

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**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Москва – 2019**

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт морфологии человека»

**Научные руководители:** доктор медицинских наук, профессор  
**Макарова Ольга Васильевна**

доктор биологических наук  
**Диатроптов Михаил Евгеньевич**

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории общей патологии нервной системы Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

**Кирова Юлия Игоревна**

кандидат медицинских наук, доцент кафедры патофизиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Байбурина Гульнар Анузовна**

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем РАН Российской академии наук (123007, г. Москва, Хорошевское шоссе, д. 76 А)

Защита диссертации состоится \_\_\_\_\_ 2019 года в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета (Д 001.004.01) Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека» по адресу: 117418, г. Москва, ул. Цюрупы, д. 3

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека» и на сайте <http://www.morfolhum.ru>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 г.

**Ученый секретарь диссертационного совета**

доктор медицинских наук

**Михайлова Лилия Петровна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### 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 $\alpha$*  (*Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$* ), 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 $\alpha$ , взаимосвязан с ядерным фактором NF- $\kappa$ 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 промотора гена HIF-1 $\alpha$  содержится NF- $\kappa$ B-связывающий сайт (Rius J. et al., 2008; van Uden P. et al., 2008). S. Frede et al. в 2006 г. показали, что липополисахарид (ЛПС) вызывает NF- $\kappa$ B-зависимое повышение уровня мРНК и содержания белка HIF-1 $\alpha$  (Frede S. et al., 2006), что, в свою очередь, может активировать NF- $\kappa$ B. Известно, что ингибиторы, способствующие убиквитин-зависимому разрушению HIF-1 $\alpha$ , контролируют также активность киназного комплекса IKK (IkB Kinase, киназа ингибитора NF- $\kappa$ B – IkB), отвечающего за регуляцию NF- $\kappa$ B (Cummins E.P. et al., 2006; Oliver K.M. et al., 2009; Hirota K., 2015).

Активация HIF-1 $\alpha$  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-1 $\alpha$  снижает активность воспаления в толстой кишке. Дефицит HIF-1 $\alpha$  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-1 $\alpha$  способствует увеличению содержания в сыворотке крови провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ) и высокой смертности животных (Peyssonaux C. et al., 2007). J. Textoris et al. (2012) предполагают, что оценку уровня активации HIF-1 $\alpha$  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 Oral S.M., 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-1 $\alpha$  и NF- $\kappa$ B, тесно взаимосвязаны, устойчивость организма к кислородной недостаточности может быть одним из факторов, определяющих 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. и 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 Богомоллов 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% O<sub>2</sub>, 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-1α*, транскрипционного фактора *Nf-κb* 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, эритропоэтина, белков HIF-1α, 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.
6. 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 инфрадианного 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, инфрадианных 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 инфрадианного 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- $\beta$ , а через месяц после гипоксической нагрузки отмечается повышенная экспрессия генов *Hif-1 $\alpha$*  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 $\alpha$*  и *Nf- $\kappa$ b*, большей площадью некрозов в печени и количеством нейтрофилов в легких, а также повышенным содержанием в сыворотке крови IL-1 $\beta$  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- $\beta$ ;

- в исследованные сроки у высокоустойчивых к гипоксии животных отмечается активация преимущественно врожденного и клеточного иммунитета – у них выявлены увеличение содержания в периферической крови цитотоксических Т-лимфоцитов и НК 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 работы**

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 $\alpha$*  и *Nf- $\kappa$ b*, больше площадь некрозов в печени, содержание эндотоксина, IL-1 $\beta$  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 сроков 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- $\beta$  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 $\alpha$*  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), XXV 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.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Работа выполнена на половозрелых самцах крыс Спрейг-Доули (n=20) и Вистар (n=180) в возрасте 10-12 недель, массой тела, соответственно, 210-250 и 220-280 г.

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 экспериментов получено разрешение биоэтической комиссии ФГБНУ «НИИ морфологии человека» (протокол №16 от 11 ноября 2015 г.).

При поступлении экспериментальных животных в виварий их 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 № РОССRU.n081.B00113, ГОСТ P50258-92).

Животных выводили из экспериментов передозировкой (15 мг/кг) золетила («Virbac Sante Animale», Франция).

**Определение устойчивости к гипобарической гипоксии.** Устойчивость животных к гипоксии определяли в вентилируемой барокамере с манометром ТВ5 («Росма», Россия) и насосом 6MYT80A4 («Smem», 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), K. Jain et al. (2013). Крыс линии Спрейг-Доули помещали 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.

Устойчивость животных к гипоксии определяли по времени жизни на «высоте», соответствующему временному интервалу от момента «подъема» до признаков асфиксии – нарушения дыхания и принятия бокового положения (Лукьянова Л.Д. и Кирова Ю.И., 2011). К высокоустойчивым к гипоксии (ВУ) 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 (НУ) животным относили крыс Спрейг-Доули, время жизни которых составляло менее 10 мин, крыс Вистар – менее 80 сек. Среднеустойчивых к гипоксии (СУ) 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% (5 из 180), крыс Спрейг-Доули – 10% (2 из 20).

**Исследование взаимосвязи устойчивости к гипоксии и 4-суточного биоритма изменений концентрации кортикостерона.** Ежедневное определение времени жизни на «высоте» 11500 м самцов крыс Вистар (n=10) осуществляли в период с 17 по 28 апреля 2016 г. У отдельной группы интактных самцов крыс Вистар (n=6) ежедневно оценивали содержание кортикостерона в сыворотке крови. Проводили однократную оценку времени жизни крыс Вистар на «высоте» в период акрофазы (n=13) и батифазы (n=16) инфрадианного 4-суточного биоритма концентрации кортикостерона, акрофазу и батифазу определяли по методу, описанному М.Е. Диатропцовым и соавт. (2014).

Устойчивость к гипоксии у первой подгруппы самцов крыс Спрейг-Доули (n=9) определяли однократно в акрофазу 4-суточного биоритма содержания кортикостерона в сыворотке крови, через месяц проводили повторное тестирование в противоположную фазу биоритма – батифазу. У второй подгруппы (n=9) устойчивость к гипоксии сначала оценивали в батифазу, а через месяц – в акрофазу 4-суточного биоритма кортикостерона.

