного повышения уровня эндотоксина через 3 ч после введения ЛПС связано с активацией описанных выше защитных механизмов и эффективной элиминацией эндотоксина из крови.

Обследование пациентов с тяжелым сепсисом и синдромом системного воспалительного ответа показало, что при сепсисе превалирует Th2-зависимый ответ (т.е. продукция IL-4, 5, 10 и 13, обеспечивающих гуморальный иммунитет) при угнетении Th1-ответа (т.е. факторов клеточного иммунитета IL-2 и $IFN\gamma$) (Белоцкий С.М. и Авталион Р.Р., 2008; Iwasaka H. и Noguchi T., 2004).

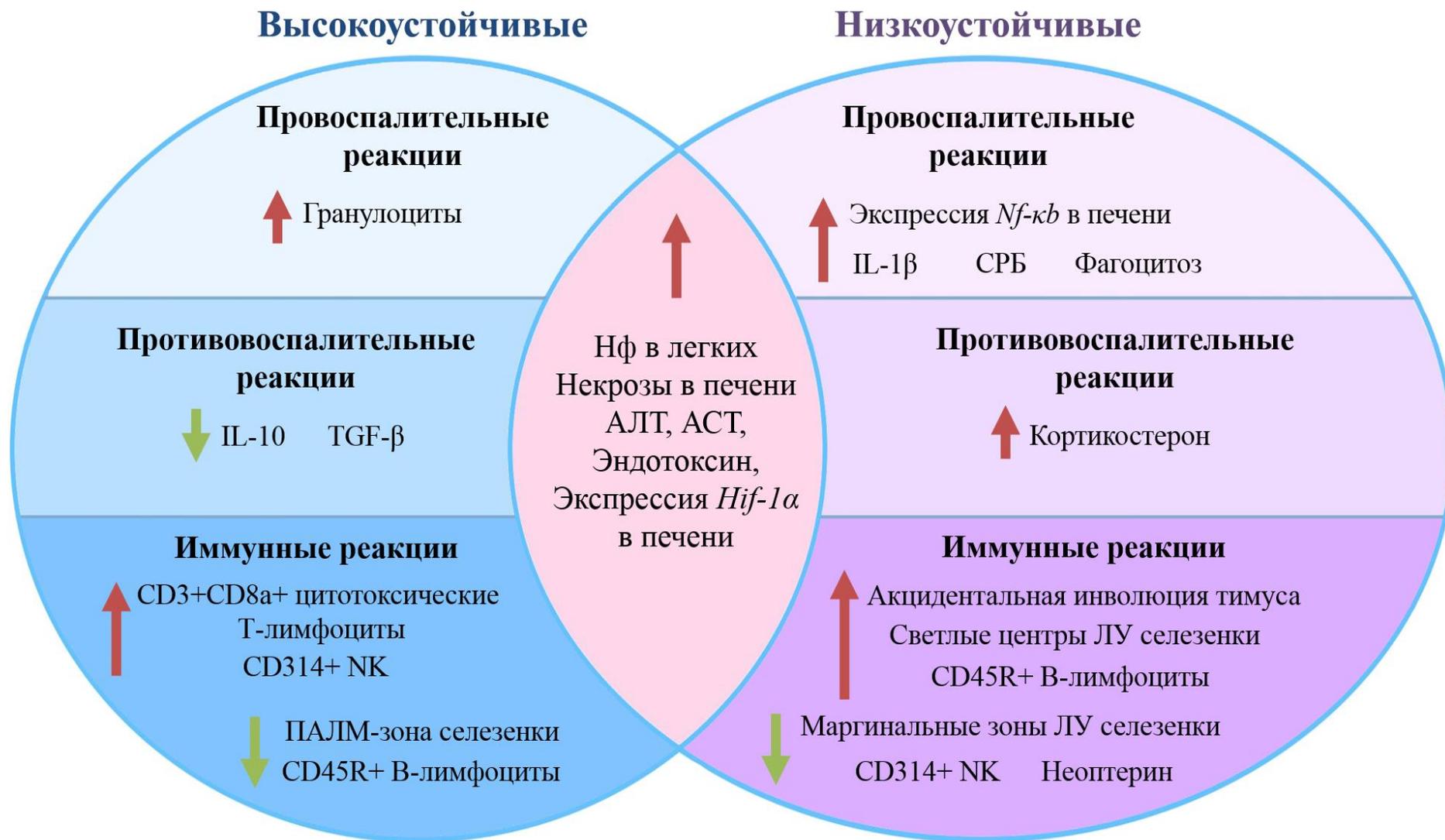


Рис. 58. Схема. Сравнительная характеристика провоспалительных, противовоспалительных и иммунных реакций у животных с разной устойчивостью к гипоксии в ответ на введение ЛПС

Таким образом, высокоустойчивые и низкоустойчивые к гипоксии животные характеризуются различной выраженностью течения системной воспалительной реакции в ответ на введение ЛПС (рис. 58).

У низкоустойчивых к гипоксии крыс после введения ЛПС происходит быстрое и выраженное повышение уровня эндотоксина, увеличивается экспрессия генов *Hif-1 α* и *Nf- κ b* в печени, содержание ИЛ-1 β и С-реактивного белка в сыворотке крови, что сопровождается повышенной инфильтрацией нейтрофилами межальвеолярных перегородок легких, а также большей площадью некрозов в печени по сравнению с высокоустойчивыми животными. По-видимому, быстрая элиминация эндотоксина из крови у низкоустойчивых к гипоксии крыс опосредуется активным фагоцитозом ЛПС макрофагами за счет NIF-зависимого повышения TLR4, а также продукцией антител маргинальной зоной селезенки. У низкоустойчивых к гипоксии крыс расширение светлых центров лимфоидных узелков селезенки, повышение числа В-лимфоцитов в периферической крови, концентрации кортикостерона и снижение числа цитотоксических Т-лимфоцитов и НК клеток в периферической крови, уровня неоптерина в сыворотке крови свидетельствуют о смещении баланса иммунных реакций преимущественно в сторону гуморальных.

У высокоустойчивых к гипоксии животных повышение уровня эндотоксина в сыворотке крови менее выражено, отсутствует статистически значимое увеличение экспрессии гена *Nf- κ b* в печени, не изменяются уровни продукции ИЛ-1 β и С-реактивного белка в сыворотке крови. Содержание противовоспалительных цитокинов ИЛ-10 и TGF- β снижается, что, вероятно, предотвращает развитие иммуносупрессии. Сужение ПАЛМ-зоны селезенки, повышение числа НК клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов, но снижение – В-лимфоцитов в периферической крови свидетельствует о смещении баланса иммунных реакций преимущественно в сторону врожденных и клеточных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Работа посвящена изучению взаимосвязи устойчивости к гипоксии и инфрадианного 4-суточного биоритма концентрации кортикостерона, молекулярно-биологических и морфологических различий высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс в разные сроки после острого гипоксического воздействия, морфологических и молекулярно-биологических особенностей системной воспалительной реакции у животных с разной устойчивостью к недостатку кислорода.

Впервые выявлена зависимость устойчивости к гипоксии от инфрадианного биоритма содержания кортикостерона – в акрофазу его 4-суточного биоритма время жизни животных на критической «высоте» больше, чем в батифазу. Результаты получены на двух линиях крыс – Вистар и Спрейг-Доули, отличающихся по чувствительности к недостатку кислорода. Определение устойчивости к гипоксии целесообразно проводить в календарные даты между акрофазой и батифазой 4-суточного биоритма, что позволит получить оптимальное количество высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии животных.

В ранние сроки после гипоксического воздействия как у высокоустойчивых, так и у низкоустойчивых к гипоксии крыс в печени возрастает экспрессия генов *Hif-1 α* и *Nf- κ b*. Только у низкоустойчивых к гипоксии крыс увеличивается содержание в сыворотке крови маркера окислительного стресса 8-изопростана и TGF- β . Через месяц после гипоксической нагрузки патологических изменений в легких и печени у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс не выявлено. Только у низкоустойчивых крыс отмечается повышенная экспрессия генов *Hif-1 α* и *Vegf* в печени и функциональная активация иммунной системы по сравнению с высокоустойчивыми животными. Полученные данные о молекулярно-биологических и морфологических особенностях реакции на острое гипоксическое воздействие обосновывают сроки проведения экспериментальных исследований на животных с разной устойчивостью к гипоксии.

В ответ на введение ЛПС высокоустойчивые и низкоустойчивые к недостатку кислорода крысы характеризуются разнонаправленными провоспалительными, противовоспалительными и иммунными реакциями. Нами впервые показано, что по сравнению с высокоустойчивыми к гипоксии животными, ЛПС-индуцированный системный воспалительный ответ у крыс с низкой устойчивостью более выражен, что характеризуется большим числом нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких, большей площадью некрозов в печени, высокими уровнями активности АСТ и АЛТ, содержанием эндотоксина, С-реактивного белка и кортикостерона в сыворотке крови. Низкоустойчивые к гипоксии крысы по сравнению с высокоустойчивыми характеризуются повышенной экспрессией генов *Hif-1 α* и *Nf- κ b* в печени.

Содержание провоспалительного IL-1 β в сыворотке крови повышалось после введения ЛПС только у низкоустойчивых к гипоксии крыс, а у высокоустойчивых – не изменялось. У высокоустойчивых животных через 6 ч после введения ЛПС происходит снижение продукции клетками селезенки противовоспалительного цитокина IL-10, а через 24 ч его уровень выше, чем у низкоустойчивых к гипоксии крыс. Через 24 ч после введения ЛПС по сравнению с контрольной группой происходит статистически значимое снижение содержания TGF- β в сыворотке крови у высокоустойчивых к гипоксии животных.

Высокоустойчивые и низкоустойчивые к гипоксии крысы характеризуются разнонаправленной реакцией иммунной системы в ответ на введение ЛПС. По сравнению с высокоустойчивыми у низкоустойчивых крыс более выражено сужение коркового вещества тимуса, а также наблюдается активация В-зоны селезенки, увеличение числа В-лимфоцитов в периферической крови. У высокоустойчивых животных, напротив, в селезенке наблюдается сужение Т-зависимой ПАЛМ-зоны, в периферической крови увеличивается число цитотоксических Т-лимфоцитов и НК клеток. Таким образом, низкоустойчивые к гипоксии крысы характеризуются более выраженной системной воспалительной реакцией, индуцированной введением ЛПС, и смещением баланса иммунных реакций в сторону гуморальных, в то время как высокоустойчивые – преимущественной активацией врожденного и клеточного иммунитета.

Полученные в работе новые данные о морфологических и молекулярно-биологических особенностях системной воспалительной реакции у животных, отличающихся по устойчивости к кислородной недостаточности, необходимо учитывать при дальнейшем изучении механизмов взаимосвязи гипоксии и воспаления и разработке новых подходов для профилактики и лечения инфекционно-воспалительных заболеваний с учетом устойчивости к гипоксии.

ВЫВОДЫ

1. Установлена взаимосвязь 4-суточного биоритма концентрации кортикостерона и устойчивости животных к гипоксии. В период акрофазы инфрадианного биоритма кортикостерона в сыворотке крови время жизни крыс Вистар и Спрейг-Доули на «высоте» выше, чем в батифазу.
2. Независимо от устойчивости к гипоксии через 5 мин после гипоксической нагрузки в печени у самцов крыс Вистар возрастает экспрессия генов – фактора, индуцируемого гипоксией *Hif-1 α* , ядерного фактора *Nf- κ b* и содержание в сыворотке крови сосудистого фактора роста VEGF, у низкоустойчивых к гипоксии животных эти показатели и содержание эритропоэтина в сыворотке крови ниже. Через 90 мин после острого гипоксического воздействия у низкоустойчивых к гипоксии крыс наблюдается повышение концентрации в сыворотке крови 8-изопростана и TGF- β , а у высокоустойчивых их изменений не выявлено.
3. Патологических изменений в легких и печени через месяц после гипоксического воздействия у высокоустойчивых и низкоустойчивых животных не выявлено, но у низкоустойчивых к гипоксии крыс обнаружена повышенная экспрессия генов *Hif-1 α* и *Vegf* в печени. По сравнению с высокоустойчивыми у низкоустойчивых к гипоксии животных наблюдается функциональная активация иммунной системы: увеличение объемной доли маргинальных зон лимфоидных узелков селезенки, а в периферической крови – повышение абсолютного числа цитотоксических Т-лимфоцитов, НК клеток и фагоцитарного показателя.
4. Системная воспалительная реакция, индуцированная ЛПС, у низкоустойчивых к гипоксии животных более тяжелая и характеризуется высокими показателями числа нейтрофилов в легких, площади некрозов в печени, активности ферментов АСТ и АЛТ и уровня эндотоксина в сыворотке крови. По сравнению с высокоустойчивыми у низкоустойчивых к гипоксии крыс выше экспрессия *Hif-1 α* и провоспалительного гена *Nf- κ b* в печени, содержание IL-1 β , С-реактивного белка в сыворотке крови и фагоцитарная активность клеток крови.
5. Системная воспалительная реакция у низкоустойчивых к гипоксии крыс развивается на фоне увеличения содержания кортикостерона, а у высокоустойчивых животных – снижения уровней противовоспалительных цитокинов IL-10 и TGF- β .
6. Системная воспалительная реакция у низкоустойчивых к гипоксии крыс сопровождается смещением баланса иммунных реакций в сторону гуморальных: у них снижено содержание неоптерина в сыворотке крови, наблюдается умеренная акцидентальная инволюция тимуса, гиперплазия В-зон селезенки, повышение числа В-лимфоцитов, но снижение содержания НК клеток в крови. У высокоустойчивых к гипоксии животных баланс иммунных реакций смещается в сторону клеточных и характеризуется активацией ПАЛМ-зоны селезенки и увеличением содержания цитотоксических Т-лимфоцитов и НК клеток в периферической крови.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

O₂ – кислород

CO₂ – углекислый газ

pO₂ – парциальное давление кислорода

АД – артериальное давление

АЛТ – аланинаминотрансфераза

АСТ – аспаратаминотрансфераза

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

ВЖ – время жизни на «высоте»

ВВП – время восстановления позы

ВПП – время первого падения

ВУ – высокоустойчивые

ДВС-синдром – синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИФА – иммуноферментный анализ

кДНК – комплементарная ДНК

ЛПС – липополисахарид

НУ – низкоустойчивые

ПАЛМ – периартериальные лимфоидные муфты

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

СУ – среднеустойчивые

ТНБС – 2,4,6-тринитробензолсульфоновая кислота

ЦНС – центральная нервная система

ЧСС – частота сердечных сокращений

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

АСЕ – Angiotensin I-Converting Enzyme – ангиотензин-1 превращающий фермент (АПФ)

ARNT – Aryl Hydrocarbon Nuclear Receptor Translocator – ядерный транслокатор арильного углеводородного рецептора

Asn – остаток аспарагина

BAFF – B-cell Activating Factor – фактор, активирующий В-клетки

bHLH – basic-Helix-Loop-Helix домен

BPI – Bactericidal/Permeability-Increasing Protein – бактерицидный увеличивающий проницаемость белок
 CBP/p300 – CREB (cAMP-Response Element-Binding Protein)-Binding Protein/E1A Binding Protein p300
 CD – Cluster of Differentiation – кластер дифференцировки
 CDK6 – Cell Division Protein Kinase 6
 COX-2 – Cyclooxygenase-2 – циклооксигеназа-2
 CREB – cAMP-Response Element-Binding Protein
 C-TAD – C-terminal Transcriptional Activity Domain – С-концевой домен транскрипционной активности
 DAMP – Damage-Associated Molecular Patterns – молекулы, связанные с повреждением
 DMOG – Dimethyloxyallyl Glycine – диметилаллил глицин
 eNOS – Endothelial Nitric Oxide Synthase – эндотелиальная NO-синтаза
 EPAS – Endothelial PAS
 EPO – Erythropoietin – эритропоэтин
 ET-1 – Endothelin-1 – эндотелин
 FIH – Factor-Inhibiting HIF – фактор, ингибирующий HIF
 FITC – Fluorescein Isothiocyanate – флуоресцеин изотиоцианат
 FOXP3 – Forkhead Box P3
 GLUT1 – Glucose Transporter 1 – глюкозный переносчик 1
 GT – Gasping Time – время, когда животное начинает задыхаться
 HIF – Hypoxia-Inducible Factor – индуцируемый гипоксией фактор
 HREs – Hypoxia Response Elements – отвечающие на гипоксию элементы
 HSP – Heat Shock Proteins – белки теплового шока
 HST – Hypoxic Survival Time – время выживания в условиях гипоксии
 ICAM-1 – Inter-Cellular Adhesion Molecule 1 – молекула адгезии
 IGF-2 – Insulin-Like Growth Factor-2 – инсулино-подобный фактор роста 2
 IKK – IκB Kinase – киназа ингибитора NF-κB – IκB
 IκB – Inhibitor of NF-κB – ингибитор NF-κB
 IFN – Interferon – интерферон
 Ig – Immunoglobulin – иммуноглобулин
 IL – Interleukin – интерлейкин
 iNOS – Inducible Nitric Oxide Synthase – индуцируемая синтаза оксида азота
 IPAS – Inhibitory PAS

IRAK1 – Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 1 – киназа 1, ассоциированная с рецептором интерлейкина 1
 LAL-тест – Limulus Amebocyte Lysate-тест
 MAPK – Mitogen-Activated Protein Kinase – митоген-активируемая протеинкиназа
 mTOR – Mammalian Target Of Rapamycin – мишень рапамицина у млекопитающих
 MyD88 – Myeloid Differentiation primary response gene-88 – адаптерный белок первичного ответа миелоидной дифференцировки
 NEMO – NF-κB Essential Modulator – основной модулятор NF-κB
 NETs – Neutrophil Extracellular Traps – нейтрофильные внеклеточные ловушки
 NF-κB – Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells – ядерный фактор «каппа-би»
 NIK – NF-κB-Inducing Kinase – NF-κB-индуцирующая киназа
 NK – Natural Killer – естественные киллеры
 NLS – Nuclear Localization Signal – сигнал ядерной локализации
 NO – Nitric Oxide – оксид азота
 N-TAD – N-terminal Transcriptional Activity Domain – N-концевой домен транскрипционной активности
 ODDD – Oxygen-Dependent Degradation Domain – домен кислород-зависимой деградации
 PAI-1 – Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 – ингибитор активации плазминогена 1 типа
 PAMP – Pathogen-Associated Molecular Patterns – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны
 PAS – Per-Arnt-Sim домен
 PBS – Phosphate Buffered Saline – Фосфатно-Солевой Буфер
 PDGFB – Platelet-Derived Growth Factor B – фактор роста тромбоцитов B
 PE – Phycoerythrin – фикоэритрин
 PE-Cy7 – Phycoerythrin-Cyanine 7 – фикоэритрин-цианин 7
 PGF – Placental Growth Factor – фактор роста плаценты
 PHD – Prolyl Hydroxylase Domain protein – пролилгидроксилаза
 PI – Propidium Iodide – пропидий иодид
 PI3K – Phosphatidylinositol 3-Kinase – фосфатидилинозитол 3-киназа
 Pro – остаток пролина
 pVHL – von Hippel-Lindau (VHL) E3 ligase complex – E3-убиквитин-лигазный комплекс Гиппеля-Линдау
 Ser – остаток серина
 SMAD – Similar to Mothers Against Decapentaplegic

SOD2 – Superoxide Dismutase 2 – супероксиддисмутаза

TAB – TAK1-Binding Protein 1 – TAK1-связывающий белок

TAK1 – Transforming Growth Factor Beta-Activated Kinase 1 – активируемая трансформирующим фактором роста- β киназа 1

TGF – Transforming Growth Factor – трансформирующий фактор роста

Th – T-helper – Т-хелпер

TLRs – Toll-Like Receptors – Толл-подобные рецепторы

TNF α – Tumor Necrosis Factor α – фактор некроза опухоли α

TRAF6 – TNF receptor-associated factor 6 – фактор 6, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухоли

UbiQ – UbiQuitin – убиквитин

VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor – фактор роста сосудистого эндотелия

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Автандилов Г.Г. Морфометрия в патологии. – М.: Медицина, 1973. – 248 с.
2. Авцын А.П. Адаптация и дизадаптация с позиций патолога. Клиническая медицина. 1974;52:3-15.
3. Агаджанян Н.А., Хачатурьян М.Л., Панченко Л.А. Влияние острого гипоксического воздействия на устойчивость крыс к гипоксии. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1999;127(6):625-628.
4. Агаджанян Н.А., Чижов А.Я. Классификация гипоксических, гипо- и гиперкапнических состояний. Физиол. журн. 2003;49(3):11-16.
5. Андреева Е.Р., Буравкова Л.Б., Григорьев А.И., Буравков С.В. МСК в условиях «физиологической» гипоксии. М.: ГНЦ РФ-ИМБП РАН, 2016. – 66 с.
6. Байбурина Г.А., Нургалева Е.А., Шибкова Д.З., Башкатов С.А. Способ определения степени устойчивости к гипобарической гипоксии мелких лабораторных животных. Патент РФ №2563059, 2015.
7. Безруков В.В., Парамонова Г.И., Рушкевич Ю.Е., Сыкало Н.В., Тимченко А.Н., Утко Н.А., Холин В.А. Некоторые физиологические показатели и продолжительность жизни у крыс с различной устойчивостью к гипоксии. Пробл. старения и долголетия. 2012;21(4):431-443.
8. Белоцкий С.М., Авталион Р.Р. Воспаление. Мобилизация клеток и клинические эффекты. – М.: БИНОМ, 2008. – 240 с.
9. Березовский В.А. Напряжение кислорода в тканях животных и человека. – Киев: Наукова думка, 1975. – 258 с.
10. Березовский В.А. Гипоксия и индивидуальные особенности реактивности. – Киев: Наукова думка, 1978. – 216 с.
11. Бернштейн А.Д. Человек в условиях среднегорья. – Алма-Ата: Казахстан, 1967. – 218 с.
12. Бродский В.Я., Мальченко Л.А., Дубовая Т.К., Конченко Д.С., Звездина Н.Д. Дофамин, введенный крысе, дезорганизует ритм синтеза белка в гепатоцитах. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2014;157(2):182-185.
13. Ведунова М.В., Сахарнова Т.А., Митрошина Е.В., Шишкина Т.В., Астраханова Т.А., Мухина И.В. Антигипоксические и нейропротективные свойства нейротрофических факторов BDNF и GDNF при гипоксии *in vitro* и *in vivo*. СТМ. 2014;6(4):38-47.
14. Воронина Т.А. Мексидол. Основные нейропсихотропные эффекты и механизм действия. Поликлиника. 2009;№5:32-36.
15. Газенко О.Г. Физиология человека в условиях высокогорья. – М.: Наука, 1987. – 530 с.
16. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1999. – 459 с.

17. Грек О.Р., Ефремов А.В., Грек О.О. Уровень гормонов и метаболизм ксенобиотиков у крыс с различным фенотипом устойчивости к гипоксии. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2002;65(1):53-55.
18. Грек О.Р., Ефремов А.В., Шарапов В.И. Гипобарическая гипоксия и метаболизм ксенобиотиков. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 120 с.
19. Гржибовский А.М., Иванов С.В., Горбатова М.А. Сравнение количественных данных двух независимых выборок с использованием программного обеспечения Statistica и SPSS: параметрические и непараметрические критерии. Наука и здравоохранение. 2016;№2:5-28.
20. Гуревич Г.И., Шадурский К.С. Повышение устойчивости организма к недостатку кислорода с помощью фармакологических средств. – В кн.: Авиационная и космическая медицина. М.: 1963. – 143-146 с.
21. Децеровский А.В., Лукк А.А. Выделение регулярных составляющих во временных вариациях геофизических параметров методом разложения на негармонические компоненты. Вулканология и сейсмология. 2002;№5:65-78.
22. Джалилова Д.Ш., Диатроптова М.А., Мхитаров В.А., Диатроптов М.Е. Инфраниантные ритмы устойчивости самцов крыс Вистар к диссоциативному анестетику в норме и после хирургического удаления надпочечников и семенников. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2018;166(9):392-396.
23. Диатроптов М.Е., Косырева А.М., Макарова О.В., Кондашевская М.В., Нечай В.В. Инфраниантные ритмы уровня кортикостерона и выраженности альтеративных изменений печени у крыс Вистар при системном воспалительном ответе. Морфологические ведомости. 2013;2:25-32.
24. Диатроптов М.Е., Макарова О.В., Диатроптова М.А. Закономерности инфраниантных биоритмов митотической активности эпителия пищевода у японских перепелов (*Coturnix Japonica*) и крыс Вистар. Геофизические процессы и биосфера. 2014;13(4):82-96.
25. Диатроптов М.Е. Морфофункциональные параметры эндокринной и иммунной системы и пролиферативная активность эпителия в инфранианном диапазоне биоритмов. Диссертация на соискание уч. ст. докт. биол. наук, 2015.
26. Домбровская Ю.Ф. Клиника и патогенез гипоксемии растущего организма, Клинико-экспериментальные наблюдения. – М.: Медгиз, 1961. – 255 с.
27. Зарубина И.В., Юнусов И.А. Роль печеночно-почечной недостаточности при синдроме длительного раздавливания и основные принципы ее фармакологической коррекции. Обзоры по клин. фармакол. и лек. терапии. 2009;7(1):37-60.

28. Зарубина И.В. Современные представления о патогенезе гипоксии и ее фармакологической коррекции. *Обзоры по клин. фармакол. и лек. терапии.* 2011;9(3):31-48.
29. Зиновьев Ю.В., Козлов С.А., Савельев О.Н. Резистентность к гипоксии. – Красноярск: Издательство Красноярского университета, 1988. – 176 с.
30. Золотарева А.Д., Глотов О.С., Асеев М.В., Вашукова Е.С., Щербак С.Г. Изучение полиморфизма генов, вовлеченных в HIF-1A индуцированную гипоксию альпинистов. *ТиПФК.* 2017;6:51-53.
31. Исхаки Ю.Б., Жаворонков А.А., Ростовщиков А.С. Дыхательные пути и высокогорье. – Душанбе: Ирфон, 1989. – 128 с.
32. Казначеев В.П. Механизмы адаптации человека в условиях высоких широт. – Л.: Медицина, 1980. – 200 с.
33. Капланский А.С. Иммуноморфологическое и цитохимическое исследование защитных систем организма при гипоксии и гипероксии. Автореферат дисс. на соискание уч. ст. докт. мед. наук, 1974.
34. Каркищенко Н.Н. Биомедицинское (доклиническое) изучение антигипоксической активности лекарственных средств. Методические рекомендации. – М.: ФМБА России, 2017. – 98 с.
35. Кирова Ю.И., Германова Э.Л., Лукьянова Л.Д. Фенотипические особенности динамики содержания HIF-1 α в неокортексе крыс при различных режимах гипоксии. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2012;154(12):681-686.
36. Комелькова М.В. Определение уровня иммунного ответа и кислородзависимых процессов во внутренних органах крыс в зависимости от чувствительности к гипоксии. Диссертация на соискание уч. ст. канд. биол. наук, 2015.
37. Колчинская А.З. Недостаток кислорода и возраст. – Киев: Наукова Думка, 1964. – 336 с.
38. Корнеев А.А., Комиссарова И.А., Нарциссов Я.Р. Использование глутатиона в качестве протекторного средства при гипоксическом воздействии. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 1993;№9:261-263.
39. Косырева А.М. Половые и возрастные различия морфофункциональных изменений иммунной системы и воспалительного ответа при экспериментальной эндотоксинемии. Диссертация на соискание уч. ст. докт. биол. наук, 2018.
40. Косырева А.М., Джалилова Д.Ш., Цветков И.С., Диатроптов М.Е., Макарова О.В. Возрастные особенности устойчивости к гипоксии и выраженности индуцированной липополисахаридом системной воспалительной реакции у крыс Вистар. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2018;166(11):652-657.

41. Кривошеков С.Г., Балиоз Н.В., Некипелова Н.В., Капилевич Л.В. Возрастные, гендерные и индивидуально-типологические особенности реагирования на острое гипоксическое воздействие. Физиология человека. 2014;40(6):34-45.
42. Крыжановский Г.Н., Агаджанян Н.А., Торшин В.И., Старых Е.В. Коразоловый киндлинг у крыс с разной устойчивостью к гипоксии. 1991;112(9):240-243.
43. Кубасов Р.В. Гормональные изменения в ответ на экстремальные факторы внешней среды. Вестник Российской Академии Медицинских Наук. 2014;9-10:102-109.
44. Кузина О.В., Цейликман О.Б., Лапшин М.С., Козочкин Д.А., Комелькова М.В., Цейликман В.Э. Соотношение между уровнем поведенческой активности, концентрацией циркулирующего кортикостерона у крыс с различной устойчивостью к гипоксии. Вестник ЮУрГУ. 2014;14(4):54-58.
45. Левченкова О.С., Новиков В.Е. Антигипоксанты: возможные механизмы действия и клиническое применение. Вестник Смоленской государственной медицинской академии. 2011;№4:43-57.
46. Линева А. Физиологические показатели нормы животных. Справочник. – М.: «Аквариум ЛТД», К.: ФГУИППВ, 2003. – 256 с.
47. Лисянская О.Ю. Гипоксия – ведущий фактор прогрессирования хронической болезни почек. Почки. 2016;№1(15):64-66.
48. Литвицкий П.Ф. Воспаление. Вопросы современной педиатрии. 2006;5(6):60-63.
49. Лукьянова Л.Д., Богомолов В.И. Сравнительный анализ белков коры головного мозга крыс с разной чувствительностью к гипоксии. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1992;114(12):657-660.
50. Лукьянова Л.Д., Курлаев С.Н. О роли норадреналина в регуляции окислительного метаболизма миокарда крыс с разной резистентностью к гипоксии. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1992;114(12):586-588.
51. Лукьянова Л.Д. Биоэнергетическая гипоксия: понятие, механизмы и способы коррекции. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1997;124(9):244-254.
52. Лукьянова Л.Д. Молекулярные механизмы тканевой гипоксии и адаптации организма. Физиол. журн. 2003;49(3):17-35.
53. Лукьянова Л.Д. Фармакологическая коррекция митохондриальной дисфункции при гипоксии. Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические и медицинские аспекты. – М.: 2004. – С. 456.
54. Лукьянова Л.Д., Германова Э.Л., Копаладзе Р.А. Закономерности формирования резистентности организма при разных режимах гипоксического прекодиционирования: роль

гипоксического периода и реоксигенации. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2009;147(4):380-384.

55. Лукьянова Л.Д., Кирова Ю.И. Влияние гипоксического прекондиционирования на свободнорадикальные процессы в тканях крыс с различной толерантностью к гипоксии. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2011;151(3):263-268.

56. Макарова О.В. Морфологические основы реактивности легких при адаптации к гипоксии и при воспалительных процессах. Диссертация на соискание уч. ст. докт. мед. наук, 1997.

57. Макарова О.В., Михайлова Л.П., Сидорова Е.И., Сладкопечев А.С., Никонова Е.В. Сравнительная структурно-функциональная характеристика легких крыс Вистар и Спрейг-Доули. Клиническая и экспериментальная морфология. 2012;№4:49-52.

58. Малкин В.Б., Гиппенрейтер Е.Б. Острая и хроническая гипоксия. – М.: Наука, 1977. – 318 с.

59. Манухина Е. Б., Дауни Х. Ф., Маллет Р. П., Малышев И. Ю. Защитные и повреждающие эффекты периодической гипоксии: роль оксида азота. Вестн. Рос. АМН. 2007;№2:25–33.

60. Марачев А.Г. Морфо-функциональные основы адаптации и патологии легких, сердца и красной крови человека в условиях крайнего севера. Автореферат дисс. на соискание уч. ст. докт. мед. наук, 1980. – 60 с.

61. Мастицкий С.Э. Методическое пособие по использованию программы STATISTICA при обработке данных биологических исследований. – Мн.: РУП «Институт рыбного хозяйства», 2009. – 76 с.

62. Матюшин А.И., Семенов М.Х., Семенов Х.Х. Селекция высокочувствительных к гипоксии крыс и особенности их реакции на действие природных антигипоксантов. Вестник новых медицинских технологий. 2007;XIV(1):206-208.

63. Меерсон Ф.З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. – М.: Медицина, 1984. – 272 с.

64. Меерсон Ф.З. Адаптационная медицина: механизмы и защитные эффекты адаптации. – М.: Нурохиа Medical LTD, 1993. – 331 с.

65. Мишнев О.Д., Щеголев А.И., Лысова Н.Л., Тинькова И.О. Печень и почки при эндотоксинемии. – М.: Издательство РГМУ, 2003. – 211 с.

66. Муздубаева Б.Т. Патогенез нарушений кровообращения при сепсисе. Клиническая физиология кровообращения. 2016;13(3):131-138.

67. Назаренко Г.И., Кишкун А.А. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. – М.: Медицина, 2006. – 544 с.

68. Новицкий В.В., Гольдберг Е.Д., Уразова О.И. Патофизиология: учебник в 2 т. – ГЭОТАР-Медиа, 2009. Т.1. – 848 с.

69. Огороков А.И. Диагностика болезней сердца и сосудов. Диагностика болезней внутренних органов: т.6. – М.: Мед. Лит., 2002. – 464 с.
70. Петров И.Р. Кислородное голодание головного мозга. – Л.: Медгиз, 1949. – 293 с.
71. Писарев В.Б., Богомолова Н.В., Новочадов В.В. Бактериальный эндотоксикоз: взгляд патолога. – Волгоград: Издательство Вол. ГМУ, 2008. – 208 с.
72. Почуев В.И. Совершенствование системы оценки состояния здоровья космонавтов и медицинского контроля на этапах подготовки в целях врачебной экспертизы. Автореферат дисс. на соискание уч. ст. канд. мед. наук, 2007.
73. Рафиков А.М., Агаджанян Н.А. Суточные колебания устойчивости организма к стрессорным воздействиям. Пат. физиол. экспер. терапия. 1971;15(1):60-62.
74. Рябов Г.А. Синдромы критических состояний. – М.: Медицина, 1994. – С. 368.
75. Саноцкая Н.В., Мациевский Д.Д., Лебедева М.А. Изменение гемодинамики и дыхания крыс с различной чувствительностью к острой гипоксии. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2004;138(7):24-28.
76. Сатурская А.С. Особенности баланса про- и противовоспалительных цитокинов при экспериментальном диффузном кардиосклерозе у крыс в зависимости от их врожденной устойчивости к гипоксии. Математическая морфология. Электронный математический и медико-биологический журнал. 2015;14(1):1-6.
77. Сатурская А.С. Изменение концентрации фактора некроза опухолей-альфа при моделировании диффузного кардиосклероза у крыс с разной устойчивостью к гипоксии. Патологическая физиология, Вестник ВГМУ. 2015;14(3):32-37.
78. Сатурская А.С., Бондаренко Ю.И., Потиха Н.Я. Влияние индивидуальной резистентности организма к гипоксии на состояние гуморального иммунитета при смоделированном экспериментальном диффузном кардиосклерозе. Journal of Education, Health and Sport. 2015;5(3):207-217.
79. Свинов М.М., Захарова Е.И., Косицын Н.С. Ультраструктурные особенности синапсов I слоя коры мозга крыс с низкой и высокой устойчивостью к гипоксии. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2001;131(5):587-590.
80. Свиридов Е.А., Телегина Т.А. Неоптерин и его восстановленные формы: биологическая роль и участие в клеточном иммунитете. Успехи биологической химии. 2005;45:355-390.
81. Семенов Х.Х. Выведение оппозитных линий крыс по чувствительности к острой гипобарической гипоксии. Биомедицина. 2006;№2:129-132.
82. Семенов Х.Х., Каркищенко Н.Н., Казакова Л.Х., Бескова Т.Б., Лушниковая З.С., Егорова И.Ю., Матвеевко Е.Л. Межлинейные различия в чувствительности к острой гипобарической гипоксии у инбредных мышей коллекционного фонда. Биомедицина. 2013;№1:78-88.

83. Серебровская Т.В. Особенности индивидуальной адаптации человека к гипоксии в зависимости от реактивности системы дыхания. Автореферат дисс. на соискание уч. ст. докт. биол. наук, 1988.
84. Середенко М.М. К вопросу о некоторых особенностях реакции старческого организма на острую гипоксию, в кн.: «Кислородная недостаточность». – К.: Издательство АН УССР, 1963.
85. Скулачев В.П. Явления запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: роль активных форм кислорода. Соросовский Образовательный журн. 2001;7(6):4-10.
86. Слепнева Л.В., Хмылова Г.А. Механизм повреждения энергетического обмена при гипоксии и возможные пути его коррекции фумаратсодержащими растворами. Трансфузиология. 2013;№2:49-65.
87. Соболева М.К., Колпаков М.А., Шарапов В.И., Грек О.Р. Особенности обмена железа и состояние системы трансферрин-церулоплазмин у крыс с различной устойчивостью к гипоксии. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1993;115(6):614-616.
88. Солкин А.А., Белявский Н.Н., Кузнецов В.И., Николаева А.Г. Основные механизмы формирования защиты головного мозга при гипоксии. Вестник ВГМУ. 2012;11(1):6-14.
89. Сороковой В.И. Механизмы развития повреждения ультраструктуры и функций митохондрий и плазмалеммы при дезэнергизации клетки. Автореферат дисс. на соискание уч. ст. докт. мед. наук, 1984. – 32 с.
90. Сосин Д.В., Евсеев А.В., Правдивцев В.А., Евсеева О.А. Фармакологическая коррекция острой экзогенной гипоксии антигипоксантами. Вестник Смоленской государственной медицинской академии. 2015;14(1):46-71.
91. Фролов Б.А. Гипоксия. – Оренбургская государственная медицинская академия. Оренбург, 2012. – 216 с.
92. Чернобаева Г.Н., Лукьянова Л.Д. Роль индивидуальной резистентности к гипоксическому фактору при поиске антигипоксантов и оценке эффективности их действия. В сб. «Фармакологическая коррекция гипоксических состояний» под ред. Л.Д. Лукьяновой. – М. – 1989.
93. Чеснокова Н.П., Понукалина Е.В., Бизенкова М.Н. Современные представления о патогенезе гипоксий. Классификация гипоксий и пусковые механизмы их развития. Современные наукоемкие технологии. 2006;№5:23-27.
94. Чеснокова Н.П., Понукалина Е.В., Бизенкова М.Н. Молекулярно-клеточные механизмы цитотоксического действия гипоксии. Патогенез гипоксического некробиоза. Современные наукоемкие технологии. 2006;№7:32-40.