**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 ВУ и НУ к недостатку кислорода животных проводили на крысах Вистар (n=70). Через 5 и 90 мин после острой гипоксической нагрузки на «высоте» 11500 м над уровнем моря ВУ (n=14) и НУ (n=30) крыс выводили из эксперимента. Определяли уровни экспрессии *Hif-1 $\alpha$* , *Nf- $\kappa$ b* и *Vegf* в печени, содержание HIF-1 $\alpha$ , эритропоэтина, VEGF, трансформирующего фактора роста TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor) и 8-изопростана в сыворотке крови. Выбор сроков исследования обоснован тем, что уровень мРНК *Hif-1 $\alpha$*  повышается в течение 30 мин после гипоксической нагрузки и достигает пика через час, а содержание белка HIF-1 $\alpha$  остается повышенным в течение 8 ч (Stroka D.M. et al., 2001; Blouin C.C et al., 2004; BelAiba R.S. et al., 2007; Jain K. et al., 2013). Животных группы сравнения (n=8) гипоксическому воздействию не подвергали.

**Моделирование системной воспалительной реакции у крыс Вистар.** Исследование различий системной воспалительной и иммунных реакций в разные сроки после введения ЛПС в зависимости от исходной устойчивости животных к гипоксии

проводили на крысах Вистар (n=60) через месяц после определения чувствительности к недостатку кислорода в соответствии с рекомендациями Л.Д. Лукьяновой и соавт. (2009), Л.Д. Лукьяновой и Ю.И. Кировой (2011), Н.Н. Каркищенко (2017). ВУ (n=20) и НУ (n=18) к гипоксии животным вводили ЛПС *E. coli* O26:B6 («Sigma-Aldrich», США) в дозе 1,5 мг/кг, которая при внутрибрюшинном введении половозрелым крысам вызывает патологические изменения во внутренних органах (Писарев В.Б. и соавт., 2008; Косырева А.М., 2018). ВУ (n=5) и НУ (n=5) к гипоксии крысам контрольной группы внутрибрюшинно вводили физиологический раствор. Животных выводили из эксперимента 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).

**Материалы исследования.** Для гистологического исследования проводили забор легких, печени, тимуса и селезенки. Кровь забирали из шейных вен, получали сыворотку и хранили ее в течение 1 месяца при  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### **Методы исследования**

**Гистологические.** Печень и лимфоидные органы крыс – тимус и селезенку – фиксировали в жидкости Буэна, легкие – в жидкости Карнуа; после гистологической проводки по спиртам восходящей концентрации и хлороформу фрагменты органов заливали в гистомикс, изготавливали гистологические срезы. Полученные препараты окрашивали гематоксилином и эозином.

**Морфометрические.** На гистологических препаратах легких проводили подсчет количества нейтрофилов в межальвеолярных перегородках при ув. 400 в стандартном поле зрения (25000 мкм<sup>2</sup>). Объемную плотность функциональных зон тимуса (ув. 200) и селезенки (ув. 200, 400) оценивали при световой микроскопии методом точечного счета с помощью сетки Г.Г. Автандилова (1973). Площадь некрозов в печени измеряли в программе Image Scope M (ув. 200) в интерактивном режиме с использованием камеры Leica DFC290 («Leica Microsystems», Германия).

**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).

Для иммунофенотипического анализа основных субпопуляций лимфоцитов периферической крови крыс Вистар использовали антитела («eBioscience», США), конъюгированные с FITC, PE и PE-Cy7: оценивали абсолютное и относительное количество CD3+ Т-лимфоцитов, CD3+CD4+ Т-хелперов, CD3+CD8a+ цитотоксических Т-лимфоцитов, CD314+ NK клеток, CD45R+ В-лимфоцитов, CD4+CD25+Foxp3+ регуляторных Т-клеток. Субпопуляцию регуляторных Т-лимфоцитов в цельной крови крыс определяли с помощью набора Regulatory T Cell Staining Kit #3 («eBioscience», США).

Для определения фагоцитарной активности клеток периферической крови использовали набор IngoFlowEx kit («Exbio Diagnostics», Чехия). 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).

Для определения количества апоптотически гибнущих клеток в тимусе получали суспензию с помощью гомогенизатора Поттера, использовали набор Annexin V FITC kit («Beckman Coulter», Франция).

**Культуральные.** Для индукции синтеза и секреции цитокинов суспензию клеток селезенки в концентрации  $1 \times 10^6$ /мл культивировали 18 ч в 1 мл полной ростовой среды с добавлением 5 мкг/мл конканавалина А («ПанЭко», Россия) в 24-луночных культуральных планшетах в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при +37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> («Sanyo», Япония). Среда для культивирования клеток селезенки состояла из RPMI-1640 с 5% инактивированной телячьей эмбриональной сыворотки («Biosera», Мексика), 2 mM глутамина и 50 мкг/мл гентамицина («ПанЭко», Россия).

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

В сыворотке крови определяли содержание эритропоэтина, 8-изопростана, С-реактивного белка, IL-1 $\beta$ , HIF-1 $\alpha$ , VEGF с использованием соответствующих наборов («Cloud-Clone Corp.», Китай), кортикостерона и неоптерина («IBL International», Германия) и TGF- $\beta$  («eBioscience», США); с помощью хромогенного LAL-теста (Limulus Amebocyte Lysate-тест) оценивали уровень эндотоксина («Nycult 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 аспартатаминотрансферазы (АСТ) и аланинаминотрансферазы (АЛТ). Использовали наборы «Human GmbH» (Германия).

**Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени.** Выделяли РНК из фрагмента печени с помощью набора RNeasy Plus Mini Kit («QIAGEN», Германия). Проводили обратную транскрипцию с помощью набора MMLV RT Kit («Евроген», Россия). Методом ПЦР на Real-Time амплификаторе DTprime («ДНК-Технология», Россия) с использованием готовой смеси qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Россия) определяли уровни экспрессии мРНК *Hif-1 $\alpha$* , *Nf- $\kappa$ b* и *Vegf* в печени относительно уровня экспрессии мРНК  $\beta_2$ -микроглобулина *B2m* (праймеры «Синтол», Россия).