95. Хачатурьян М.Л. Изменение устойчивости крыс к гипоксии при росте солнечной активности. Журнал научных статей «Здоровье и образование в XXI веке». 2012;14(4):508-509.
96. Ходорович Н.А., Эттеева Н.В. Нарушение макро- и микроэлементного гомеостаза в условиях асептического воспаления у животных с различной резистентностью к гипобарической гипоксии. Вестник РУДН. 2003;№2:77-81.
97. Шабатура Н.Н. Механизм происхождения инфрадианных биологических ритмов. Успехи физиологических наук. 1989;20(3):86-103.
98. Шарапов В.И., Начаров Ю.В., Грек О.Р., Якобсон Г.С. Влияние острой гипоксии на жирнокислотный состав и перекисное окисление липидов микросомных мембран печени и плазмы крови у крыс с различной резистентностью к недостатку кислорода. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1993;115(7):592-594.
99. Шустов Е.Б., Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Семенов Х.Х. Анализ параметров индивидуальной устойчивости лабораторных животных к гипоксии в интересах биологического моделирования нейропротекторного и антигипоксического действия лекарственных средств. Биомедицина. 2013;№4:149-157.
100. Шустов Е.Б., Каркищенко Н.Н., Дуля М.С., Семенов Х.Х., Оковитый С.В., Радько С.В. Экспрессия гипоксия-индуцибельного фактора HIF1 α как критерий развития гипоксии тканей. Биомедицина. 2015;№4:4-15.
101. Abbott R.K., Thayer M., Labuda J., Silva M., Philbrook P., Cain D.W., Kojima H., Hatfield S., Sethumadhavan S., Ohta A., Reinherz E.L., Kelsoe G., Sitkovsky M. Germinal center hypoxia potentiates immunoglobulin class switch recombination. J Immunol. 2016;197(10):4014-4020.
102. Adamik B., Zielinski S., Smiechowicz J., Kubler A. Endotoxin elimination in patients with septic shock: an observation study. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2015;63(6):475-483.
103. Aguilera-Aguirre L., Bacsi A., Radak Z., Hazra T.K., Mitra S., Sur S., Brasier A.R., Ba X., Boldogh I. Innate inflammation induced by the 8-oxoguanine DNA glycosylase-1–KRAS–NF- κ B pathway. J Immunol. 2014;193(9):4643-4653. doi: 10.4049/jimmunol.1401625.
104. Ainslie P.N., Barach A., Cummings K.J., Murrell C., Hamlin M., Hellemans J. Cardiorespiratory and cerebrovascular responses to acute poikilocapnic hypoxia following intermittent and continuous exposure to hypoxia in humans. J Appl Physiol. 2007;102(5):1953-1961.
105. Akakura N., Kobayashi M., Horiuchi I. Constitutive expression of hypoxia-inducible factor-1 renders pancreatic cancer cells resistant to apoptosis induced by hypoxia and nutrient deprivation. Cancer Research. 2001;61(17):6548-6554.
106. Akhurst R.J., Derynck R. TGF-beta signaling in cancer-a double-edged sword. Trends Cell Biol. 2001;11(11):S44-51.

107. Ambreen F., Ismail M., Qureshi I.Z. Association of gene polymorphism with serum levels of inflammatory and angiogenic factors in Pakistani patients with age-related macular degeneration. *Mol Vis.* 2015;21:985-999.
108. Anand R.J., Gribar S.C., Li J., Kohler J.W., Branca M.F., Dubowski T., Sodhi C.P., Hackam D.J. Hypoxia causes an increase in phagocytosis by macrophages in a HIF-1alpha-dependent manner. *J Leukoc Biol.* 2007;82(5):1257-1265.
109. Andersson J., Melchers F., Galanos C., Luderitz O. The mitogenic effect of lipopoly- saccharide on bone marrow-derived mouse lympho- cytes. Lipid A as the mitogenic part of the molecule. *J Exp Med.* 1973;137(4):943-953.
110. Appelhoff R.J., Tian Y.M., Raval R.R., Turley H., Harris A.L., Pugh C.W., Ratcliffe P.J., Gleadle J.M. Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem.* 2004;279(37):38458-38465.
111. Askew E.W. Work at high altitude and oxidative stress: antioxidant nutrients. *Toxicology.* 2002;180:107-119.
112. Avellanas Chavala M.L. A journey between high altitude hypoxia and critical patient hypoxia: What can it teach us about compression and the management of critical disease? *Med Intensiva.* 2018;42(6):380-390. doi: 10.1016/j.medin.2017.08.006.
113. Azad P., Stobdan T., Zhou D., Hartley I., Akbari A., Bafna V., Haddad G.G. High-altitude adaptation in humans: from genomics to integrative physiology. *J Mol Med.* 2017;95(12):1269-1282. doi: 10.1007/s00109-017-1584-7.
114. Baker P.J. Effect of endotoxin on suppressor T cell function. *Immunobiology.* 1993;187(3-5):372-381.
115. Bakker J., Nijsten M.W.N., Jansen T.C. Clinical use of lactate monitoring in critically ill patients. *Ann Intensive Care.* 2013;3:12. doi: 10.1186/2110-5820-3-12.
116. Bandarra D., Biddlestone J., Mudie S., Muller H., Arno J., Rocha S. HIF-1 α restricts NF- κ B-dependent gene expression to control innate immunity signals. *Dis Model Mech.* 2015;8(2):169-181. doi: 10.1242/dmm.017285.
117. Bandarra D., Rocha S. HIF-1 α a novel piece in the NF- κ B puzzle. *Inflammation Cell Signaling.* 2015;2:e792. doi: 10.14800/ics.792.
118. Barber A.E., Coyle S.M., Fischer E., Smith C., van der Poll T., Shires G.T., Lowry S.F. Influence of hypercortisolemia on soluble tumor necrosis factor receptor II and interleukin-1 receptor antagonist responses to endotoxin in human beings. *Surgery.* 1995;118(2):406-411.
119. Barber R.C., Chang L.Y., Arnoldo B.D., Purdue G.F., Hunt J.L., Horton J.W., Aragaki C.C. Innate immunity SNPs are associated with risk for severe sepsis after burn injury. *Clin Med Res.* 2006;4(4):250-255.

120. Barbi J., Pardoll D., Pan F. Metabolic control of the Treg/Th17 axis. *Immunol Rev.* 2013;252(1):52-77. doi: 10.1111/imr.12029.
121. Barcroft J. Anoxemia. *Lancet.* 1920;199(5062):485-489.
122. Bardos J.I., Ashcroft M. Negative and positive regulation of HIF-1: a complex network. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1755(2):107-120.
123. Barnes P.J. Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010;120(2-3):76-85. doi: 10.1016/j.jsbmb.2010.02.018.
124. Basu R. K., Hubchak S., Hayashida T., Runyan C. E., Schumacker P. T., Schnaper H. W. Interdependence of HIF-1 α and TGF- β /Smad3 signaling in normoxic and hypoxic renal epithelial cell collagen expression. *Am J Physiol.* 2011;300(4):F898-F905.
125. BelAiba R.S., Bonello S., Zahringer C., Schmidt S., Hess J., Kietzmann T., Gorchach A. Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1 α transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB in pulmonary artery smooth muscle cells. *Mol Biol Cell.* 2007;18(12):4691-4697.
126. Beltempo M., Viel-Therault I., Thibeault R., Julien A.S., Piedboeuf B. C-reactive protein for late-onset sepsis diagnosis in very low birth weight infants. *BMC Pediatr.* 2018;18(1):16.
127. Ben-Shoshan J., Afek A., Maysel-Auslender S., Barzelay A., Rubinstein A., Keren G., George J. HIF-1 α overexpression and experimental murine atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(5):665-670. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.183319.
128. Berra E., Milanini J., Richard D. E., Le Gall M., Vinals F., Gothie E., Roux D., Pages G., Pouyssegur J. Signaling angiogenesis via p42/p44 MAP kinase and hypoxia. *Biochem. Pharmacol.* 2000;60:1171-1178.
129. Berra E., Pages G., Pouyssegur J. MAP kinases and hypoxia in the control of VEGF expression. *Cancer Metastasis Rev.* 2000;19(1-2):139-145.
130. Berra E., Benizri E., Ginouves A., Volmat V., Roux D., Pouyssegur J. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 α in normoxia. *EMBO J.* 2003;22(16):4082-4090.
131. Bert P. La pression barometrique; recherches de physiologie experimentale. – Paris, G. Masson, 1878. – 1168 p.
132. Beutler B., Cerami A. The biology of catechin/TNF. A primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol.* 1998;625-655.
133. Bhagi S., Srivastava S., Singh S.B. High-altitude pulmonary edema: review. *J Occup Health.* 2014;56(4):235-243.
134. Bhatia B., Thomas S., Purkayastha S.S. Seasonal variations in the survival index of rats at simulated high altitudes. *Int J Biometeor.* 1966;10(1):63-69.

135. Bhowmick N.A., Ghiassi M., Bakin A., Aakre M., Lundquist C.A., Engel M.E., Arteaga C.L., Moses H.L. Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol Biol Cell*. 2001;12(1):27-36.
136. Bicher H.I., Bruley D.F., Reneau D.D., Knisely M.H. Autoregulation of oxygen supply to microareas of brain tissue under hypoxic and hyperbaric conditions. *Bubl Anat*. 1973;11:526-531.
137. Bickler P.E. Clinical perspectives: neuroprotection lessons from hypoxia-tolerant organisms. *J Exp Biol*. 2004;207(18):3243-3249.
138. Biddlestone J., Bandarra D., Rocha S. The role of hypoxia in inflammatory disease. *Int J Mol Med*. 2015;35:859-869.
139. Biju M.P., Neumann A.K., Bensinger S.J., Johnson R.S., Turka L.A., Haase V.H. Vhlh gene deletion induces Hif-1-mediated cell death in thymocytes. *Mol. Cell. Biol*. 2004;24:9038-9047.
140. Billard M.J., Gruver A.L., Sempowski G.D. Acute endotoxin-induced thymic atrophy is characterized by intrathymic inflammatory and wound healing responses. *PLoS One*. 2011;6(3):e17940. doi: 10.1371/journal.pone.0017940.
141. Bitzer M., von Gersdorff G., Liang D., Dominguez-Rosales A., Beg A., Rojkind M., Bottinger E.P. A mechanism of suppression of TGF-beta/SMAD signaling by NF-kappa B/RelA. *Genes Dev* 2000;14(2):187-197.
142. Blackwell T.S., Yull F.E., Chen C.-L., Verkatakrisnan A., Blackwell T.R., Hicks D.J., Lancaster L.H., Christman J.W., Kerr L.D. Multiorgan nuclear factor kappa B activation in a transgenic mouse model of systemic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162(3 Pt 1):1095-1101.
143. Blouin C.C., Page E.L., Soucy G.M., Richard D.E. Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: implication of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Blood*. 2004;103(3):1124-1130.
144. Bohannon J., Guo Y., Sherwood E.R. The role of natural killer cells in the pathogenesis of sepsis: the ongoing enigma. *Crit Care*. 2012;16(6):185. doi: 10.1186/cc11881.
145. Bonello S., Zahringer C., BelAiba R.S., Djordjevic T., Hess J., Michiels C., Kietzmann T., Gorlach A. Reactive oxygen species activate the HIF-1alpha promoter via a functional NFkappaB site. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(4):755-761.
146. Bosmann M., Ward P. A. The inflammatory response in sepsis. *Trends Immunol*. 2013;34(3):129-136. doi:10.1016/j.it.2012.09.004.
147. Bornstein S.R., Ziegler C.G., Krug A.W., Kanczkowski W., Rettori V., McCann S.M., Wirth M., Zacharowski K. The role of Toll-like receptors in the immune-adrenal crosstalk. *Ann NY Acad Sci*. 2006;1088:307-318.
148. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*. 2010;33(5):657-670.

149. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;03(5663):1532-1535.
150. Bronte V., Pittet M.J. The spleen in local and systemic regulation of immunity. *Immunity*. 2013;39(5):806-818. doi: 10.1016/j.immuni.2013.10.010.
151. Brooks J. T., Elvidge G.P., Glenny L., Gleadle J.M., Liu C., Ragoussis J., Smith T.G., Talbot N.P., Winchester L., Maxwell P.H., Robbins P.A. Variations within oxygen-regulated gene expression in humans. *J. Appl. Physiol.* 2008;106(1):212-220. doi: 10.1152/jappphysiol.90578.2008.
152. Brown K.A., Brain S.D., Pearson J.D., Edgeworth J.D., Lewis S.M., Treacher D.F. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet*. 2006;368(9530):157-169.
153. Bupha-Intr T., Haizlip K.M., Janssen P.M. Role of endothelin in the induction of cardiac hypertrophy in vitro. *PLoS ONE*. 2012;7(8):e43179. doi: 10.1371/journal.pone.0043179.
154. Burger D., Xenocostas A., Feng Q.P. Molecular basis of cardioprotection by erythropoietin. *Curr Mol Pharmacol*. 2009;2(1):56-69.
155. Burtscher M., Mairer K., Wille M., Gatterer H., Ruedl G., Faulhaber M., Sumann G. Short-term exposure to hypoxia for work and leisure activities in health and disease: which level of hypoxia is safe? *Sleep Breath*. 2012;16(2):435-442. doi: 10.1007/s11325-011-0521-1.
156. Buttenschoen K., Radermacher P., Bracht H. Endotoxin elimination in sepsis: physiology and therapeutic application. *Langenbecks Arch Surg*. 2010;395(6):597-605. doi: 10.1007/s00423-010-0658-6.
157. Campbell E.L., Bruyninckx W.J., Kelly C.J., Glover L.E., McNamee E.N., Bowers B.E., Bayless A.J., Scully M., Saeedi B.J., Golden-Mason L., Ehrentraut S.F., Curtis V.F., Burgess A., Garvey J.F., Sorensen A., Nemenoff R., Jedlicka P., Taylor C.T., Kominsky D.J., Colgan S.P. Transmigrating neutrophils shape the mucosal microenvironment through localized oxygen depletion to influence resolution of inflammation. *Immunity*. 2014;40(1):66-77. doi: 10.1016/j.immuni.2013.11.020.
158. Campbell E.L., Colgan S.P. Neutrophils and inflammatory metabolism in antimicrobial functions of the mucosa. *J Leukoc Biol*. 2015;98(4):517-22. doi: 10.1189/jlb.3MR1114-556R.
159. Cane G., Ginouves A., Marchetti S., Busca R., Pouyssegur J., Berra E., Hofman P., Vouret-Craviari V. HIF-1 α mediates the induction of IL-8 and VEGF expression on infection with Afa/Dr diffusely adhering *E. coli* and promotes EMT-like behaviour. *Cell Microbiol*. 2010;12(5):640-653. doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01422.x.
160. Cannon J.G., Tompkins R.G., Gelfand J.A., Michie H.R., Stanford G.G., van der Meer J.W., Endres S., Lonnemann G., Corsetti J., Chernow B., Wilmore D.W., Wolff S.M., Burke J.F., Dinarello C.A. Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever. *J Infect Dis*. 1990;161(1):79-84.

161. Cardinal-Fernandez P., Ferruelo A., El-Assar M., Santiago C., Gomez-Gallego F., Martin-Pellicer A., Frutos-Vivar F., Penuelas O., Nin N., Esteban A., Lorente J.A. Genetic predisposition to acute kidney injury induced by severe sepsis. *J Crit Care.* 2013;28(4):365-370. doi: 10.1016/j.jcrc.2012.11.010.
162. Carmeliet P., Dor Y., Herbert J.M., Fukumura D., Brusselmans K., Dewerchin M., Neeman M., Bono F., Abramovitch R., Maxwell P., Koch C.J., Ratcliffe P., Moons L., Jain R.K., Collen D., Keshert E. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature.* 1998;394(6692):485-490.
163. Carreau A., El Hafny-Rahbi B., Matejuk A., Grillon C., Kieda C. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J Cell Mol Med.* 2011;15(6):1239-1253. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01258.x.
164. Carrier B. Alaska air medical escort training manual. Chapter 4: Hypoxia and Oxygenation. – Juneau A.K., 2006. – 71-82.
165. Castellheim A., Brekke O.L., Espevik T., Harboe M., Mollnes T.E. Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Scand J Immunol.* 2009;69(6):479-491.
166. Cavadas M.A.S., Cheong A., Taylor C.T. The regulation of transcriptional repression in hypoxia. *Exp Cell Res.* 2017;356(2):173-181. doi: 10.1016/j.yexcr.2017.02.024.
167. Cavaillon J.M., Annane D. Compartmentalization of the inflammatory response in sepsis and SIRS. *J Endotoxin Res.* 2006;12(3):151-170.
168. Ceradini D.J., Kulkarni A.R., Callaghan M.J., Tepper O.M., Bastidas N., Kleinman M.E., Capla J.M., Galiano R.D., Levine J.P., Gurtner G.C. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med.* 2004;10:858-864.
169. Cerutti A., Cols M., Puga I. Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(2):118-132. doi: 10.1038/nri3383.
170. Ceyran A.B., Şenol S., Guzelmeric F., Tuncer E., Tongut A., Ozbek B., Savluk O., Aydin A., Ceyran H. Effects of hypoxia and its relationship with apoptosis, stem cells, and angiogenesis on the thymus of children with congenital heart defects: a morphological and immunohistochemical study. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(7):8038-8047.
171. Chambaz E.M., Souchelnitskiy S., Pellerin S., Defaye G., Cochet C., Feige J.J. Transforming growth factors-betas: a multifunctional cytokine family. Implication in the regulation of adrenocortical cell endocrine functions. *Horm Res.* 1996;45:222-226.
172. Chandel N.S., McClintock D.S., Feliciano C.E., Wood T.M., Melendez J.A., Rodriguez A.M., Schumacker P.T. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-

inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. *J Biol Chem.* 2000;275(33):25130-25138.

173. Charpentier T., Hammami A., Stager S. Hypoxia inducible factor 1 α : a critical factor for the immune response to pathogens and Leishmania. *Cell Immunol.* 2016;309:42-49. doi: 10.1016/j.cellimm.2016.06.002.

174. Chen R., Lai U.H., Zhu L., Singh A., Ahmed M., Forsyth N.R. Reactive oxygen species formation in the brain at different oxygen levels: the role of hypoxia inducible factors. *Front Cell Dev Biol.* 2018;6:132. doi: 10.3389/fcell.2018.00132.

175. Chen S., Zhang L., Xu R., Ti Y., Zhao Y., Zhou L., Zhao J. BDKRB2 +9/-9 bp polymorphisms influence BDKRB2 expression levels and NO production in knee osteoarthritis. *Exp Biol Med (Maywood).* 2017;242(4):422-428. doi: 10.1177/1535370215625471.

176. Chiche L., Forel J.M., Thomas G., Farnarier C., Vely F., Blery M., Papazian L., Vivier E. The role of natural killer cells in sepsis. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:986491. doi: 10.1155/2011/986491.

177. Chrousos G.P. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med.* 1995;332(20):1351-1362.

178. Chrousos G.P. The stress response and immune function: clinical implications. The 1999 Novera H. Spector lecture. *Ann NY Acad Sci.* 2000;917:38-67.

179. Cinel I., Opal S.M. Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. *Crit Care Med.* 2009;37(1):291-304. doi: 10.1097/CCM.0b013e31819267fb.

180. Clambey E.T., McNamee E.N., Westrich J.A., Glover L.E., Campbell E.L., Jedlicka P., de Zoeten E.F., Cambier J.C., Stenmark K.R., Colgan S.P., Eltzschig H.K. Hypoxia-inducible factor-1 alpha-dependent induction of FoxP3 drives regulatory T-cell abundance and function during inflammatory hypoxia of the mucosa. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012;109(41):E2784-E2793. doi: 10.1073/pnas.1202366109.

181. Cockman M.E., Lancaster D.E., Stolze I.P., Hewitson K.S., McDonough M.A., Coleman M.L., Coles C.H., Yu X., Hay R.T., Ley S.C., Pugh C.W., Oldham N.J., Masson N., Schofield C.J., Ratcliffe P.J. Posttranslational hydroxylation of ankyrin repeats in I κ B proteins by the hypoxia-inducible factor (HIF) asparaginyl hydroxylase, factor inhibiting HIF (FIH). *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:14767-14772.

182. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature.* 2002;420(6917):885-891.

183. Cohen S.B., Crawley J.B., Kahan M.C., Feldmann M., Foxwell B.M. Interleukin-10 rescues T cells from apoptotic cell death: association with an upregulation of Bcl-2. *Immunology.* 1997;92(1):1-5.

184. Condotta S.A., Rai D., James B.R., Griffith T.S., Badovinac V.P. Sustained and incomplete recovery of naive CD8⁺ T cell precursors after sepsis contributes to impaired CD8⁺ T cell responses to infection. *J Immunol.* 2013;190(5):1991-2000. doi: 10.4049/jimmunol.1202379.
185. Coppel J., Hennis P., Gilbert-Kawai E., Grocott M.P. The physiological effects of hypobaric hypoxia versus normobaric hypoxia: a systematic review of crossover trials. *Extrem Physiol Med.* 2015;4:2. doi: 10.1186/s13728-014-0021-6.
186. Corcoran S.E., O'Neill L.A. HIF1alpha and metabolic reprogramming in inflammation. *J Clin Invest.* 2016;126(10):3699-3707.
187. Couper K.N., Blount D.G., Riley E.M. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol.* 2008;180(9):5771-5777.
188. Courtois G., Gilmore T.D. Mutations in the NFkappaB signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene.* 2006;25(51):6831-6843.
189. Cracowski J.L., Stanke-Labesque F., Bessard G. Isoprostanes: new markers of oxidative stress. Fundamental and clinical aspects. *Rev Med Interne.* 2000;21(3):304-307.
190. Cramer T., Yamanishi Y., Clausen B.E., Forster I., Pawlinski R., Mackman N., Haase V.H., Jaenisch R., Corr M., Nizet V., Firestein G.S., Gerber H.P., Ferrara N., Johnson R.S. HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell.* 2003;112:645-657.
191. Crews S.T. Control of cell lineage-specific development and transcription by bHLH-PAS proteins. *Genes Dev.* 1998;12(5):607-620.
192. Cummins E.P., Berra E., Comerford K.M., Ginouves A., Fitzgerald K.T., Seeballuck F., Godson C., Nielsen J.E., Moynagh P., Pouyssegur J., Taylor C.T. Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates IkappaB kinase-beta, giving insight into hypoxia-induced NFkappaB activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103(48):18154-18159.
193. Cummins E.P., Keogh C.E., Crean D., Taylor C.T. The role of HIF in immunity and inflammation. *Mol Aspects Med.* 2016;47-48:24-34. doi: 10.1016/j.mam.2015.12.004.
194. Cummins E.P., Taylor C.T. Hypoxia-responsive transcription factors. *Pflugers Arch.* 2005;450(6):363-371.
195. Cui Y., Robertson J., Maharaj S., Waldhauser L., Niu J., Wang J., Farkas L., Kolb M., Gauldie J. Oxidative stress contributes to the induction and persistence of TGF- β 1 induced pulmonary fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011;43(8):1122-1133. doi: 10.1016/j.biocel.2011.04.005.
196. Cuzzocrea S., Zingarelli B., O'Connor M., Salzman A.L., Szabo C. Effect of L-buthionine-(S,R)-sulphoximine, an inhibitor of gamma-glutamylcysteine synthase on peroxynitrite and endotoxin-induced vascular failure. *Br J Pharmacol.* 1998;123(3):525-537.

197. Danahy D.B., Strother R.K., Badovinac V.P., Griffith T.S. Clinical and experimental sepsis impairs CD8 T-cell-mediated immunity. *Crit Rev Immunol.* 2016;36(1):57-74. doi:10.1615/CritRevImmunol.2016017098.
198. Dang E.V., Barbi J., Yang H.-Y., Jinasena D., Yu H., Zheng Y., Bordman Z., Fu J., Kim Y., Yen H.-R., Luo W., Zeller K., Shimoda L., Topalian S.L., Semenza G.L., Dang C.V., Pardoll D.M., Pan F. Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. *Cell.* 2011;146(5):772-784. doi: 10.1016/j.cell.2011.07.033.
199. De Carvalho Fraga C.A., Alves L.R., Marques-Silva L., de Sousa A.A., Jorge A.S., de Jesus S.F., Vilela D.N., Pinheiro U.B., Jones K.M., de Paula A.M., Guimaraes A.L. High HIF-1 α expression genotypes in oral lichen planus. *Clin Oral Investig.* 2013;17(9):2011-2015. doi: 10.1007/s00784-013-0920-8.
200. Dehne N., Brune B. HIF-1 in the inflammatory microenvironment. *Exp Cell Res.* 2009;315(11):1791-1797.
201. de Kloet E.R. Corticosteroid receptor balance hypothesis: implications for stress-adaptation. *Stress: Concepts, Cognition, Emotion, and Behavior.* 2016;21-31.
202. Derynck R., Zhang Y. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF β family signalling. *Nature.* 2003;425:577-584.
203. Devraj G., Beerlage C., Brune B., Kempf V.A. Hypoxia and HIF-1 activation in bacterial infections. *Microbes Infect.* 2017;19(3):144-156. doi: 10.1016/j.micinf.2016.11.003.
204. de Vries J.E. Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of interleukin 10. *Ann Med.* 1995;27(5):537-541.
205. Dhainaut J.F., Marin N., Mignon A., Vinsonneau C: Hepatic response to sepsis: interaction between coagulation and inflammatory processes. *Crit Care Med.* 2001;29:S42-47.
206. Dickson M. C., Martin J. S., Cousins F. M., Kulkarni A. B., Karlsson S., Akhurst R. J. Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor- β 1 knock out mice. *Development.* 1995;121:1845-1854.
207. D'Ignazio L., Bandarra D., Rocha S. NF- κ B and HIF crosstalk in immune responses. *FEBS J.* 2015;1-12.
208. Dotsch A., Eisele L., Rabeling M., Rump K., Walstein K., Bick A., Cox L., Engler A., Bachmann H.S., Jockel K.H., Adamzik M., Peters J., Schäfer S.T. Hypoxia inducible factor-2 α and prolinhydroxylase 2 polymorphisms in patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS). *Int J Mol Sci.* 2017;18(6):pii E1266. doi: 10.3390/ijms18061266.
209. Dou X.M., Cheng H.J., Meng L., Zhou L.L., Ke Y.H., Liu L.P., Li Y.M. Correlations between ACE single nucleotide polymorphisms and prognosis of patients with septic shock. *Biosci Rep.* 2017;37(2):pii BSR20170145. doi: 10.1042/BSR20170145.

210. Drinkwater B.L., Folinsbee L.J., Bedi J.F., Plowman S.A., Loucks A.B., Horvath S.M. Response of women mountaineers to maximal exercise during hypoxia. *Aviat Space Environ Med.* 1979;50(7):657-662.
211. Duan C. Hypoxia-inducible factor 3 biology: complexities and emerging themes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2016;310(4):C260-C269. doi: 10.1152/ajpcell.00315.2015.
212. Ebert B. L., Bunn F. Regulation of the erythropoietin gene. *Blood.* 1999;94:1864-1877.
213. El Awad B., Kreft B., Wolber E.M., Hellwig-Burgel T., Metzen E., Fandrey J., Jelkmann W. Hypoxia and interleukin-1beta stimulate vascular endothelial growth factor production in human proximal tubular cells. *Kidney Int.* 2000;58(1):43-50.
214. Elenkov I.J., Chrousos G.P. Stress system – organization, physiology and immunoregulation. *Neuroimmunomodulation.* 2006;13:257-267.
215. Eltzschig H.K., Carmeliet P. Hypoxia and inflammation. *N. Engl. J. Med.* 2011;364(7):656-665.
216. Ema M., Taya S., Yokotani N., Sogawa K., Matsuda Y., Fujii-Kuriyama Y. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc National Acad Sci USA.* 1997;94(9):4273-4278.
217. Engebretsen B.J., Irwin D., Valdez M.E., O'Donovan M.K., Tucker A., van Patot M.T. Acute hypobaric hypoxia (5486 m) induces greater pulmonary HIF-1 activation in hilltop compared to madison rats. *High Alt Med Biol.* 2007;8(4):312-321.
218. Epstein A.C., Gleadle J.M., McNeill L.A., Hewitson K.S., O'Rourke J., Mole D.R., Mukherji M., Metzen E., Wilson M.I., Dhanda A., Tian Y.M., Masson N., Hamilton D.L., Jaakkola P., Barstead R., Hodgkin J., Maxwell P.H., Pugh C.W., Schofield C.J., Ratcliffe P.J. *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell.* 2001;107(1):43-54.
219. Esper A.M., Moss M., Lewis C.A., Nisbet R., Mannino D.M., Martin G.S. The role of infection and comorbidity: factors that influence disparities in sepsis. *Crit Care Med.* 2006;34(10):2576-2582.
220. Esteban E., Ferrer R., Alsina L., Artigas A. Immunomodulation in sepsis: the role of endotoxin removal by polymyxin B-immobilized cartridge. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:507539. doi: 10.1155/2013/507539.
221. Fandrey J. Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004;286(6):R977-988.
222. Fang H., Jiang W., Cheng J., Lu Y., Liu A., Kan L., Dahmen U. Balancing innate immunity and inflammatory state via modulation of neutrophil function: a novel strategy to fight sepsis. *J Immunol Res.* 2015;2015:187048. doi: 10.1155/2015/187048.

223. Faquin W. C., Schneider T. J., Goldberg M. A. Effect of inflammatory cytokines on hypoxia induced erythropoietin production. *Blood*. 1992;79:1987-1994.
224. Farquhar J., Bao H., Thiemens M. Atmospheric influence of Earth's earliest sulfur cycle. *Science*. 2000;289(5480):756-759.
225. Feldser D., Agani F., Iyer N.V., Pak B., Ferreira G., Semenza G.L. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res* 1999;59:3915-3918.
226. Fensterheim B.A., Guo Y., Sherwood E.R., Bohannon J.K. The cytokine response to lipopolysaccharide does not predict the host response to infection. *J Immunol*. 2017;198(8):3264-3273.
227. Ferguson N.D., Fan E., Camporota L., Antonelli M., Anzueto A., Beale R., Brochard L., Brower R., Esteban A., Gattinoni L., Rhodes A., Slutsky A.S., Vincent J.L., Rubenfeld, G.D., Thompson B.T., Ranieri V.M. The Berlin definition of ARDS: an expanded rationale, justification, and supplementary material. *Inten Care Med*. 2012;38(10):1573-1582.
228. Fink M.P. Animal models of sepsis. *Virulence*. 2014;5(1):143-153. doi: 10.4161/viru.26083.
229. Flamme I., Frohlich T., von Reutern M., Kappel A., Damert A., Risau W. HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 alpha and developmentally expressed in blood vessels. *Mech Dev*. 1997;63(1):51-60.
230. Flores-Mejia L.A., Cabrera-Rivera G.L., Ferat-Osorio E., Mancilla-Herrera I., Torres-Rosas R., Bosco-Garate I.B., Lopez-Macias C., Isibasi A., Cerbulo-Vazquez A., Arriaga-Pizano L.A. Function is dissociated from activation-related immunophenotype on phagocytes from patients with sirs/sepsis syndrome. *Shock*. 2018;26.
231. Fluck K., Breves G., Fandrey J., Winning S. Hypoxia-inducible factor 1 in dendritic cells is crucial for the activation of protective regulatory T cells in murine colitis. *Mucosal Immunol*. 2016;9:379-390.
232. Fong Y.M., Marano M.A., Moldawer L.L., Wei H., Calvano S.E., Kenney J.S., Allison A.C., Cerami A., Shires G.T., Lowry S.F. The acute splanchnic and peripheral tissue metabolic response to endotoxin in humans. *J Clin Invest*. 1990;85:1896-1904.
233. Forsythe J.A., Jiang B.H., Iyer N.V., Agani F., Leung S.W., Koos R.D., Semenza G.L. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*. 1996;16(9):4604-4613.
234. Fratantonio D., Cimino F., Speciale A., Virgili F. Need (more than) two to Tango: Multiple tools to adapt to changes in oxygen availability. *BioFactors*. 2018;44(3):207-218. doi:10.1002/biof.1419.
235. Frede S., Stockmann C., Freitag P., Fandrey J. Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF-kB. *Biochem J*. 2006;396(3):517-527.

236. Freudlsperger C., Bian Y., Contag Wise S., Burnett J., Coupar J., Yang X., Chen Z., Van Waes C. TGF- β and NF- κ B signal pathway cross-talk is mediated through TAK1 and SMAD7 in a subset of head and neck cancers. *Oncogene*. 2013;32(12):1549-1559.
237. Fritzenwanger M., Jung C., Goebel B., Lauten A., Figulla H.R. Impact of short-term systemic hypoxia on phagocytosis, cytokine production, and transcription factor activation in peripheral blood cells. *Mediators Inflamm*. 2011;2011:429501. doi: 10.1155/2011/429501.
238. Fuchs D., Weiss G., Wachter H. Neopterin, biochemistry and clinical use as a marker for cellular immune reactions. *Int. Arch. Allergy Immunol*. 1993;101(1):1-6.
239. Gala R. The physiology and mechanisms of stress-induced changes in prolactin secretion in the rat. *Life Sci*. 1990;46(20):1407-1420.
240. Galanos C., Freudenberg M., Katschinski T., Salomao R., Mossmann H., Kumazawa Y. Tumor necrosis factor and host response to endotoxin. In *Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides, Vol II, Immunopharmacology and Pathophysiology*. (D. C. Morrison and J. L. Ryan, eds.) – CRC Press: Boca Raton, Florida, 1992. P. 75-102.
241. Galvan-Pena S., O'Neill L.A. Metabolic reprogramming in macrophage polarization. *Front Immunol*. 2014;5:420.
242. Garbarino V.R., Orr M.E., Rodriguez K.A., Buffenstein R. Mechanisms of oxidative stress resistance in the brain: lessons learned from hypoxia tolerant extremophilic vertebrates. *Arch Biochem Biophys*. 2015;576:8-16.
243. Gerald D., Berra E., Frapart Y.M., Chan D.A., Giaccia A.J., Mansuy D., Pouyssegur J., Yaniv M., Mechta-Grigoriou F. JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress. *Cell*. 2004;118(6):781-794. doi: 10.1016/j.cell.2004.08.025.
244. Ghezzi P., Sacco S., Agnello D., Marullo A., Caselli G., Bertini R. LPS induces IL-6 in the brain and in serum largely through TNF production. *Cytokine*. 2000;12(8):1205-1210.
245. Ghosh D., Kumar R., Pal K. Individual variation in response to simulated hypoxic stress of rats. *Ind J Exp Biol*. 2012;50(10):744-748.
246. Ghosh S., May M. J., Kopp E.B. NF- κ B and Rel proteins: evolutionary conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:225-260.
247. Gogos C., Kotsaki A., Pelekanou A., Giannikopoulos G., Vaki I., Maravitsa P., Adamis S., Alexiou Z., Andrianopoulos G., Antonopoulou A., Athanassia S., Baziaka F., Charalambous A., Christodoulou S., Dimopoulou I., Floros I., Giannitsioti E., Gkanas P., Ioakeimidou A., Kanellakopoulou K., Karabela N., Karagianni V., Katsarolis I., Kontopithari G., Kopterides P., Koutelidakis I., Koutoukas P., Kranidioti H., Lignos M., Louis K., Lymberopoulou K., Mainas E., Marioli A., Massouras C., Mavrou I., Mpalla M., Michalia M., Mylona H., Mytas V., Papanikolaou I., Papanikolaou K., Patrani M., Perdios I., Plachouras D., Pistiki A., Protopapas K., Rigaki K., Sakka V.,

- Sartzi M., Skouras V., Souli M., Spyridaki A., Strouvalis I., Tsaganos T., Zografos G., Mandragos K., Klouva-Molyvdas P., Maggina N., Giamarellou H., Armaganidis A., Giamarellos-Bourboulis E.J. Early alterations of the innate and adaptive immune statuses in sepsis according to the type of underlying infection. *Crit Care*. 2010;14(3):R96. doi: 10.1186/cc9031.
248. Gondin J., Theret M., Duhamel G., Pegan K., Mathieu J.R., Peyssonnaud C., Cuvellier S., Latroche C., Chazaud B., Bendahan D., Mounier R. Myeloid HIFs are dispensable for resolution of inflammation during skeletal muscle regeneration. *J Immunol*. 2015;194(7):3389-3399. doi: 10.4049/jimmunol.1401420.
249. Gorlach A., Bonello S. The cross-talk between NF-kappaB and HIF-1: further evidence for a significant liaison. *Biochem J*. 2008;412(3):e17-19. doi: 10.1042/BJ20080920.
250. Greer S.N., Metcalf J.L., Wang Y., Ohh M. The updated biology of hypoxia-inducible factor. *EMBO J*. 2012;31(11):2448-2460. doi: 10.1038/emboj.2012.125.
251. Grocott M.; Montgomery H.; Vercueil A. High-altitude physiology and pathophysiology: implications and relevance for intensive care medicine. *Crit Care*. 2007;11(1):203.
252. Gunneth C.A., Lund D.D., Faraci F.M., Heistad D.D. Vascular interleukin-10 protects against LPS-induced vasomotor dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289:H624-H630.
253. Guo Y., Patil N.K., Luan L., Bohannon J.K., Sherwood E.R. The biology of natural killer cells during sepsis. *Immunology*. 2018;153(2):190-202. doi: 10.1111/imm.12854.
254. Guyenet P.G. Regulation of breathing and autonomic outflows by chemoreceptors. *Compr Physiol*. 2014;4(4):1511-1562.
255. Haase V.H. Hypoxic regulation of erythropoiesis and iron metabolism. *Am J Physiol-Renal Physiol*. 2010;299:F1-F13.
256. Haase V.H. Renal cancer: oxygen meets metabolism. *Exp Cell Res*. 2012;318(9):1057-1067. doi: 10.1016/j.yexcr.2012.02.026.
257. Hahn S.A., Schutte M., Hoque A.T., Moskaluk C.A., da Costa L.T., Rozenblum E., Weinstein C.L., Fischer A., Yeo C.J., Hruban R.H., Kern S.E. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science*. 1996;271(5247):350-353.
258. Halberg F., Nelson W. Chronobiologic optimisation of aging. *Aging and biological rhythms*. N. Y. – L.: Plenum press, 1978. – P. 5-49.
259. Halberg F., Sothorn R.B., Cornelissen G., Czaplicki J. Chronomics, human time estimation, and aging. *Clin Interv Aging*. 2008;3(4):749-760.
260. Halligan D. N., Murphy S. J. E., Taylor C. T. The hypoxia-inducible factor (HIF) couples immunity with metabolism. *Semin Immunol*. 2016;28(5):469-477.