**Статистические методы.** Поскольку по результатам теста Колмогорова-Смирнова («Statistica 8.0») полученные данные были распределены ненормально, использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни, критерий Крускала-Уоллиса (Гржибовский А.М. и соавт., 2016), множественное сравнение средних рангов для всех групп («Statistica 8.0») или критерий Данна для установления различий между группами (надстройка «AtteStat» для Microsoft Office Excel 2007) (Гланц С., 1998; Мастицкий С.Э., 2009). Для выявления инфрадианного биоритма применяли метод наложенных эпох (Дещеревский А.В. и Лукк А.А., 2002). 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%).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Взаимосвязь устойчивости к гипоксии крыс Вистар и Спрейг-Доули и 4-суточного биоритма изменений концентрации кортикостерона в сыворотке крови.** 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. 1). 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 ( $p=0,000045$ ).

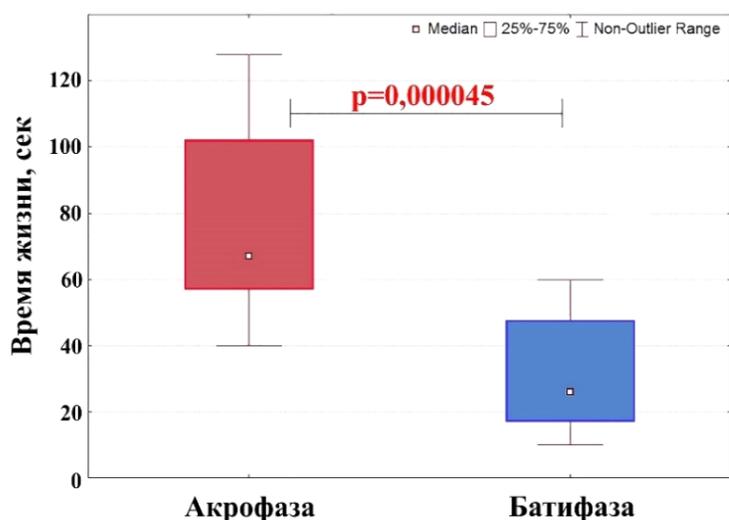


Рис. 1. Время жизни крыс Вистар на «высоте» 11500 м при однократном определении устойчивости к гипоксии в акрофазу ( $n=13$ ) и батифазу ( $n=16$ ) 4-суточного биоритма содержания кортикостерона в сыворотке крови, Ме (25%;75%).  $p$  – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

В группе из 10 крыс Вистар, подвергавшихся ежедневному гипоксическому воздействию, 8 особей имели сходную устойчивость к гипоксии, что не позволило разделить их на группы ВУ и НУ животных. По данным О.В. Макаровой (1997) при

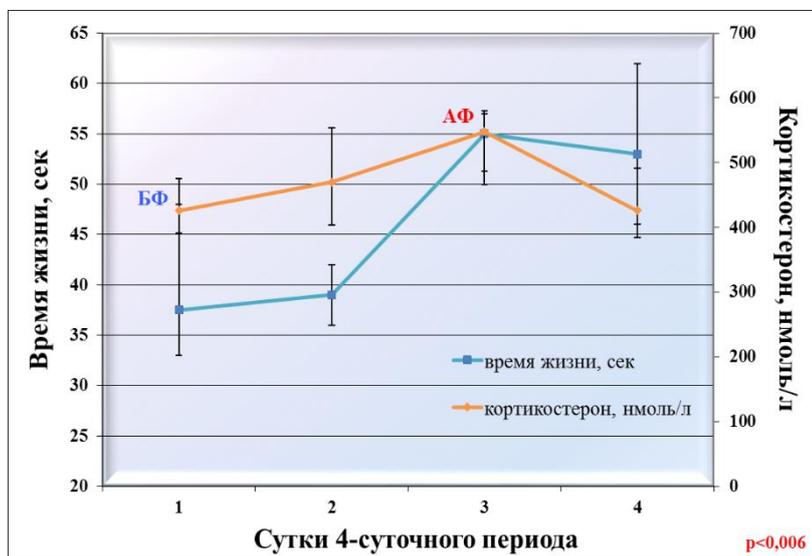


Рис. 2. Показатели времени жизни крыс Вистар на «высоте» 11500 м при многократном определении устойчивости к гипоксии, распределенные по дням 4-суточного периода. АФ – акрофаза, БФ – батифаза инфрадианного биоритма концентрации кортикостерона, Ме (25%;75%).  $p$  – статистическая значимость различий, 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 (рис. 2). Показатели времени жизни на «высоте» в акрофазе, когда содержание кортикостерона было максимальным и составило 548 (487-580) нмоль/л, были равны 55 (50-57) сек, а в батифазе, когда концентрация кортикостерона была минимальной – 426 (391-475) нмоль/л, составили 37,5 (33-48) сек. Показатели времени жизни животных в барокамере в акрофазе и батифазе 4-суточного биоритма концентрации кортикостерона статистически значимо различались между собой (рис. 2).

воздействии газовой гипоксической смеси, содержащей 2,5% кислорода, время жизни крыс Вистар в 1,7 раза больше, чем крыс Спрейг-Доули, что указывает на более низкую устойчивость последних к кислородной недостаточности. Поэтому дальнейшие исследования взаимосвязи устойчивости к гипоксии и инфрадианного биоритма концентрации кортикостерона были проведены на более чувствительных к недостатку кислорода крысах линии Спрейг-Доули.

При однократном определении устойчивости к гипоксии крыс Спрейг-Доули на «высоте» 9500 м в период акрофазы 4-суточного биоритма

концентрации кортикостерона из 18 животных к ВУ было отнесено 12 особей, к СУ – 4 и к НУ – 2 крысы. При тестировании этих же крыс в период батифазы 4-суточного биоритма содержания кортикостерона ВУ оказались 6 особей, СУ – 2, а НУ – 10 крыс. При

определении устойчивости к гипоксии в период акрофазы НУ оказались 11% животных, а батифазы – 55%, что по  $z$ -критерию статистически значимо различалось ( $p=0,01$ ).