261. Hammami A., Charpentier T., Smans M., Stager S. IRF-5-Mediated inflammation limits CD8+ T cell expansion by inducing HIF-1 α and impairing dendritic cell functions during Leishmania Infection. *PLoS Pathog.* 2015;11:e1004938.
262. Hams E., Saunders S.P., Cummins E.P., O'Connor A., Tambuwala M.T., Gallagher W.M., Byrne A., Campos-Torres A., Moynagh P.M., Jobin C., Taylor C.T., Fallon P.G. The hydroxylase inhibitor dimethyloxallyl glycine attenuates endotoxic shock via alternative activation of macrophages and IL-10 production by B1 cells. *Shock.* 2011;36(3):295-302. doi: 10.1097/SHK.0b013e318225ad7e.
263. Harris A.J., Thompson A.R., Whyte M.K., Walmsley S.R. HIF-mediated innate immune responses: cell signaling and therapeutic implications. *Hypoxia (Auckland, NZ).* 2014;2:47-58.
264. Hartmann G., Tschop M., Fischer R., Bidlingmaier C., Riepl R., Tschop K., Hautmann H., Endres S., Toepfer M. High altitude increases circulating interleukin-6, interleukin-1 receptor antagonist and C-reactive protein. *Cytokine.* 2000;12(3):246-252.
265. Hartmann H., Eltzhig H.K., Wurz H., Hantke K., Rakin A., Yazdi A.S., Matteoli G., Bohn E., Autenrieth I.B., Karhausen J., Neumann D., Colgan S.P., Kempf V.A. Hypoxia-independent activation of HIF-1 by Enterobacteriaceae and their siderophores. *Gastroenterology.* 2008;134(3):756-767. doi: 10.1053/j.gastro.2007.12.008.
266. Harty J.T., Tvinnereim A.R., White D.W. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:275-308.
267. Hashimoto T., Shibasaki F. Hypoxia-Inducible Factor as an angiogenic master switch. *Front Pediatr.* 2015;3:33. doi: 10.3389/fped.2015.00033.
268. Hayden M.S., Ghosh S. NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev.*, 2012;26(3):203-234.
269. Hayden M.S., West A.P., Ghosh S. NF- κ B and the immune response. *Oncogene.* 2006;25:6758-6780.
270. Heikinen P. Modulation of TGF- β signaling by hypoxia. – University of Turku. 2015. – 61 p.
271. Heine H., Rietschel E. T., Ulmer A. J. The biology of endotoxin. *Mol Biotechnol.* 2001;19(3):279-296.
272. Hellwig-Burgel T., Rutkowski K., Metzen E., Fandrey J., Jelkmann W. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood.* 1999;94(5):1561-1567.
273. Hellwig-Burgel T., Stiehl D.P., Wagner A.E., Metzen E., Jelkmann W. Review: hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): a novel transcription factor in immune reactions. *J Interferon Cytokine Res.* 2005;25(6):297-310.

274. Hiraki S., Ono S., Kinoshita M., Tsujimoto H., Takahata R., Miyazaki H., Saitoh D., Seki S., Hase K. Neutralization of IL-10 restores the downregulation of IL-18 receptor on natural killer cells and interferon- γ production in septic mice, thus leading to an improved survival. *Shock*. 2012;37:177-182.
275. Hirota K. Involvement of hypoxia-inducible factors in the dysregulation of oxygen homeostasis in sepsis. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 2015;15(1):29-40.
276. Hirota S.A., Fines K., Ng J., Traboulsi D., Lee J., Ihara E., Li Y., Willmore W.G., Chung D., Scully M.M., Louie T., Medlicott S., Lejeune M., Chadee K., Armstrong G., Colgan S.P., Muruve D.A., MacDonald J.A., Beck P.L. Hypoxia-inducible factor signaling provides protection in *Clostridium difficile*-induced intestinal injury. *Gastroenterology*. 2010;139(1):259-69.e3. doi: 10.1053/j.gastro.2010.03.045.
277. Hochachka P.W., Somero G.N. Biochemical adaptation-mechanism and process in physiological evolution. – New York: Oxford University Press, 2001. – 248 p.
278. Hodkinson P.D. Acute exposure to altitude. *J R Army Med Corps*. 2011;157(1): 85-91.
279. Hofer N., Zacharias E., Muller W., Resch B. An update on the use of C-reactive protein in early-onset neonatal sepsis: current insights and new tasks. *Neonatology*. 2012;102(1):25-36. doi: 10.1159/000336629.
280. Holley H.S., Behan M., Wenninger J.M. Age and sex differences in the ventilatory response to hypoxia and hypercapnia in awake neonatal, pre-pubertal and young adult rats. *Respir Physiol Neurobiol*. 2012;180(1):79-87. doi:10.1016/j.resp.2011.10.012.
281. Holmquist-Mengelbier L., Fredlund E., Lofstedt T., Noguera R., Navarro S., Nilsson H., Pietras A., Vallon-Christersson J., Borg A., Gradin K., Poellinger L., Pahlman S. Recruitment of HIF-1 α and HIF-2 α to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2 α promotes an aggressive phenotype. *Cancer Cell*. 2006;10(5):413-423.
282. Hubbi M.E., Semenza G.L. An essential role for chaperone-mediated autophagy in cell cycle progression. *Autophagy*. 2015;11(5):850-851. doi: 10.1080/15548627.2015.1037063.
283. Imtiyaz H.Z., Williams E.P., Hickey M.M., Patel S.A., Durham A.C., Yuan L.J., Hammond R., Gimotty P.A., Keith B., Simon M.C. Hypoxia-inducible factor 2 α regulates macrophage function in mouse models of acute and tumor inflammation. *J Clin Invest*. 2010;120:2699-2714.
284. Itoh S., ten Dijke P. Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction. *Curr Opin Cell Biol*. 2007;19(2):176-184.
285. Ivan M., Kondo K., Yang H., Kim W., Valiando J., Ohh M., Salic A., Asara J.M., Lane W.S., Kaelin W.G. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science*. 2001;292(5516):464-468.
286. Iwasaka H., Noguchi T. Th1/Th2 balance in systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *Nihon Rinsho*. 2004;62(12):2237-2243.

287. Jaakkola P., Mole D.R., Tian Y.M., Wilson M.I., Gielbert J., Gaskell S.J., von Kriegsheim A., Hebestreit H.F., Mukherji M., Schofield C.J., Maxwell P.H., Pugh C.W., Ratcliffe P.J. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science*. 2001;292(5516):468-472.
288. Jain K., Suryakumar G., Prasad R., Ganju L. Upregulation of cytoprotective defense mechanisms and hypoxia-responsive proteins imparts tolerance to acute hypobaric hypoxia. *High Alt Med Biol*. 2013;14(1):65-77. doi: 10.1089/ham.2012.1064.
289. Jain K., Suryakumar G., Prasad R., Ganju L. Differential activation of myocardial ER stress response: a possible role in hypoxic tolerance. *Int J Cardiol*. 2013;168(5):4667-4677. doi: 10.1016/j.ijcard.2013.07.180.
290. Jain K., Suryakumar G., Ganju L., Singh S.B. Differential hypoxic tolerance is mediated by activation of heat shock response and nitric oxide pathway. *Cell Stress Chaperones*. 2014;19(6):801-812. doi: 10.1007/s12192-014-0504-9.
291. Jantsch J., Wiese M., Schodel J., Castiglione K., Glasner J., Kolbe S., Mole D., Schleicher U., Eckardt K.U., Hensel M., Lang R., Bogdan C., Schnare M., Willam C. Toll-like receptor activation and hypoxia use distinct signaling pathways to stabilize hypoxia-inducible factor 1 α (HIF1A) and result in differential HIF1A-dependent gene expression. *J Leukoc Biol*. 2011;90(3):551-562.
292. Javesghani D., Hussain S.N., Scheidel J., Quinn M.T., Magder S.A. Superoxide production in the vasculature of lipopolysaccharide-treated rats and pigs. *Shock*. 2003;19:486-493.
293. Jha A.K., Huang S.C., Sergushichev A., Lampropoulou V., Ivanova Y., Loginicheva E., Chmielewski K., Stewart K.M., Ashall J., Everts B., Pearce E.J., Driggers E.M., Artyomov M.N. Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. *Immunity*. 2015;42(3):419-430.
294. Jiang B.H., Rue E., Wang G.L., Roe R., Semenza G.L. Dimerization, DNA binding and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1996;271:17771-17778.
295. Jiang Y., Dai A., Li Q., Hu R. Hypoxia induces transforming growth factor-beta1 gene expression in the pulmonary artery of rats via hypoxia-inducible factor-1 α . *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2007;39(1):73-80.
296. Jimenez-Sousa M.A., Lopez E., Fernandez-Rodriguez A., Tamayo E., Fernandez-Navarro P., Segura-Roda L., Heredia M., Gomez-Herreras J.I., Bustamante J., Garcia-Gomez J.M., Bermejo-Martin J.F., Resino S. Genetic polymorphisms located in genes related to immune and inflammatory processes are associated with end-stage renal disease: a preliminary study. *BMC Med Genet*. 2012;13:58. doi: 10.1186/1471-2350-13-58.

297. Johnson T.S., Rock P.B., Fulco C.S., Trad L.A., Spark R.F., Maher J.T. Prevention of acute mountain sickness by dexamethasone. *N. Engl. J. Med.* 1984;310(11):683-686.
298. Jung Y.J., Isaacs J.S., Sunnin L., Trepel J., Neckers L. IL-1 β -mediated up-regulation of HIF-1 α via an NF κ B/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. *FASEB J.* 2003;17(14):2115-2117.
299. Junod V.T. Recherches sur les effets physiologiques et therapeutiques de la compression et de la rarefaction de l'air tant sur le corps que sur les membres isoles. *Arch Gen Med.* 1835;2(9):157-172.
300. Kabay B., Kocafe C., Baykal A., Ozden H., Baycu C., Oner Z., Ozguc M., Sayek I. Interleukin-10 gene transfer: prevention of multiple organ injury in a murine cecal ligation and puncture model of sepsis. *World J Surg.* 2007;31(1):105-115.
301. Kaelin W.G., Ratcliffe P.J. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell.* 2008;30(4):393-402.
302. Kallapura G., Pumford N.R., Hernandez-Velasco X., Hargis B.M., Tellez G. Mechanisms involved in lipopolysaccharide derived ROS and RNS oxidative stress and septic shock. *J. Microbiol. Res. Rev.* 2014;2.
303. Kallio P.J., Pongratz I., Gradin K., McGuire J., Poellinger L. Activation of hypoxia-inducible factor 1 α : posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94(11):5667-5672.
304. Kaparianos A., Argyropoulou E., Efremidis G., Spiropoulos K. Sex hormone alterations and systemic inflammation in a group of male COPD smokers and their correlation with the +138 insA/delA endothelin-1 gene polymorphism. A case-control study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2011;15(10):1149-1157.
305. Karhausen J., Furuta G.T., Tomaszewski J.E., Johnson R.S., Colgan S.P., Haase V.H. Epithelial hypoxia-inducible factor-1 is protective in murine experimental colitis. *J Clin Invest.* 2004;114(8):1098-1106.
306. Karin M. Nuclear factor- κ B in cancer development and progression. *Nature.* 2006;441(7092):431-436.
307. Karin M., Greten F.R. NF- κ B: Linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol.* 2005;5:749-759.
308. Katkam S.K., Indumathi B., Tasneem F.S.D., Rajasekhar L., Kutala V.K. Impact of eNOS 27-bp VNTR (4b/a) gene polymorphism with the risk of Systemic Lupus Erythematosus in south Indian subjects. *Gene.* 2018;658:105-112. doi: 10.1016/j.gene.2018.03.021.
309. Ke Q., Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol.* 2006;70(5):1469-1480.
310. Kellum J.A., Kong L., Fink M.P., Weissfeld L.A., Yealy D.M., Pinsky M.R., Fine J., Krichevsky A., Delude R.L., Angus D.C., Gen I.M.S. Investigators. Understanding the inflammatory cytokine

- response in pneumonia and sepsis: results of the Genetic and Inflammatory Markers of Sepsis (GenIMS) study. *Arch Intern Med.* 2007;167(15):1655-1663.
311. Kempf V.A., Lebidziejewski M., Alitalo K., Walzlein J.H., Eehalt U., Fiebig J., Huber S., Schutt B., Sander C.A., Muller S., Grassl G., Yazdi A.S., Brehm B., Autenrieth I.B. Activation of hypoxia-inducible factor-1 in bacillary angiomatosis: evidence for a role of hypoxia-inducible factor-1 in bacterial infections. *Circulation.* 2005;111(8):1054-1062. doi: 10.1161/01.CIR.0000155608.07691.B7.
312. Kenneth N.S., Rocha S. Regulation of gene expression by hypoxia. *Biochem J.* 2008;414(1):19-29. doi: 10.1042/BJ20081055.
313. Keys A., Matthews B.H.C., Forbes W.H., McFarland R.A. Individual variations in ability to acclimatize to high altitude. *Royal Society of London.* 1938;126(842):1-24.
314. Kiers H.D., Scheffer G.-J., van der Hoeven J.G., Eltzschig H.K., Pickkers P., Kox M. Immunologic consequences of hypoxia during critical illness. *Anesthesiology.* 2016; 125(1): 237-249. doi: 10.1097/ALN.0000000000001163.
315. Kietzmann T., Jungermann K., Gorlach A. Regulation of the hypoxia-dependent plasminogen activator inhibitor 1 expression by MAP kinases. *Thromb Haemost.* 2003;89:666-673.
316. Kim S.Y., Choi Y.J., Joung S.M., Lee B.H., Jung Y.-S., Lee J.Y. Hypoxic stress up-regulates the expression of Toll-like receptor 4 in macrophages via hypoxia-inducible factor. *Immunology.* 2010;129(4):516-524. doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03203.x.
317. Kiss J., Mollenhauer M., Walmsley S.R., Kirchberg J., Radhakrishnan P., Niemietz T., Dudda J., Steinert G., Whyte M.K., Carmeliet P., Mazzone M., Weitz J., Schneider M. Loss of the oxygen sensor PHD3 enhances the innate immune response to abdominal sepsis. *J Immunol.* 2012;189(4):1955-1965. doi: 10.4049/jimmunol.1103471.
318. Klausen T., Olsen N.V., Poulsen T.D., Richalet J.P., Pedersen B.K. Hypoxemia increases serum interleukin-6 in humans. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1997;76:480-482.
319. Kletsas D., Pratsinis H., Mariatos G., Zacharatos P., Gorgoulis V.G. The proinflammatory phenotype of senescent cells: the p53-mediated ICAM-1 expression. *Ann NY Acad Sci.* 2004;1019:330-332.
320. Kline D.D., Peng Y.J., Manalo D.J., Semenza G.L., Prabhakar N.R. Defective carotid body function and impaired ventilatory responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99(2):821-826.
321. Knolle P.A., Gerken G. Local control of the immune response in the liver. *Immunol Rev.* 2000;174:21-34.
322. Kobayashi N., Hanaoka M., Droma Y., Ito M., Katsuyama Y., Kubo K., Ota M. Polymorphisms of the tissue inhibitor of metalloproteinase 3 gene are associated with resistance to high-altitude

- pulmonary edema (HAPE) in a Japanese population: a case control study using polymorphic microsatellite markers. *PLoS One*. 2013;22(8):e71993. doi: 10.1371/journal.pone.0071993.
323. Kodama T., Shimizu N., Yoshikawa N., Makino Y., Ouchida R., Okamoto K., Hisada T., Nakamura H., Morimoto C., Tanaka H. Role of the glucocorticoid receptor for regulation of hypoxia-dependent gene expression. *J Biol Chem*. 2003;278(35):33384-33391.
324. Koh M.Y., Powis G. Passing the baton: the HIF switch. *Trends Biochem Sci*. 2012;37(9):364-372. doi: 10.1016/j.tibs.2012.06.004.
325. Kohler T., Reizis B., Johnson R.S., Weighardt H., Forster I. Influence of hypoxia-inducible factor 1 α on dendritic cell differentiation and migration. *Eur J Immunol*. 2012;42:1226-1236.
326. Kojima H., Jones B.T., Chen J., Cascalho M., Sitkovsky M.V. Hypoxia-inducible factor 1 α -deficient chimeric mice as a model to study abnormal B lymphocyte development and autoimmunity. *Methods Enzymol*. 2004;381:218-229.
327. Koo D.J., Chaudry I.H., Wang P. Kupffer cells are responsible for producing inflammatory cytokines and hepatocellular dysfunction during early sepsis. *J Surg Res*. 1999;83:151-157.
328. Kosyreva A.M., Simonova E.Y., Makarova O.V. Gender differences in pulmonary and immune response in acute experimental endotoxemia. *Bull Exp Biol Med*. 2012;153(3):340-342.
329. Kosyreva A.M., Makarova O.V., Kakturskiy L.V., Mikhailova L.P., Boltovskaya M.N., Rogov K.A. Sex differences of inflammation in target organs, induced by intraperitoneal injection of lipopolysaccharide, depend on its dose. *J Inflamm Res*. 2018;11:431-445.
330. Kotch L.E., Iyer N.V., Laughner E., Semenza G.L. Defective vascularization of HIF-1 α -null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death. *Dev Biol*. 1999;209(2):254-267.
331. Koyasu S., Kobayashi M., Goto Y., Hiraoka M., Harada H. Regulatory mechanisms of hypoxia-inducible factor 1 activity: two decades of knowledge. *Cancer Sci*. 2018;109(3):560-571. doi: 10.1111/cas.13483.
332. Kruger B., Krick S., Dhillon, N., Lerner S.M., Ames S., Bromberg J.S., Lin M., Walsh L., Vella J., Fischeder M., Kramer B.K., Colvin R.B., Heeger P.S., Murphy B.T., Schroppel B. Donor Toll-like receptor 4 contributes to ischemia and reperfusion injury following human kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(9):3390-3395.
333. Kruger P., Saffarzadeh M., Weber A.N., Rieber N., Radsak M., von Bernuth H., Benarafa C., Roos D., Skokowa J., Hartl D. Neutrophils: between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLoS Pathog*. 2015;11(3):e1004651. doi:10.1371/journal.ppat.1004651.
334. Krzywinska E., Stockmann C. Hypoxia, metabolism and immune cell function. *Biomedicines*. 2018;6(2):E56. doi: 10.3390/biomedicines6020056.