По нашим данным, в период батифазы 4-суточного биоритма СУ особи могут становиться НУ, а часть ВУ – СУ и даже НУ. В работах В.А. Березовского (1978) и Н.А. Агаджаняна и соавт. (1999) показано, что при повторном определении устойчивости к гипоксии в отдаленные сроки процентное соотношение ВУ и НУ животных варьирует за счет перехода части из них в группу СУ (Березовский В.А., 1978; Агаджанян Н.А. и соавт., 1999). Авторы связывают это с различной способностью к адаптации даже у животных одной группы устойчивости и с устранением при двукратном испытании из групп ВУ и НУ к гипоксии животных случайных СУ особей, однократно проявивших признаки ВУ или НУ (Березовский В.А., 1978; Агаджанян Н.А. и соавт., 1999). Возможно, эти результаты объясняются не только способностью крыс адаптироваться к гипоксии после первого гипоксического воздействия, но и определяются инфрадианной ритмичностью устойчивости к недостатку кислорода: календарной датой, когда проводилось тестирование – акрофазой или батифазой 4-суточного биоритма кортикостерона.

Таким образом, нами установлен 4-суточный биоритм устойчивости крыс Вистар и Спрейг-Доули к гипоксии, синфазный с биоритмом содержания кортикостерона в сыворотке крови. В период акрофазы инфрадианного биоритма кортикостерона время жизни животных на «высоте» больше, чем в период его батифазы, что было показано как на крысах Вистар, так и Спрейг-Доули. Поскольку по результатам работы оказалось, что в акрофазу и батифазу 4-суточного биоритма возможно ложное включение СУ животных в группу ВУ и НУ, в последующих экспериментах определение устойчивости к гипоксии проводили в промежуточные дни между акрофазой и батифазой инфрадианного биоритма, которые определяли по календарному методу, описанному М.Е. Диатроптовым и соавт. (2014).

**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 у ВУ ( $n=14$ ) и НУ ( $n=30$ ) к недостатку кислорода крыс Вистар через 5 и 90 мин после определения устойчивости к гипоксии на критической «высоте» 11500 м над уровнем моря. Нами показано, что по сравнению с ВУ, НУ к гипоксии животные через 5 мин после гипоксической нагрузки характеризовались более низкими уровнями экспрессии *Hif-1 $\alpha$*  и *Nf- $\kappa$ b* в печени, содержанием VEGF, эритропоэтина и TGF- $\beta$  в сыворотке крови, а через 90 мин у них наблюдалось увеличение концентрации 8-изопростана и TGF- $\beta$  в сыворотке крови (табл. 1).

По данным литературы, ВУ и НУ к гипоксии животные после гипоксической нагрузки отличаются по содержанию белка HIF-1 $\alpha$ , 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). Выявленное нами повышение уровня экспрессии мРНК и содержания белка HIF-1 $\alpha$  после гипоксического воздействия у ВУ к гипоксии животных, 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; Suzuki N. et al., 2017).

Таблица 1

Сравнительная характеристика динамики молекулярно-биологических и биохимических показателей у крыс Вистар без воздействия, у ВУ и НУ к гипоксии через 5 и 90 мин после гипоксического воздействия, Ме (25%;75%). р – статистическая значимость различий, критерии Манна-Уитни, Крускала-Уоллиса и Данна

Параметры	Группа наблюдения	Без гипоксического воздействия (1)	После гипоксического воздействия				Достоверность различий, р<0,05
			Через 5 мин		Через 90 мин		
			ВУ (2)	НУ (3)	ВУ (4)	НУ (5)	
Экспрессия гена <i>Hif-1α</i> в печени, усл. ед., ·10 <sup>-3</sup>		0,003 (0,001-0,004)	1,6 (0,4-7,0)	0,2 (0,1-0,4)	0,3 (0,1-0,5)	0,8 (0,2-1,0)	р(2-3)=0,004 р(1-2)=0,00005 р(1-3)=0,017 р(1-4)=0,002 р(1-5)=0,000009
Экспрессия гена <i>Nf-κb</i> в печени, усл. ед., ·10 <sup>-3</sup>		0,006 (0,002-0,113)	1,9 (0,5-7,0)	0,3 (0,07-0,6)	0,07 (0,03-0,12)	0,03 (0,02-0,06)	р(2-3)=0,034 р(4-5)=0,037 р(1-2)=0,00003 р(1-3)=0,0002 р(2-4)=0,003 р(3-5)=0,0004
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)	0,075 (0,069-0,075)	0,024 (0,015-0,096)	р(1-2)=0,03 р(2-4)=0,042 р(3-5)=0,02
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)	6,2 (0,7-14,5)	2,5 (0,0-10,5)	р(2-3)=0,04 р(1-2)=0,012 р(1-3)=0,042 р(3-5)=0,013
Содержание эритропоэтина в сыворотке крови, пг/мл		7,9 (7,1-14,8)	18,3 (12,6-25,2)	6,0 (4,9-13,1)	12,0 (11,2-21,6)	14,5 (13,1-19,7)	р(2-3)=0,03 р(3-5)=0,044
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)	533,9 (445,4-653,2)	556,0 (462,7-576,2)	р(1-5)=0,044 р(3-5)=0,017
Содержание TGF-β в сыворотке крови, пг/мл		8640 (7675-9768)	12627 (10380-12831)	9000 (8100-11196)	7740 (6840-7920)	11707,5 (9768-13035)	р(2-3)=0,037 р(4-5)=0,003 р(1-5)=0,021 р(2-4)=0,013 р(3-5)=0,017

Нами обнаружено, что через 5 мин после гипоксического воздействия содержание в сыворотке крови фактора ангиогенеза VEGF статистически значимо возрастало как у ВУ, так и у НУ животных, но у ВУ более значительно, а содержание ключевого фактора эритропоэза – эритропоэтина – было выше у ВУ к гипоксии крыс (табл. 1) по сравнению с НУ, что согласуется с данными литературы (Jain K. et al., 2013). Эритропоэтин оказывает кардиопротекторный эффект при ишемическом повреждении, в частности, при гипоксическом стрессе (Burger D. et al., 2009). По-видимому, ВУ крысы реализуют более быструю и эффективную стратегию ответа на гипоксическое воздействие, так как эритропоэтин и VEGF повышают оксигенацию тканей (Fandrey J., 2004).

Известно, что гипоксия сопровождается окислительным стрессом, характеризующимся повышением уровней активных форм кислорода (АФК) и повреждением клеточных мембран, что способствует активации NF-κB, синтезу провоспалительных цитокинов и хемокинов, развитию таких заболеваний, как острая горная болезнь (Aguilera-Aguirre L. et al., 2014; Lee E.J. et al., 2017; McGarry T. et al., 2018). По нашим данным, только у НУ крыс через 90 мин после воздействия гипоксии в сыворотке крови повышалось содержание 8-изопростана (табл. 1), который является маркером окислительного стресса (Roberts L.J. и Morrow J.D., 2002; van't Erve T.J et al., 2017), что 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 НУ к гипоксии крыс Спрейг-Доули после гипоксического воздействия более значительно, чем у ВУ. Более мощная антиоксидантная защита у ВУ к гипоксии животных (Askew E.W., 2002; Jain K. et al., 2013) предотвращает развитие окислительного стресса и воспалительных заболеваний.

Поскольку известна взаимосвязь молекулярных путей, активирующихся при гипоксии (HIF-1α) и воспалении (NF-κB) (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-κb*, регулирующего развитие воспалительных реакций. Обнаружено, что уровень экспрессии мРНК *Nf-κb* в печени повышался через 5 мин после гипоксической нагрузки как у ВУ, так и у НУ животных, но у ВУ по сравнению с НУ он был выше в 6,3 раза. Через 90 мин после гипоксического воздействия уровень экспрессии гена *Nf-κb* возвращался к исходному, однако у ВУ животных показатель был выше, чем у НУ (табл. 1). Вероятно, выраженное и длительное повышение экспрессии гена *Nf-κb* у ВУ крыс связано с более значительным увеличением экспрессии и содержания HIF-1α после гипоксического воздействия, поскольку известна их взаимосвязь (Hirota K., 2015; Krzywinska E. и Stockmann C., 2018).

По данным литературы, один из ключевых противовоспалительных факторов – TGF-β – может активироваться в ответ на окислительный стресс, индуцируемый гипоксией, а также HIF-1α может прямо инициировать его транскрипцию (Saed G. et al. 2002; Jiang Y. et al. 2007; Cui Y. et al., 2011; Liu R.-M. и Desai L.P., 2015). Через 90 мин после гипоксического воздействия у НУ животных содержание TGF-β в сыворотке крови увеличивалось (табл. 1), что сопровождалось повышенным содержанием 8-изопростана и, вероятно, обусловлено выраженным окислительным стрессом.

Таким образом, показано, что у ВУ к гипоксии крыс через 5 мин после гипоксической нагрузки уровни экспрессии *Hif-1α* и *Nf-κb* в печени, содержание эритропоэтина, VEGF и TGF-β в сыворотке крови выше, чем у НУ животных. Высокий уровень экспрессии *Hif-1α*, по-видимому, обуславливает активацию транскрипции *Nf-κb* и увеличение концентрации эритропоэтина, VEGF и TGF-β в сыворотке крови у ВУ к гипоксии крыс. По сравнению с

ВУ, НУ к дефициту кислорода животные через 5 мин после гипоксической нагрузки характеризуются более низкими уровнями экспрессии *Hif-1a* и *Nf-κb* в печени, а через 90 мин у них наблюдается увеличение концентрации 8-изопростана и TGF-β в сыворотке крови.

**Сравнительная характеристика высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар через месяц после определения устойчивости к недостатку кислорода.** По результатам наших исследований, через один месяц после определения устойчивости к гипоксии патологических изменений в легких и печени крыс Вистар выявлено не было. Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких на площади 25000 мкм<sup>2</sup> как у ВУ, так и у НУ к гипоксии крыс через месяц после определения устойчивости к недостатку кислорода соответствовало нормальным значениям для самцов крыс Вистар (Косырева А.М., 2018) и не отличалось у животных с разной устойчивостью.

В соответствии с полученными данными об отсутствии воспалительных изменений в легких и печени и рекомендациями 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 гипоксии.

**Молекулярно-биологическая, биохимическая и морфологическая характеристика системной воспалительной реакции у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар.** 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 Orpal 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 Н.С. et al., 2012), что до сих пор не учитывается в клинических и экспериментальных исследованиях. Поэтому задачей этого раздела работы было изучение морфологических и молекулярно-биологических особенностей системной воспалительной и иммунных реакций, вызванных введением ЛПС, у ВУ и НУ к гипоксии самцов крыс Вистар.