335. Krystal G., Lam V., Dragowska W., Takahashi C., Appel J., Gontier A., Jenkins A., Lam H., Quon L., Lansdorp P. Transforming growth factor beta 1 is an inducer of erythroid differentiation. *J Exp Med.* 1994;180(3):851-860.
336. Kugimiya T., Suwa K., Inada Y., Mayuzumi K., Kasama T. Effects of drug-induced reduction in oxyhemoglobin affinity on survival time of mice in severe hypoxic conditions. *Tohoku J Exp Med.* 1984;144:315-320.
337. Kumar H., Choi D.K. Hypoxia inducible factor pathway and physiological adaptation: a cell survival pathway? *Mediators Inflamm.* 2015;2015:584758. doi: 10.1155/2015/584758.
338. Kumar S., Sharma P., Bansal A., Sharma P.C., Aggarwal K.K. Hypobaric hypoxia-mediated protein expression in plasma of susceptible and tolerant rats. *Indian J Med Res.* 2014;140:756-765.
339. Kwarecki K., Debiec H., Wroblewski S. Biological time-related changes in tolerance of male mice to hypoxia--II. Circadian rhythm of lysosomal susceptibility to hypoxia. *Chronobiol Int.* 1984;1(4):245-250.
340. LaManna J.C., Chavez J.C., Pichiule P. Structural and functional adaptation to hypoxia in the rat brain. *J Exp Biol.* 2004;207(Pt 18):3163-3169.
341. Lando D., Peet D. J., Gorman J. J., Whelan D. A., Whitelaw M. L., Bruick R. K. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev.* 2002;16:1466-1471. doi: 10.1101/gad.991402.
342. Larson J., Drew K.L., Folkow L.P., Milton S.L., Park T.J. No oxygen? No problem! Intrinsic brain tolerance to hypoxia in vertebrates. *J Exp Biol.* 2014;217(Pt 7):1024-1039. doi: 10.1242/jeb.085381.
343. Ledochowski M., Murr C., Widner B., Fuchs D. Inverse relationship between neopterin and immunoglobulin E. *Clin Immunol.* 2001;98(1):104-108.
344. Lee E. J., Heo W., Kim J. Y., Kim H., Kang M. J., Kim B. R., Cho H. J. Alteration of inflammatory mediators in the upper and lower airways under chronic intermittent hypoxia: preliminary animal study. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:4327237. doi: 10.1155/2017/4327237.
345. Lee T.H., Kim W.R., Poterucha J.J. Evaluation of elevated liver enzymes. *Clin Liver Dis.* 2012;16:183-198.
346. Leentjens J., Kox M., van der Hoeven J.G., Netea M.G., Pickkers P. Immunotherapy for the adjunctive treatment of sepsis: from immunosuppression to immunostimulation. Time for a paradigm change? *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;187:1287-1293.
347. Linehan W.M., Srinivasan R., Schmidt L.S. The genetic basis of kidney cancer: a metabolic disease. *Nat Rev Urol.* 2010;7(5):277-285. doi: 10.1038/nrurol.2010.47.
348. Liu R.-M., Desai L.P. Reciprocal regulation of TGF- β and reactive oxygen species: A perverse cycle for fibrosis. *Redox Biology.* 2015;6:565-577.

349. Liu T., Zhang L., Joo D., Sun S.C. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther.* 2017;2:e17023. doi: 10.1038/sigtrans.2017.23.
350. Liu S. F., Malik A. B. NF- κ B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006;290(4):L622-L645.
351. Loginova N.P., Chertvetnykh V.A., Khromtsova G.A. Morphological and immunohistochemical features of the thymus structure in neonatal infants with congenital heart diseases. *Arkh Patol* 2013;75: 9-14.
352. Lopez-Barneo J., Gonzalez-Rodriguez P., Gao L., Fernandez-Aguera M.C., Pardal R., Ortega-Saenz P. Oxygen sensing by the carotid body: mechanisms and role in adaptation to hypoxia. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2016;310(8):C629-C642. doi: 10.1152/ajpcell.00265.2015.
353. Loppnow H. LPS, recIL1 and smooth muscle cell-IL1 activate vascular cells by specific mechanisms. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1994;388:309-321.
354. Lorente L., Martin M.M., Borreguero-Leon J.M., Barrios Y., Sole-Violan J., Ferreres J, Labarta L., Diaz C., Jimenez A. The 4G/4G genotype of PAI-1 polymorphism is associated with higher plasma PAI-1 concentrations and mortality in patients with severe sepsis. *PLoS One.* 2015;10(6):e0129565. doi: 10.1371/journal.pone.0129565.
355. Lorenzo V.F., Yang Y., Simonson T.S., Nussenzveig R., Jorde L.B., Prchal J.T., Ge R.L. Genetic adaptation to extreme hypoxia: study of high-altitude pulmonary edema in a three-generation Han Chinese family. *Blood Cells Mol Dis.* 2009;43(3):221-225. doi: 10.1016/j.bcnd.2009.04.006.
356. Louis N.A., Hamilton K.E., Canny G., Shekels L.L., Ho S.B., Colgan S.P. Selective induction of mucin-3 by hypoxia in intestinal epithelia. *J Cell Biochem.* 2006;99:1616-1627.
357. Luchi M., Munford R. S. Binding, internalization, and deacylation of bacterial lipopolysaccharide by human neutrophils. *J Immunol.* 1993;151:959-969.
358. Luderitz O., Freudenberg M., Galanos C., Lehmann V., Rietschel E. T., Shaw D. Lipopolysaccharides of gram-negative bacteria. In *Current topics in membrane and transport.* (S. Razin and S. Rottern, eds.) Academic Press, New York. 1982;17:79-151.
359. Luks A.M., Swenson E.R., Bartsch P. Acute high-altitude sickness. *Eur Respir Rev.* 2017;26(143):160096. doi: 10.1183/16000617.0096-2016.
360. Lukyanova L.D., Kirova Y.I. Effect of hypoxic preconditioning on free radical processes in tissues of rats with different resistance to hypoxia. *Bull Exp Biol Med.* 2011;151(3):292-296.
361. Lukyanova L.D., Kirova Y.I. Mitochondria-controlled signaling mechanisms of brain protection in hypoxia. *Front Neurosci.* 2015;9:320. doi: 10.3389/fnins.2015.00320.
362. Lumb A.B. *Nunn's Applied Respiratory Physiology.* 8th Edition. Chapter 11. Nonrespiratory functions of the lung. 2017. – 560 p.

363. Lyons T.W., Reinhard C.T., Planavsky N.J. The rise of oxygen in Earth's early ocean and atmosphere. *Nature*. 2014;506(7488):307-315. doi: 10.1038/nature13068.
364. Ma X.C., Chen L.T., Oliver J., Horvath E., Phelps C.P. Cytokine and adrenal axis responses to endotoxin. *Brain Research*. 2000;861:135-142.
365. Macdonald J., Galley H.F., Webster N.R. Oxidative stress and gene expression in sepsis. *Br J Anaesth*. 2003;90(2):221-232.
366. Macias M.J., Martin-Malpartida P., Massague J. Structural determinants of Smad function in TGF-beta signaling. *Trends Biochem Sci*. 2015;40(6):296-308.
367. Mahabeleshwar G.H., Qureshi M.A., Takami Y., Sharma N., Lingrel J.B., Jain M.K. A myeloid hypoxia-inducible factor 1a-Kruppel-like factor 2 pathway regulates gram-positive endotoxin-mediated sepsis. *J Biol Chem*. 2012;287:1448-1457.
368. Mahon P.C., Hirota K., Semenza G.L. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 α and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev*. 2001;15(20):2675-2686.
369. Makhoul I.R., Yacoub A., Smolkin T., Sujov P., Kassis I., Sprecher H. Values of C-reactive protein, procalcitonin, and staphylococcus-specific PCR in neonatal late-onset sepsis. *Acta Paediatr*. 2006;95(10):1218-1223.
370. Manalo D. J., Rowan A., Lavoie T., Natarajan L., Kelly B. D., Ye S. Q., Garcia J. G. N., Semenza G. L. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood*. 2005;105(2):659-669.
371. Mandal A., Viswanathan C. Natural killer cells: in health and disease. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*. 2015;8(2):47-55.
372. Mannel D.N. Advances in sepsis research derived from animal models. *Int J Med Microbiol*. 2007;297(5):393-400.
373. Manresa M.C., Taylor C.T. Hypoxia inducible factor (HIF) hydroxylases as regulators of intestinal epithelial barrier function. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2017;3:303-315.
374. Masoudian M., Fazeli B., Sharebiani H., Rajabnejad A., Ravari H., Akbarin M.M., Dadgarmoghaddam M. Association of the five gene related endothelial cell dysfunction polymorphisms with Buerger's disease development. *Int Angiol*. 2016;35(2):205-211.
375. Masson N., Singleton R.S., Sekirnik R., Trudgian D.C., Ambrose L.J., Miranda M.X., Tian Y.-M., Kessler B.M., Schofield C.J., Ratcliffe P.J. The FIH hydroxylase is a cellular peroxide sensor that modulates HIF transcriptional activity. *EMBO Rep*. 2012;13(3):251-257. doi: 10.1038/embor.2012.9.
376. Masukawa T., Tochino Y. Circadian rhythm in the cerebral resistance to hypoxia in mice. *Jpn J Pharmacol*. 1993;61(3):197-201.

377. Mattern T., Flad H. D., Brade L., Rietschel E. T., Ulmer A. J. Stimulation of human T lymphocytes by LPS is MHC unrestricted, but strongly dependent on B7 interactions. *J Immunol.* 1998;160:3412-3418.
378. Mattern T., Thanhauser A., Reiling N., Toellner K.M., Duchrow M., Kusumoto S., Rietschel E.T., Ernst M., Brade H., Flad H.D. Endotoxin and lipid A stimulate proliferation of human T cells in the presence of autologous monocytes. *J Immunol.* 1994;153(7):2996-3004.
379. Mayr F.B., Yende S., Angus D.C. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence.* 2014;5(1):4-11.
380. McCuskey R.S., McCuskey P.A., Urbaschek R., Urbaschek B. Species differences in Kupffer cells and endotoxin sensitivity. *Infect Immun.* 1984;45(1):278-280.
381. McGarry T., Biniiecka M., Veale D.J., Fearon U. Hypoxia, oxidative stress and inflammation. *Free Radic Biol Med.* 2018; 125:15-24. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.042.
382. McInturff A.M., Cody M.J., Elliott E.A., Glenn J.W., Rowley J.W., Rondina M.T., Yost C.C. Mammalian target of rapamycin regulates neutrophil extracellular trap formation via induction of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Blood.* 2012;120(15):3118-3125.
383. McMahon S., Charbonneau M., Grandmont S., Richard D.E., Dubois C.M. Transforming growth factor beta1 induces hypoxia-inducible factor-1 stabilization through selective inhibition of PHD2 expression. *J Biol Chem.* 2006;281(34):24171-24181.
384. Meng X., Grotzsch B., Luo Y., Knaup K.X., Wiesener M.S., Chen X.X., Jantsch J., Fillatreau S., Schett G., Bozec A. Hypoxia-inducible factor-1 α is a critical transcription factor for IL-10-producing B cells in autoimmune disease. *Nat Commun.* 2018;9(1):251. doi: 10.1038/s41467-017-02683-x.
385. Michiels C. Physiological and pathological responses to hypoxia. *Am J Pathol.* 2004;164(6):1875-1882.
386. Mills E.L., Kelly B., Logan A., Costa A.S.H., Varma M., Bryant C.E., Tourlomousis P., Däbritz J.H.M., Gottlieb E., Latorre I., Corr S.C., McManus G., Ryan D., Jacobs H.T., Szibor M., Xavier R.J., Braun T., Frezza C., Murphy M.P., O'Neill L.A. Succinate dehydrogenase supports metabolic repurposing of mitochondria to drive inflammatory macrophages. *Cell.* 2016;167(2):457-470. doi: 10.1016/j.cell.2016.08.064.
387. Mills E., O'Neill L.A. Succinate: a metabolic signal in inflammation. *Trends Cell Biol.* 2014;24:313-320.
388. Milner E. C., Rudbach J. A., Voneschen K. B. Cellular responses to bacterial lipopolysaccharide: T cells recognize LPS determinants. *Scand J Immunol.* 1983;18:21-28.
389. Mitchell S., Vargas J., Hoffmann A. Signaling via the NF κ B system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2016;8(3):227-241. doi: 10.1002/wsbm.1331.
390. Mole D.R., Blancher C., Copley R.R., Pollard P.J., Gleadle J.M., Ragoussis J., Ratcliffe P.J. Genome-wide association of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha DNA binding with

- expression profiling of hypoxia-inducible transcripts. *J Biol Chem.* 2009;284(25):16767-16775. doi: 10.1074/jbc.M901790200.
391. Moniz S., Biddlestone J., Rocha S. Grow_2 : the HIF system, energy homeostasis and the cell cycle. *Histol Histopathol.* 2014;29(5):589-600. doi: 10.14670/HH-29.10.589.
392. Morrow J.D., Hill K.E., Burk R.F., Nammour T.M., Badr K.F., Roberts II L.J. A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87(23):9383-9387.
393. Mottet D., Dumont V., Deccache Y., Demazy C., Ninane N., Raes M., Michiels C. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α protein level during hypoxic conditions by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/ glycogen synthase kinase 3 β pathway in HepG2 cells. *J Biol Chem.* 2003;278:31277-31285.
394. Mottet D., Michel G., Renard P., Ninane N., Raes M., Michiels C. Role of ERK and calcium in the hypoxia-induced activation of HIF-1. *J Cell Physiol.* 2003;194:30-44.
395. Murr C., Fuith L.C., Widner B., Wirleitner B., Baier-Bitterlich G., Fuchs D. Increased neopterin concentrations in patients with cancer: indicator of oxidative stress? *Anticancer Res.* 1999;19(3A):1721-1728.
396. Murray A.J., Montgomery H.E., Feelisch M., Grocott M.P., Martin D.S. Metabolic adjustment to high-altitude hypoxia: from genetic signals to physiological implications. *Biochem Soc Trans.* 2018;46(3):599-607.
397. Nakamura H., Makino Y., Okamoto K., Poellinger L., Ohnuma K., Morimoto C., Tanaka H. TCR engagement increases hypoxia-inducible factor-1 α protein synthesis via rapamycin-sensitive pathway under hypoxic conditions in human peripheral T cells. *J Immunol.* 2005;174(12):7592-7599.
398. Nakatani Y., Fukui H., Kitano H., Nagamoto I., Tsujimoto T., Kuriyama S., Kikuchi E., Hoppou K., Tsujii T: Endotoxin clearance and its relation to hepatic and renal disturbances in rats with liver cirrhosis. *Liver.* 2001;21:64-70.
399. Naldini A., Morena E., Pucci A., Miglietta D., Riboldi E., Sozzani S., Carraro F. Hypoxia affects dendritic cell survival: Role of the hypoxia-inducible factor-1 α and lipopolysaccharide. *J Cell Physiol.* 2012;227:587-595.
400. Nanduri J., Peng Y.-J., Yuan G., Kumar G.K., Prabhakar N.R. Hypoxia inducible factors and hypertension: lessons from sleep apnea syndrome. *J Mol Med (Berl).* 2015;93(5):473-480. doi: 10.1007/s00109-015-1274-2.
401. Nelson M. Psychological testing at high altitudes. *Aviat Space Environ Med.* 1982;53(2):122-126.
402. Nessler N., Launey Y., Aninat C., Morel F., Malledant Y., Seguin P. Clinical review: the liver in sepsis. *Critical Care.* 2012;16:235.

403. Netzer N., Strohl K., Faulhaber M., Gatterer H., Burtscher M. Hypoxia-related altitude illnesses. *J Travel Med.* 2013;20(4):247-255. doi: 10.1111/jtm.12017.
404. Ng P.C., Cheng S.H., Chui K.M., Fok T.F., Wong M.Y., Wong W., Wong R.P., Cheung K.L. Diagnosis of late onset neonatal sepsis with cytokines, adhesion molecule, and C-reactive protein in preterm very low birth weight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 1997;77(3):F221-227.
405. Nishi K., Oda T., Takabuchi S., Oda S., Fukuda K., Adachi T., Semenza G.L., Shingu K., Hirota K. LPS induces hypoxia-inducible factor 1 activation in macrophage-differentiated cells in a reactive oxygen species-dependent manner. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10(5):983-995. doi: 10.1089/ars.2007.1825.
406. Nizet V., Johnson R.S. Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(9):609-617.
407. Nogare D. Southwestern Internal Medicine Conference: septic shock. *Am. J. Med. Sci.* 1991;302:50-65.
408. Oberholzer C., Oberholzer A., Bahjat F.R., Minter R.M., Tannahill C.L., Abouhamze A., LaFace D., Hutchins B., Clare-Salzler M.J., Moldawer L.L. Targeted adenovirus-induced expression of IL-10 decreases thymic apoptosis and improves survival in murine sepsis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98(20):11503-11508.
409. Oeckinghaus A., Ghosh S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(4):a000034. doi: 10.1101/cshperspect.a000034.
410. Oliver K.M., Garvey J.F., Ng C.T., Veale D.J., Fearon U., Cummins E.P., Taylor C.T. Hypoxia activates NF-kappaB-dependent gene expression through the canonical signaling pathway. *Antioxid Redox Signal.* 2009;11(9):2057-2064. doi: 10.1089/ARS.2008.2400.
411. Oliver K.M., Taylor C.T., Cummins EP. Hypoxia. Regulation of NFkappaB signalling during inflammation: the role of hydroxylases. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(1):215. doi: 10.1186/ar2575.
412. O'Neill L.A., Pearce E.J. Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function. *J Exp Med.* 2016;213(1):15-23.
413. Ono S., Tsujimoto H., Hiraki S., Aosasa S. Mechanisms of sepsis-induced immunosuppression and immunological modification therapies for sepsis. *Ann Gastroenterol Surg.* 2018;2(5):351-358. doi: 10.1002/ags3.12194.
414. Opal S.M., DePalo V.A. Anti-inflammatory cytokines. *Chest.* 2000;117:1162-1172.
415. Padhy G., Sethy N.K., Ganju L., Bhargava K. Abundance of plasma antioxidant proteins confers tolerance to acute hypobaric hypoxia exposure. *High Alt Med Biol.* 2013;14(3):289-297. doi: 10.1089/ham.2012.1095.
416. Pahl H.L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene.* 1999;18(49):6853-6866.

417. Palazon A., Goldrath A.W., Nizet V., Johnson R.S. HIF transcription factors, inflammation, and immunity. *Immunity*. 2014;41(16):518-528.
418. Palmer B.F., Clegg D.J. Oxygen sensing and metabolic homeostasis. *Mol Cell Endocrinol*. 2014;397(1-2):51-58. doi: 10.1016/j.mce.2014.08.001.
419. Palsson-McDermott E.M., O'Neill L.A. Signal transduction by the lipo- polysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology*. 2004;113(2):153-162.
420. Pan H., Wu X. Hypoxia attenuates inflammatory mediators production induced by *Acanthamoeba* via Toll-like receptor 4 signaling in human corneal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;420(3):685-691.
421. Papandreou I., Cairns R.A., Fontana L., Lim A.L., Denko N.C. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab*. 2006;3(3):187-197.
422. Paradowska-Gorycka A., Stypinska B., Pawlik A., Haladyj E., Romanowska-Prochnicka K., Olesinska M. HIF-1A gene polymorphisms and its protein level in patients with rheumatoid arthritis: a case-control study. *Inflamm Res*. 2018;67(5):423-433. doi: 10.1007/s00011-018-1134-y.
423. Paradowska-Gorycka A., Pawlik A., Romanowska-Prochnicka K., Haladyj E., Malinowski D., Stypinska B., Manczak M., Olesinska M. Relationship between VEGF gene polymorphisms and serum VEGF protein levels in patients with rheumatoid arthritis. *PLoS One*. 2016;11(8):e0160769. doi: 10.1371/journal.pone.0160769.
424. Parker L.C., Prince L.R., Sabroe I. Translational mini-review series on Toll-like receptors: networks regulated by Toll-like receptors mediate innate and adaptive immunity. *Clin Exp Immunol*. 2007;147:199-207.
425. Pastille E., Pohlmann S., Wirsdorfer F., Reib A., Flohe S.B. A disturbed interaction with accessory cells upon opportunistic infection with *Pseudomonas aeruginosa* contributes to an impaired IFN- γ production of NK cells in the lung during sepsis-induced immunosuppression. *Innate Immun*. 2015;21:115-26.
426. Patel S., Peacock A. Who will cope at high altitude: is it in the genes? *ISMM News*. 2001;11:5-8.
427. Peacock A.J. ABC of oxygen: oxygen at high altitude. *BMJ*. 1998;317(7165):1063-1066.
428. Perkins N.D. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(1):49-62.
429. Perkins N.D., Gilmore T.D. Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB. *Cell Death Differ*. 2006;13(5):759-772.
430. Peters J.P., van Slyke D.D. Quantitative clinical chemistry. Baltimore: Williams and Wilkins, 1932. – 957 p.

431. Peyssonnaud C., Boutin A.T., Zinkernagel A.S., Datta V., Nizet V., Johnson R.S. Critical role of HIF-1 α in keratinocyte defense against bacterial infection. *J Invest Dermatol.* 2008;128(8):1964-1968.
432. Peyssonnaud C., Cejudo-Martin P., Doedens A., Zinkernagel A.S., Johnson R.S., Nizet V. Cutting edge: essential role of hypoxia inducible factor-1 α in development of lipopolysaccharide-induced sepsis. *J Immunol.* 2007;178(12):7516-7519.
433. Peyssonnaud C., Datta V., Cramer T., Doedens A., Theodorakis E.A., Gallo R.L., Hurtado-Ziola N., Nizet V., Johnson R.S. HIF-1 α expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. *J Clin Investig.* 2005;115:1806-1815.
434. Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(9):e45.
435. Pialoux V., Brugniaux J.V., Fellmann N., Richalet J.-P., Robach P., Schmitt L., Coudert J., Mounier R. Oxidative stress and HIF-1 α modulate hypoxic ventilator responses after hypoxic training on athletes. *Respir Physiol Neurobiol.* 2009;167(2): 217-220. doi: 10.1016/j.resp.2009.04.012.
436. Pickkers P., Sprong T., van Eijk L., van der Hoeven H., Smits P., van Deuren M. Vascular endothelial growth factor is increased during the first 48 hours of human septic shock and correlates with vascular permeability. *Shock.* 2005;24:508e12. doi: 10.1097/01.shk.0000190827.36406.6e.
437. Poniatowski L.A., Wojdasiewicz P., Gasik R., Szukiewicz D. Transforming growth factor beta family: insight into the role of growth factors in regulation of fracture healing biology and potential clinical applications. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:137823. doi: 10.1155/2015/137823.
438. Povoja P., Souza-Dantas V.C., Soares M., Salluh J.I.F. C-reactive protein in critically ill cancer patients with sepsis: influence of neutropenia. *Crit Care.* 2011;15(3):R129.
439. Prabhakar N.R., Kumar G.K., Nanduri J., Semenza G.L. ROS signaling in systemic and cellular responses to chronic intermittent hypoxia. *Antioxid Redox Signal.* 2007;9(9):1397-1403.
440. Prabhakar N. R., Semenza G.L. Responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2. *Physiological Reviews.* 2012;92(3):967-1003. doi: 10.1152/physrev.00030.2011.ADAPTIVE.
441. Pravda J. Metabolic theory of septic shock. *World J Crit Care Med.* 2014;3(2):45-54.
442. Purushothaman J., Suryakumar G., Shukla D., Malhotra A.S., Kasiganesan H., Kumar R., Sawhney R.C., Chami A. Modulatory effects of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides L.*) in hypobaric hypoxia induced cerebral vascular injury. *Brain Res Bull.* 2008;77(5):246-252. doi: 10.1016/j.brainresbull.2008.08.026.
443. Quaglini D., Ronchetti I.P. Cell death in the rat thymus: a minireview. *Apoptosis* 2001;6:389-401.

444. Rangel-Frausto M. S. The epidemiology of bacterial sepsis. *Infect Dis Clin North Am.* 1999;13:299-312.
445. Rashed L., Abdel Hay R., Mahmoud R., Hasan N., Zahra A., Fayez S. Association of angiotensin-converting enzyme (ACE) gene polymorphism with inflammation and cellular cytotoxicity in vitiligo patients. *PLoS One.* 2015;10(7):e0132915. doi: 10.1371/journal.pone.0132915.
446. Ratcliffe P.J. Oxygen sensing and hypoxia signaling pathways in animals: the implications of physiology for cancer. *J Physiol.* 2013;591(8):2027-2042. doi: 10.1113/jphysiol.2013.251470.
447. Ratcliffe P., Koivunen P., Myllyharju J., Ragoussis J., Bovee J VMG., Batinic-Haberle I., Vinatier C., Trichet V., Robriquet F., Oliver L., Gardie B. Update on hypoxia-inducible factors and hydroxylases in oxygen regulatory pathways: from physiology to therapeutics. *Hypoxia.* 2017;5:11-20. doi: 10.2147/HP.S127042.
448. Remick D.G. Pathophysiology of sepsis. *Am J Pathol.* 2007;170(5):1435-1444.
449. Reynolds K., Novosad B., Hoffhines A., Gipson J., Johnson J., Peters J., Gonzalez F., Gimble J., Hill M. Pretreatment with troglitazone decreases lethality during endotoxemia in mice. *J Endotoxin Res.* 2002;8(4):307-314.
450. Richalet J.P., Letourne M., Souberbielle J.C. Effects of high altitude hypoxia on the hormonal response to hypothalamic factors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010;299:R1685.
451. Richard D. E., Berra E., Pouyssegur J. Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1 α in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2000;275:26765-26771.
452. Richard N.A., Sahota I.S., Widmer N., Ferguson S., Sheel A.W., Koehle M.S. Acute mountain sickness, chemosensitivity and cardio-respiratory responses in humans exposed to hypobaric and normobaric hypoxia. *J Appl Physiol.* 2014;116(7):945-952.
453. Riess T., Andersson S.G.E., Lupas A., Schaller M., Schafer A., Kyme P., Martin J., Walzlein J.H., Eehalt U., Lindroos H., Schirle M., Nordheim A., Autenrieth I.B., Kempf V.A. Bartonella adhesin a mediates a proangiogenic host cell response. *J Exp Med.* 2004;200(10):1267e78. doi: 10.1084/jem.20040500.
454. Rietschel E. T., Brade H. Bacterial endotoxins. *Sci Am.* 1992;267(2):54-61.
455. Rietschel E. T., Brade H., Holst O., Brade L., Muller-Loennies S., Mamat U., Zahringer U., Beckmann F., Seydel U., Brandenburg K., Ulmer A.J., Mattern T., Heine H., Schletter J., Loppnow H., Schonbeck U., Flad H.D., Hauschildt S., Schade U.F., Di Padova F., Kusumoto S., Schumann R.R. Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996;216:39-81.
456. Rimmele T., Payen D., Cantaluppi V., Marshall J., Gomez H., Gomez A., Murray P., Kellum J.A. Immune cell phenotype and function in sepsis. *Shock.* 2016;45(3):282-291.

457. Rimoldi S.F., Sartori C., Seiler C., Delacretaz E., Mattle H.P., Scherrer U., Allemann Y. High-altitude exposure in patients with cardiovascular disease: risk assessment and practical recommendations. *Prog Cardiovasc Dis.* 2010;52(6):512-524.
458. Rius J., Guma M., Schachtrup C., Akassoglou K., Zinkernagel A.S., Nizet V., Johnson R.S., Haddad G.G., Karin M. NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature.* 2008;453(7196):807-811. doi: 10.1038/nature06905.
459. Roberts A.B. Molecular and cell biology of TGF-beta. *Miner Electrolyte Metab.* 1998;24(2-3):111-119.
460. Roberts L.J., Morrow J.D. Products of the isoprostane pathway: unique bioactive compounds and markers of lipid peroxidation. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59(5):808-820.
461. Robinson A., Keely S., Karhausen J., Gerich M.E., Furuta G.T., Colgan S.P. Mucosal protection by hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibition. *Gastroenterology.* 2008;134:145-155.
462. Rodriguez F.A., Ventura J.L., Casas M., Casas H., Pages T., Rama R., Ricart A., Palacios L., Viscor G. Erythropoietin acute reaction and haematological adaptations to short, intermittent hypobaric hypoxia. *Eur J Appl Physiol.* 2000;82(3):170-177.
463. Rodriguez-Espinosa O., Rojas-Espinosa O., Moreno-Altamirano M.M., Lopez-Villegas E.O., Sanchez-Garcia F.J. Metabolic requirements for neutrophil extracellular traps formation. *Immunology.* 2015;145(2):213-224.
464. Rodriguez-Prados J.C., Traves P.G., Cuenca J., Rico D., Aragonés J., Martín-Sanz P., Cascante M., Bosca L. Substrate fate in activated macrophages: a comparison between innate, classic, and alternative activation. *J Immunol.* 2010;185(1):605-14. doi:10.4049/jimmunol.0901698.
465. Rossol M., Heine H., Meusch U., Quandt D., Klein C., Sweet M.J., Hauschildt S. LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Crit Rev Immunol.* 2011;31:379-446. doi: /10.1615/CritRevImmunol.v31.i5.20.
466. Ruas J.L., Poellinger L., Pereira T. Functional analysis of hypoxia-inducible factor-1 alpha-mediated transactivation. Identification of amino acid residues critical for transcriptional activation and/or interaction with CREB-binding protein. *J Biol Chem.* 2002;277(41):38723-38730.
467. Ruiters D.J., van der Meulen J., Brouwer A., Hummel M.J., Mauw B.J., van der Ploeg J.C., Wisse E. Uptake by liver cells of endotoxin following its intravenous injection. *Lab Invest.* 1981;45(1):38-45.
468. Ryan H.E., Lo J., Johnson R.S. HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J.* 1998;17(11):3005-3015.
469. Ryan S., Taylor C.T., McNicholas W.T. Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. *Circulation.* 2005;112(17):2660-2667.

470. Sadiku P., Walmsley S.R. Hypoxia and the regulation of myeloid cell metabolic imprinting: consequences for the inflammatory response. *EMBO Rep.* 2019;20(5):e47388. doi: 10.15252/embr.201847388.
471. Saed G., Collins K., Diamond M. Transforming growth factors beta1, beta2 and beta3 and their receptors are differentially expressed in human peritoneal fibroblasts in response to hypoxia. *Am J Reprod Immunol.* 2002;48(6):387-393.
472. Sakai J., Cammarota E., Wright J.A., Cicuta P., Gottschalk R.A., Li N., Fraser I.D.C., Bryant C.E. Lipopolysaccharide-induced NF- κ B nuclear translocation is primarily dependent on MyD88, but TNF α expression requires TRIF and MyD88. *Sci Rep.* 2017;7(1):1428. doi: 10.1038/s41598-017-01600-y.
473. Sakurai H., Miyoshi H., Toriumi W., Sugita T. Functional interactions of transforming growth factor beta-activated kinase 1 with IkappaB kinases to stimulate NFkappaB activation. *J Biol Chem* 1999;274:10641-10648.
474. Saleh A., Stathopoulou M.G., Dade S., Ndiaye N.C., Azimi-Nezhad M., Murray H., Masson C., Lamont J., Fitzgerald P., Visvikis-Siest S. Angiogenesis related genes NOS3, CD14, MMP3 and IL4R are associated to VEGF gene expression and circulating levels in healthy adults. *BMC Med Genet.* 2015;16:90. doi: 10.1186/s12881-015-0234-6.
475. Salminen A., Kaarniranta K., Kauppinen A. Hypoxia-inducible histone lysine demethylases: impact on the aging process and age-related disease. *Aging Dis.* 2016;7:180-200. doi: 10.14336/AD.2015.0929
476. Sanchez-Elsner T., Botella L.M., Velasco B., Corbi A., Attisano L., Bernabeu C. Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor-beta pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression. *J Biol Chem.* 2001;276(42):38527-38535.
477. Sanchez-Elsner T., Ramirez J.R., Sanz-Rodriguez F., Varela E., Bernabeu C., Botella L.M. A cross-talk between hypoxia and TGF-beta orchestrates erythropoietin gene regulation through SP1 and Smads. *J Mol Biol.* 2004;336(1):9-24.
478. Sanjabi S., Zenewicz L.A., Kamanaka M., Flavell R.A. Anti- and pro-inflammatory roles of TGF- β , IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Curr Opin Pharmacol.* 2009;9(4):447-453. doi:10.1016/j.coph.2009.04.008.
479. Santore M.T., McClintock D.S., Lee V.Y., Budinger G.R.S., Chandel N.S. Anoxia-induced apoptosis occurs through a mitochondria-dependent pathway in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002;282(4):L727-L734.
480. Sapolsky R.M., Romero L.M., Munck A.U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev.* 2000;21(1):55-89.

481. Savino W. The thymus is a common target organ in infectious diseases. *PLoS Pathogens*. 2006;2(6):e62. doi: 10.1371/journal.ppat.0020062.
482. Sceneay J., Chow M.T., Chen A., Halse H.M., Wong C.S.F., Andrews D.M., Sloan E.K., Parker B.S., Bowtell D.D., Smyth M.J., Moller A. Primary tumor hypoxia recruits CD11b⁺/Ly6C^{med}/Ly6G⁺ immune suppressor cells and compromises NK cell cytotoxicity in the premetastatic niche. *Cancer Res*. 2012;72(16):3906-3911.
483. Schaffer K., Taylor C. T. The impact of hypoxia on bacterial infection. *FEBS J*. 2015;282(12):2260-2266.
484. Schaible B., McClean S., Selfridge A., Broquet A., Asehnoune K., Taylor C.T., Schaffer K. Hypoxia modulates infection of epithelial cells by *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One*. 2013;8(2):e56491. doi: 10.1371/journal.pone.0056491.
485. Scheinfeldt L.B., Soi S., Thompson S., Ranciaro A., Woldemeskel D., Beggs W., Lambert C., Jarvis J.P., Abate D., Belay G., Tishkoff S.A. Genetic adaptation to high altitude in the Ethiopian highlands. *Genome Biol*. 2012;13(1):R1. doi: 10.1186/gb-2012-13-1-r1.
486. Schodel J., Oikonomopoulos S., Ragoussis J., Pugh C.W., Ratcliffe P.J., Mole D.R. High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq *Blood*. 2011;117(23):e207-e217. doi: 10.1182/blood-2010-10-314427.
487. Schoenborn J.R., Wilson C.B. Regulation of interferon- γ during innate and adaptive immune responses. *Advances in Immunology*. 2007;96:41-101.
488. Schofield C.J., Zhang, Z. Structural and mechanistic studies on 2-oxoglutarate-dependent oxygenases and related enzymes. *Curr Opin Struct Biol*. 1999;9(6):722-731.
489. Scholz C.C., Taylor C.T. Hydroxylase-dependent regulation of the NF- κ B pathway. *Biol Chem*. 2013;394(4):479-493.
490. Schonenberger M.J., Kovacs W.J. Hypoxia signaling pathways: modulators of oxygen-related organelles. *Front Cell Dev Biol*. 2015;3:42. doi: 10.3389/fcell.2015.00042.
491. Scortegagna M., Cataisson C., Martin R.J., Hicklin D.J., Schreiber R.D., Yuspa S.H., Arbeit J.M. HIF-1 α regulates epithelial inflammation by cell autonomous NF κ B activation and paracrine stromal remodeling. *Blood*. 2008;111:3343-3354.
492. Seagroves T.N., Ryan H.E., Lu H., Wouters B.G., Knapp M., Thibault P., Laderoute K., Johnson R.S. Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the Pasteur effect in mammalian cells. *Mol Cell Biol*. 2001;21:3436-3444.
493. Semenza G.L. Life with oxygen. *Science*. 2007;318:62-64.
494. Semenza G.L. Regulation of metabolism by hypoxia-inducible factor 1. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2011;76:347-353.
495. Semenza G.L. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*. 2012;148(3):399-

408. doi: 10.1016/j.cell.2012.01.021.
496. Semenza G.L. Hypoxia-Inducible Factor 1 and cardiovascular disease. *Annu Rev Physiol.* 2013;76(1):39-56.
497. Semenza G.L. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology. *Annu Rev Pathol.* 2014;9:47-71. doi: 10.1146/annurev-pathol-012513-104720.
498. Semenza G.L., Nejfelt M.K., Chi S.M., Antonarakis S.E. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88(13):5680-5684.
499. Semenza G.L., Roth P.H., Fang H.M., Wang G.L. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 1994;269(38):23757-23763.
500. Semenza G.L., Wang G.L. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol.* 1992;12(12):5447-5454.
501. Sen R., Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell.* 1986;46(5):705-716.
502. Sen R., Baltimore D. Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism. *Cell.* 1986;47(6):921-928.
503. Seppet E., Gruno M., Peetsalu A., Gizatullina Z., Nguyen H.P., Vielhaber S., Wussling M.H., Trumbeckaite S., Arandarcikaite O., Jerzembeck D., Sonnabend M., Jegorov K., Zierz S., Striggow F., Gellerich F.N. Mitochondria and energetic depression in cell pathophysiology. *Int J Mol Sci.* 2009;10(5):2252-2303. doi: 10.3390/ijms10052252.
504. Serebrovskaya T. V., Xi L. Individualized intermittent hypoxia training: principles and practices. *Intermittent Hypoxia and Human Diseases*, L. Xi and T. Serebrovskaya, Eds., Springer: London, UK, 2012.
505. Shehade H, Acolty V, Moser M, Oldenhove G. Cutting edge: hypoxia-inducible factor 1 negatively regulates Th1 function. *J Immunol.* 2015;195(4):1372-1376.
506. Shih S.C., Claffey K.P. Role of AP-1 and HIF-1 transcription factors in TGF-beta activation of VEGF expression. *Growth Factors.* 2001;19(1):19-34.
507. Shin D.H., Lin H., Zheng H., Kim K.S., Kim J.Y., Chun Y.S., Park J.W., Nam J.H., Kim W.K., Zhang Y.H., Kim S.J. HIF-1 α -mediated upregulation of TASK-2 K⁺ channels augments Ca²⁺ signaling in mouse B cells under hypoxia. *J Immunol.* 2014;193(10):4924-33. doi: 10.4049/jimmunol.1301829.
508. Shrivastava K., Ram M.S., Bansal A., Singh S.S., Ilavazhagan G. Cobalt supplementation promotes hypoxic tolerance and facilitates acclimatization to hypobaric hypoxia in rat brain. *High Alt Med Biol.* 2008;9:63-75.