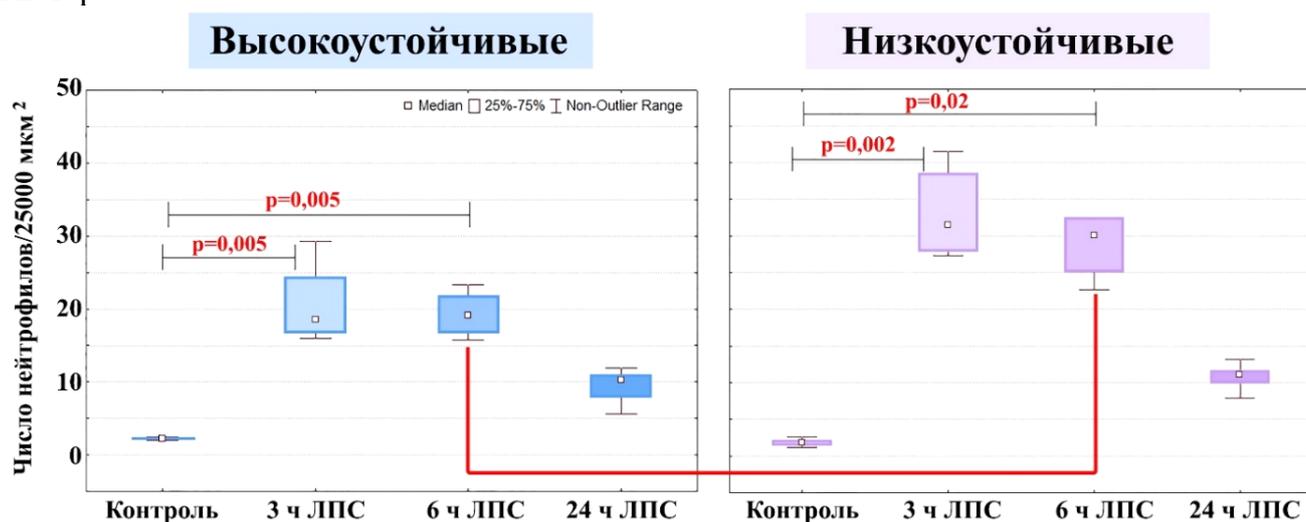


Рис. 3. Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у ВУ и НУ к гипоксии крыс контрольных групп и в разные сроки (3, 6 и 24 ч) после введения ЛПС, Me (25%;75%). p – статистическая значимость различий, критерии Крускала-Уоллиса и Данна

В легких у ВУ и НУ к гипоксии крыс через 3 и 6 ч после введения ЛПС выявлялась значительная инфильтрация межальвеолярных перегородок нейтрофилами (рис. 3). По

сравнению с ВУ число нейтрофилов было статистически значимо выше ( $p=0,04$ ) у НУ к гипоксии животных через 6 ч после введения ЛПС.

В печени у ВУ и НУ к гипоксии крыс выявлялись альтеративные изменения гепатоцитов – дистрофия, очаговые и субтотальные некрозы (рис. 4). По сравнению с ВУ у НУ к гипоксии животных площадь некрозов в печени (рис. 4) через 24 ч после введения ЛПС была в 18 раз выше ( $p=0,028$ ). По данным биохимического анализа, через сутки после введения ЛПС в сыворотке крови как у ВУ, так и у НУ к гипоксии крыс уровни активности ферментов печени – АСТ и АЛТ – повышались по сравнению с контрольными группами. Между ВУ и НУ к недостатку кислорода животными контрольных и опытных групп достоверных различий выявлено не было, однако у НУ крыс после введения ЛПС уровни активности АСТ и АЛТ были, соответственно, в 5,6 и 5,2 раза выше по сравнению с ВУ, что свидетельствует о выраженных повреждениях гепатоцитов у этих животных (Lee T.H. et al., 2012; Nessler N. et al., 2012).

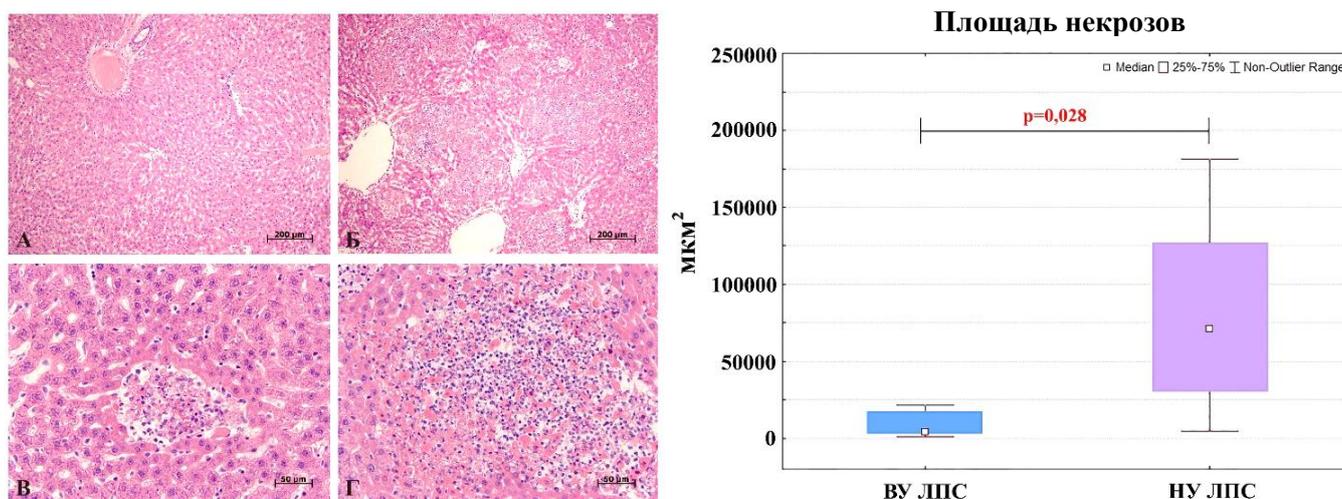


Рис. 4. Морфологические изменения в печени у ВУ (А, В) и НУ (Б, Г) к гипоксии крыс через 24 ч после введения ЛПС (окраска гематоксилином и эозином) и площадь некрозов в стандартном поле зрения ( $50000 \text{ мкм}^2$ ) в печени у ВУ ( $n=5$ ) и НУ ( $n=5$ ) к гипоксии крыс Вистар через 24 ч после введения ЛПС, Ме (25;75%).  $p$  – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Известно, что повреждения клеток печени развиваются в ответ на прямое действие ЛПС, микроциркуляторные нарушения, повышение содержания цитокинов, белков острой фазы, АФК и NO (Муздубаева Б.Т., 2016; Cohen J., 2002; Cinel I. и Opal S.M., 2009). По нашим данным, у НУ к гипоксии крыс через 3 ч после введения ЛПС происходило многократное увеличение (в 64 раза) уровня эндотоксина и повышение (в 13 раз) содержания провоспалительного цитокина  $\text{IL-1}\beta$  в сыворотке крови. У ВУ к гипоксии животных показатели не изменялись (рис. 5). Согласно данным литературы, высокие уровни эндотоксина и провоспалительных цитокинов в сыворотке крови свидетельствуют о неблагоприятном прогнозе и развитии септического шока, а терапевтическая элиминация эндотоксина уменьшает риск развития полиорганной недостаточности и увеличивает выживаемость больных (Yaguchi A. et al., 2012; Adamik V. et al., 2015).

В соответствии с литературными сведениями провоспалительные цитокины –  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-6}$  – через 4-6 ч после воздействия ЛПС 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; Slaats J. et al., 2016). В нашей работе повышение содержания С-реактивного белка в сыворотке крови через 24 ч после введения ЛПС происходило только у НУ к гипоксии крыс (рис. 5). С-реактивный белок является одним из клинических маркеров тяжести инфекционно-воспалительных заболеваний (Vigushin D.M. et al., 1993). Высокая концентрация С-реактивного белка при сепсисе

свидетельствует о неблагоприятном прогнозе заболевания (Beltempo M. et al., 2018). По-видимому, повышение содержания С-реактивного белка у НУ к гипоксии животных связано с активацией провоспалительных реакций, о чем свидетельствует увеличение концентрации IL-1 $\beta$  через 3 ч после введения ЛПС у этих крыс. Таким образом, НУ к гипоксии крысы характеризуются более выраженной воспалительной реакцией в ответ на введение ЛПС.

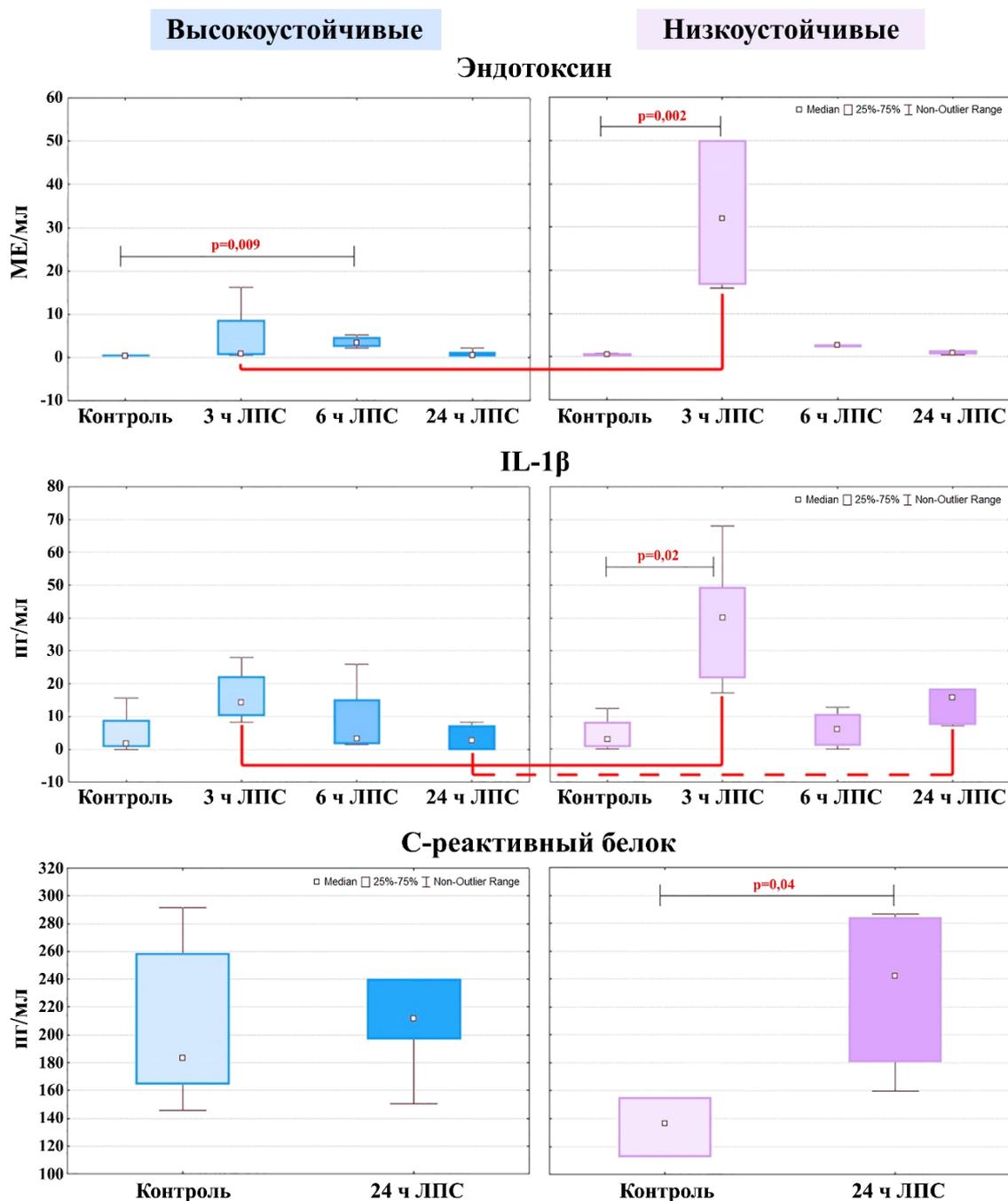


Рис. 5. Содержание эндотоксина, провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$  и С-реактивного белка в сыворотке крови у ВУ и НУ к гипоксии крыс контрольных групп и в разные сроки (3, 6 и 24 ч) после введения ЛПС, Ме (25%;75%). р – статистическая значимость различий, критерии Манна-Уитни, Крускала-Уоллиса и Данна

По данным литературы, повышение содержания провоспалительных цитокинов и белков острой фазы воспаления после введения ЛПС обусловлены активацией транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B (Esteban E. et al., 2013; Liu T. et al., 2017). В нашей работе в ранние сроки после введения ЛПС увеличение экспрессии гена *Nf- $\kappa$ b* в печени наблюдалось только у НУ к гипоксии крыс (рис. 6). У ВУ 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 у них был статистически значимо ниже, чем у НУ крыс ( $p=0,02$  и  $0,004$ , соответственно). Увеличение экспрессии гена *Nf-κb* в печени у НУ к гипоксии животных свидетельствует о развитии более выраженного ЛПС-индуцированного воспаления и сопровождается повышением содержания С-реактивного белка и IL-1β в сыворотке крови.