509. Siegel P., Massaguer J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:807-821.
510. Silver I., Erecinka M. Oxygen and ion concentrations in normoxic and hypoxic brain cells. *Adv Exp Med Biol*. 1998;454:7-16.
511. Silverman M.N., Pearce B.D., Biron C.A., Miller A.H. Immune modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis during viral infection. *Viral Immunol*. 2005;18(1):41-78.
512. Sinha S., Ray U.S., Tomar O.S., Singh S.N. Different adaptation patterns of antioxidant system in natives and sojourners at high altitude. *Respir Physiol Neurobiol*. 2009;167(3):255-260. doi: 10.1016/j.resp.2009.05.003.
513. Slaats J., ten Oever J., van de Veerdonk F.L., Netea M.G. IL-1 β /IL-6/CRP and IL-18/ferritin: distinct inflammatory programs in infections. *PLoS Pathog*. 2016;12(12):e1005973. doi:10.1371/journal.ppat.1005973.
514. Smolkova K., Plecica-Hlavata L., Bellance N., Benard G., Rossignol R., Jezek P. Waves of gene regulation suppress and then restore oxidative phosphorylation in cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011;43(7):950-968. doi: 10.1016/j.biocel.2010.05.003.
515. Solt L.A., May M.J. The I κ B kinase complex: master regulator of NF- κ B signaling. *Immunol Res*. 2008;42:3-18.
516. Solti I., Kvell K., Talaber G., Veto S., Acs P., Gallyas F., Illes Z., Fekete K., Zalan P., Szanto A., Bognar Z. Thymic atrophy and apoptosis of CD4+CD8+ thymocytes in the cuprizone model of multiple sclerosis. *PLoS One*. 2015;10(6):e0129217. doi: 10.1371/journal.pone.0129217.
517. Souza-Fonseca-Guimaraes F., Adib-Conquy M., Cavailion J.M: Natural Killer (NK) cells in antibacterial innate immunity: angels or devils? *Mol Med*. 2012;18:270-285.
518. Starska K., Forma E., Jozwiak P., Brys M., Lewy-Trenda I., Brzezinska-Błaszczuk E., Krzeslak A. Gene and protein expression of glucosetransporter 1 and glucose transporter 3 in human laryngeal cancer-therelationship with regulatory hypoxia-inducible factor-1 expression, tumorinvasiveness, and patient prognosis. *Tumour Biol*. 2015;36(4):2309-2321. doi: 10.1007/s13277-014-2838-4.
519. Stehr S.N., Knels L., Weissflog C., Schober J., Haufe D., Lupp A., Koch T., Heller A.R. Effects of IGM-enriched solution on polymorphonuclear neutrophil function, bacterial clearance, and lung histology in endotoxemia. *Shock*. 2008;29(2):167-172.
520. Stothers C. L., Luan L., Fensterheim B.A., Bohannon J. K. Hypoxia-inducible factor-1 α regulation of myeloid cells. *J Mol Med*. 2018;96(12):1293-1306. doi: 10.1007/s00109-018-1710-1.
521. Strauss E., Waliszewski K., Oszkinis G., Staniszewski R. Polymorphisms of genes involved in the hypoxia signaling pathway and the development of abdominal aortic aneurysms or large-artery atherosclerosis. *J Vasc Surg*. 2015;61(5):1105-1113. doi: 10.1016/j.jvs.2014.02.007.

522. Stroka D.M., Burkhardt T., Desbaillets I., Wenger R.H., Neil D.A.H., Bauer C., Gassmann M., Candinas D. HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. *FASEB J.* 2001;15(13): 2445-2453.
523. Suffredini A.F., Reda D., Banks S.M., Tropea M., Agosti J.M., Miller R. Effects of recombinant dimeric TNF receptor on human inflammatory responses following intravenous endotoxin administration. *J Immunol.* 1995;155(10):5038-5045.
524. Suganami T., Ogawa Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. *J Leukoc Biol.* 2010;88(1):33-39.
525. Sumbayev V.V., Yasinska I.M. Mechanisms of hypoxic signal transduction regulated by reactive nitrogen species. *Scand J Immunol.* 2007;65(5):399-406.
526. Sun M., He C., Wu W., Zhou G., Liu F., Cong Y., Liu Z. Hypoxia inducible factor-1 α -induced interleukin-33 expression in intestinal epithelia contributes to mucosal homeostasis in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol.* 2017;187(3):428-440. doi: 10.1111/cei.12896.
527. Sun S.C. The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation. *Nature Reviews Immunology.* 2017;17:545-558.
528. Suzuki N., Gradin K., Poellinger L., Yamamoto M. Regulation of hypoxia-inducible gene expression after HIF activation. *Exp Cell Res.* 2017;356(2):182-186. doi: 10.1016/j.yexcr.2017.03.013.
529. Tafani M., Sansone L., Limana F., Arcangeli T., De Santis E., Polese M., Fini M., Russo M.A. The interplay of reactive oxygen species, hypoxia, inflammation, and sirtuins in cancer initiation and progression. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:3907147. doi: 10.1155/2016/3907147.
530. Taga K., Tosato G. IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. *J Immunol.* 1992;148(4):1143-1148.
531. Tannahill G.M., Curtis A.M., Adamik J., Palsson-McDermott E.M., McGettrick A.F., Goel G., Frezza C., Bernard N.J., Kelly B., Foley N.H., Zheng L., Gardet A., Tong Z., Jany S.S., Corr S.C., Haneklaus M., Caffrey B.E., Pierce K., Walmsley S., Beasley F.C., Cummins E., Nizet V., Whyte M., Taylor C.T., Lin H., Masters S.L., Gottlieb E., Kelly V.P., Clish C., Auron P.E., Xavier R.J., O'Neill L.A. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature.* 2013;496(7444):238-242.
532. Taveira da Silva A.M., Kaulbach H.C., Chuidian F.S., Lambert D.R., Suffredini A.F., Danner R.L. Shock and multiple-organ dysfunction after self-administration of Salmonella endotoxin. *N Engl J Med.* 1993;328(20):1457-1460.
533. Taylor C.T., Colgan S.P. Hypoxia and gastrointestinal disease. *J Mol Med (Berl).* 2007;85(12):1295-1300.
534. Taylor C. T., Colgan S. P. Regulation of immunity and inflammation by hypoxia in immunological niches. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(12):774-785. doi: 10.1038/nri.2017.103.

535. Taylor C.T., Doherty G., Fallon P.G., Cummins E.P. Hypoxia-dependent regulation of inflammatory pathways in immune cells. *J Clin Invest.* 2016;126(10):3716-3724. doi: 10.1172/JCI84433.
536. Taylor C.T., Kent B.D., Crinion S.J., McNicholas W.T., Ryan S. Human adipocytes are highly sensitive to intermittent hypoxia induced NF-kappaB activity and subsequent inflammatory gene expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;447:660-665.
537. Textoris J., Beaufils N., Quintana G., Ben Lassoued A., Zieleskiewicz L., Wiramus S., Blasco V., Lesavre N., Martin C., Gabert J., Leone M. Hypoxia-inducible factor (HIF1a) gene expression in human shock states. *Crit Care.* 2012;16(4):R120. doi: 10.1186/cc11414.
538. Thompson A.A., Binham J., Plant T., Whyte M.K., Walmsley S.R. Hypoxia, the HIF pathway and neutrophilic inflammatory responses. *Biol Chem.* 2013;394(4):471-477.
539. Thornton R.D., Lane P., Borghaei R.C., Pease E.A., Caro J., Mochan E. Interleukin 1 induces hypoxia-inducible factor 1 in human gingival and synovial fibroblasts. *Biochem J.* 2000;350:307-312.
540. Tian H., McKnight S. L., Russell D. W. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev.* 1997;11(1):72-82.
541. Tsuji T, Asano Y, Handa T, Honma Y, Ichinose Y, Yokochi T. Induction of apoptosis in lymphoid tissues of mice after intramuscular injection of enterotoxigenic *Escherichia coli* enterotoxin. *Immunobiology.* 2000;201(3-4):377-390.
542. Tregub P., Kulikov V., Bepalov A. Tolerance to acute hypoxia maximally increases in case of joint effect of normobaric hypoxia and permissive hypercapnia in rats. *Pathophysiology.* 2013;20(3):165-170. doi: 10.1016/j.pathophys.2013.09.001.
543. Triner D., Shah Y.M. Hypoxia-inducible factors: a central link between inflammation and cancer. *J Clin Invest.* 2016;126(10):3689-3698. doi: 10.1172/JCI84430.
544. Tug S., Delos Reyes B., Fandrey J., Berchner-Pfannschmidt U. Non-hypoxic activation of the negative regulatory feedback loop of prolyl-hydroxylase oxygen sensors. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;384(4):519-523. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.05.016.
545. Ueno M., Maeno T., Nomura M., Aoyagi-Ikeda K., Matsui H., Hara K., Tanaka T., Iso T., Suga T., Kurabayashi M. Hypoxia-inducible factor-1 α mediates TGF- β -induced PAI-1 production in alveolar macrophages in pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Cell Mol Physiol.* 2011;300(5):L740-L752.
546. Uniacke J., Holterman C.E., Lachance G., Franovic A., Jacob M.D., Fabian M.R., Payette J., Holcik M., Pause A., Lee S. An oxygen-regulated switch in the protein synthesis machinery. *Nature.* 2012;486(7401):126-129. doi: 10.1038/nature11055.
547. Uzzan B., Cohen R., Nicolas P., Cucherat M., Perret G.Y. Procalcitonin as a diagnostic test for sepsis in critically ill adults and after surgery or trauma: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med.* 2006;34(7):1996-2003.

548. van der Flier M., Stockhammer G., Vonk G.J., Nikkels P.G., van Diemen- Steenvoorde R.A., van der Vlist G.J., Rupert S.W., Schmutzhard E., Gunsilius E., Gastl G., Hoepelman A.I., Kimpen J.L., Geelen S.P. Vascular endothelial growth factor in bacterial meningitis: detection in cerebrospinal fluid and localization in postmortem brain. *J Infect Dis.* 2001;183(1):149e53. doi: 10.1086/317643.
549. van der Poll T., Marchant A., Keogh C.V., Goldman M., Lowry S.F. Interleukin-10 impairs host defense in murine pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis.* 1996;174(5):994-1000.
550. van der Poll T., van de Veerdonk F.L., Scicluna B.P., Netea M.G. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(7):407-420.
551. van Patot M. C., Gassmann M. Hypoxia: adapting to high altitude by mutating EPAS-1, the gene encoding HIF-2 α . *High Alt Med Biol.* 2011;12(2):157-167. doi: 10.1089/ham.2010.1099.
552. van Uden P., Kenneth N.S., Rocha S. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by NF-kappaB. *Biochem J.* 2008;412(3):477-484. doi: 10.1042/BJ20080476.
553. van Uden P., Kenneth N.S., Webster R., Muller H.A., Mudie S., Rocha S. Evolutionary conserved regulation of HIF-1 β by NF-kappaB. *PLoS Genet.* 2011;7(1):e1001285. doi: 10.1371/journal.pgen.1001285.
554. van't Erve T.J., Kadiiska M.B., London S.J., Mason R.P. Classifying oxidative stress by F₂-isoprostane levels across human diseases: a meta-analysis. *Redox Biol.* 2017;12:582-599. doi: 10.1016/j.redox.2017.03.024.
555. Varma T.K., Lin C.Y., Toliver-Kinsky T.E., Sherwood E.R. Endotoxin-induced gamma interferon production: contributing cell types and key regulatory factors. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002;9:530-543.
556. Vary T.C., Kimball S.R. Regulation of hepatic protein synthesis in chronic inflammation and sepsis. *Am J Physiol.* 1992;262:C445-452.
557. Veloso M.A. Ecological, biological and genetic research amongst the vertebrate and human populations of the altiplano (Chile). In *Environmental and Human Population Problems at High Altitude*, 1981. – P. 37-43.
558. Vigushin D.M., Pepys M.B., Hawkins P.N. Metabolic and scintigraphic studies of radioiodinated human C-reactive protein in health and disease. *J Clin Invest.* 1993;91(4):1351-1357. doi:10.1172/JCI116336.
559. Vollger L., Akong-Moore K., Cox L., Goldmann O., Wang Y., Schafer S.T., Naim H.Y., Nizet V., von Kockritz-Blickwede M. Iron-chelating agent desferrioxamine stimulates formation of neutrophil extracellular traps (NETs) in human blood-derived neutrophils. *Biosci Rep.* 2016;36(3):e00333.
560. Vogel S.N., Hilfiker M.L., Caulfield M.J. Endotoxin-induced T lymphocyte proliferation. *J. Immunol.* 1983;130:1774-1779.

561. Vogel S.N., Hogan M.M. Role of cytokines in endotoxin-mediated host responses. (J. J. Oppenheim and E. M. Shevach, eds.), Oxford University Press: New York, 1990. – P. 238-258.
562. Vogelberg K.H., Konig M. Hypoxia of diabetic feet with abnormal arterial blood flow. *Clin Investig.* 1993;71(6):466-470.
563. Walmsley S.R., Print C., Farahi N., Peyssonnaud C., Johnson R.S., Cramer T., Sobolewski A., Condliffe A.M., Cowburn A.S., Johnson N., Chilvers E.R. Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1 α -dependent NF- κ B activity. *J Exp Med.* 2005;201(1):105-115.
564. Wang G.L., Jiang B.H., Rue E.A., Semenza G.L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92(12):5510-5514.
565. Wang J.S., Liu H.C. Systemic hypoxia enhances bactericidal activities of human polymorphonuclear leucocytes. *Clin Sci (Lond).* 2009;116(11):805-817. doi: 10.1042/CS20080224.
566. Wang P., Wu P., Siegel M.I., Egan R.W., Billah M.M. Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor κ B (NF κ B) activation in human monocytes. *J Biol Chem.* 1995;270:9558-9563.
567. Watts E.R., Walmsley S.R. Inflammation and hypoxia: HIF and PHD isoform selectivity. *Trends Mol Med.* 2019;25(1):33-46. doi: 10.1016/j.molmed.2018.10.006.
568. Wenger R.H., Kurtcuoglu V., Scholz C.C., Marti H.H., Hoogewijs D. Frequently asked questions in hypoxia research. *Hypoxia.* 2015;3:35-43.
569. Wenger R.H., Stiehl D.P., Camenisch G. Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci STKE.* 2005;2005(306):re12.
570. Werth N., Beerlage C., Rosenberger C., Yazdi A.S., Edelmann M., Amr A., Bernhardt W., von Eiff C., Becker K., Schafer A., Peschel A., Kempf V.A. Activation of hypoxia inducible factor 1 is a general phenomenon in infections with human pathogens. *PLoS One.* 2010;5(7):e11576. doi: 10.1371/journal.pone.0011576.
571. West J.B. Human responses to extreme altitudes. *Integr Comp Biol.* 2006;46(1):25-34. doi: 10.1093/icb/icj005.
572. Wheaton W.W., Chandel N.S. Hypoxia. 2. Hypoxia regulates cellular metabolism. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2011;300(3):C385-C393. doi: 10.1152/ajpcell.00485.2010.
573. Widner B., Wirleitner B., Baier-Bitterlich G., Weiss G., Fuchs D. Cellular immune activation, neopterin production, tryptophan degradation and the development of immunodeficiency. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2000;48(4):251-258.
574. Wiener C.M., Booth G., Semenza G.L. In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;225(2):485-488.
575. Wiesener M.S., Jurgensen J.S., Rosenberger C., Scholze C.K., Horstrup J.H., Warnecke C., Mandriota S., Bechmann I., Frei U.A., Pugh C.W., Ratcliffe P.J., Bachmann S., Maxwell P.H., Eckardt

- K.U. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 alpha in distinct cell populations of different organs. *FASEB J.* 2003;17(2):271-273.
576. Wobben R., Husecken Y., Lodewick C., Gibbert K., Fandrey J., Winning S. Role of hypoxia inducible factor-1 α for interferon synthesis in mouse dendritic cells. *Biol Chem.* 2013;394:495-505.
577. Wu P., Hua Y., Tan S., Li M., Yongxiang S., Fang G. Interactions of smoking with rs833061 polymorphism on the risk of non-alcoholic fat liver disease in Hubei Han population: a preliminary case-control study. *Iran J Basic Med Sci.* 2015;18(11):1112-1117.
578. Xue X., Ramakrishnan S., Anderson E., Taylor M., Zimmermann E.M., Spence J.R., Huang S., Greenson J.K., Shah Y.M. Endothelial PAS domain protein 1 activates the inflammatory response in the intestinal epithelium to promote colitis in mice. *Gastroenterology.* 2013;145:831-841.
579. Yaguchi A., Yuzawa J., Klein D.J., Takeda M., Harada T. Combining intermediate levels of the Endotoxin Activity Assay (EAA) with other biomarkers in the assessment of patients with sepsis: results of an observational study. *Crit Care.* 2012;16(3):R88.
580. Yamamoto M., Akira S. Lipid A receptor TLR4- mediated signaling pathways. *Adv Exp Med Biol.* 2010;667:59-68. doi: 10.1007/978-1-4419-1603-7_6.
581. Yan X., Liu Z., Chen Y. Regulation of TGF-beta signaling by Smad7. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2009;41(4):263-272.
582. Yang S.L., Wu C., Xiong Z.F., Fang X. Progress on hypoxia-inducible factor-3: Its structure, gene regulation and biological function (Review). *Mol Med Rep.* 2015;12(2):2411-2416. doi: 10.3892/mmr.2015.3689.
583. Yano K., Liaw P.C., Mullington J.M., Shih S.C., Okada H., Bodyak N., Kang P.M., Toltl L., Belikoff B., Buras J., Simms B.T., Mizgerd J.P., Carmeliet P., Karumanchi S.A., Aird W.C. Vascular endothelial growth factor is an important determinant of sepsis morbidity and mortality. *J Exp Med.* 2006;203(6):1447-1458.
584. Yeh F.L., Lin W.L., Shen H.D. Changes in circulating levels of an anti-inflammatory cytokine interleukin 10 in burned patients. *Burns.* 2000;26(5):454-459.
585. Yu Z.G., Wang B.Z., Cheng Z.Z. The association of genetic polymorphisms of hypoxia inducible factor-1 alpha and vascular endothelial growth factor with increased risk of chronic obstructive pulmonary disease: A case-control study. *Kaohsiung J Med Sci.* 2017;33:433-441.
586. Zahringer U., Lindner B., Rietschel E. T. Molecular structure of lipid A, the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharides. *Adv Carbohydr Chem Biochem.* 1994;50:211-276.
587. Zhang W., Petrovic J.M., Callaghan D., Jones A., Cui H., Howlett C., Stanimirovic D. Evidence that hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) mediates transcriptional activation of interleukin-1beta (IL-1beta) in astrocyte cultures. *J Neuroimmunol.* 2006;174(1-2):63-73.

588. Zheng X., Zhai B., Koivunen P., Shin S.J., Lu G., Liu J., Geisen C., Chakraborty A.A., Moslehi J.J., Smalley D.M., Wei X., Chen X., Chen Z., Beres J.M., Zhang J., Tsao J.L., Brenner M.C., Zhang Y., Fan C., DePinho R.A., Paik J., Gygi S.P., Kaelin W.G., Zhang Q. Prolyl hydroxylation by EglN2 destabilizes FOXO3a by blocking its interaction with the USP9x deubiquitinase. *Genes Dev.* 2014;28(13):1429-1444. doi: 10.1101/gad.242131.114.
589. Zhou C.H., Zhang X.P., Liu F., Wang W. Modeling the interplay between the HIF-1 and p53 pathways in hypoxia. *Sci Rep.* 2015;5:13834. doi: 10.1038/srep13834.
590. Zhou Y.J., Peng H., Chen Y., Liu Y.L. Alterations of thymic epithelial cells in lipopolysaccharide-induced neonatal thymus involution. *Chin Med J (Engl).* 2016;129(1):59-65. doi: 10.4103/0366-6999.172577.
591. Zimna A., Kurpisz M. Hypoxia-inducible factor-1 in physiological and pathophysiological angiogenesis: applications and therapies. *Biomed Res Int.* 2015;2015:549412. doi: 10.1155/2015/549412.
592. Zouali M., Richard Y. Marginal zone B-cells, a gatekeeper of innate immunity. *Front Immunol.* 2011;2:63. doi: 10.3389/fimmu.2011.00063.