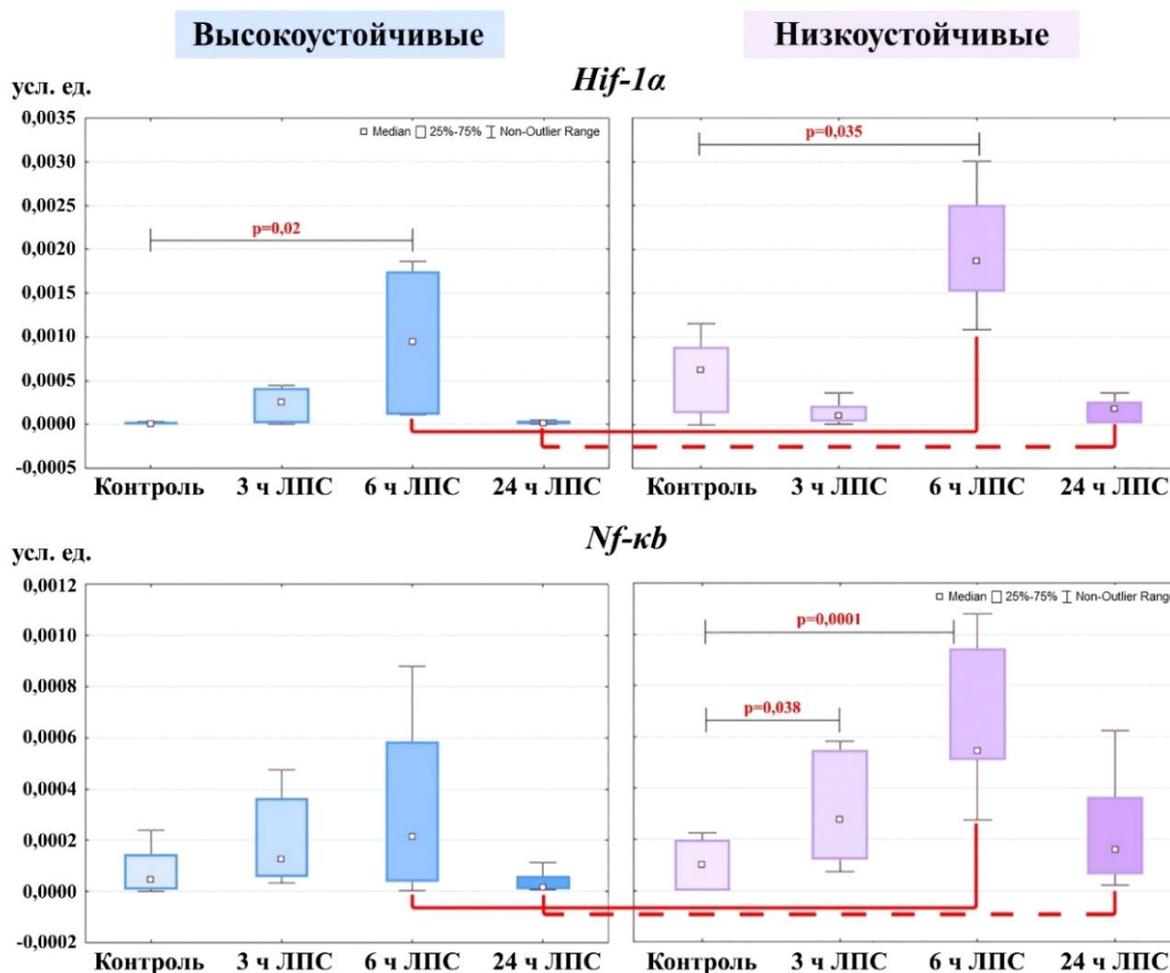


Рис. 6. Уровень экспрессии *Hif-1α* и *Nf-κb* в печени у ВУ и НУ к гипоксии крыс контрольных групп и в разные сроки (3, 6 и 24 ч) после введения ЛПС, Ме (25%;75%).  $p$  – статистическая значимость различий, критерии Крускала-Уоллиса и Данна

Известно, что транскрипционный фактор, активирующийся при гипоксии – HIF-1α – может стимулировать NF-κB (Cummins E.P. et al., 2006; Rius J. et al., 2008; Krzywinska E. и Stockmann C., 2018; Sadiku P. и Walmsley S.R., 2019). Кроме того, при развитии системной воспалительной реакции происходят нарушения микроциркуляции и увеличение уровней АФК в крови, что может стабилизировать HIF-1α (Cuzzocrea S. et al. 1998; Javesghani D. et al. 2003; Jung Y.J. et al. 2003; Gunnett C.A. et al. 2005). Нами показано повышение уровня экспрессии гена *Hif-1α* в печени через 6 ч после введения ЛПС как у ВУ, так и у НУ к гипоксии крыс, однако у НУ он был в 2 раза выше, чем у ВУ (рис. 6). Вероятно, выраженное увеличение уровня экспрессии гена *Hif-1α* у НУ животных значительно стимулирует экспрессию гена *Nf-κb*, что обуславливает развитие выраженной воспалительной реакции. NF-κB регулирует воспалительные процессы и, в частности, усиливает экспрессию молекул адгезии и хемокинов эндотелиальными клетками в ответ на введение ЛПС (Brown K.A. et al., 2006; Remick D.G., 2007; Hirota K., 2015; Lumb A.B., 2017), что может обуславливать повышение числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких. По данным литературы, HIF-1 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). В нашем исследовании по сравнению с ВУ к гипоксии крысами у НУ животных наблюдалось более высокое количество нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких через 6 ч после введения ЛПС, сопряженное с более выраженным повышением экспрессии генов *Hif-1 $\alpha$*  и *Nf- $\kappa$ b*.

Таким образом, в ответ на введение ЛПС у НУ к гипоксии крыс наблюдается развитие более выраженной системной воспалительной реакции: высокое число нейтрофилов в легких и большие повреждения гепатоцитов печени по сравнению с ВУ, которые сопровождаются многократным повышением уровня эндотоксина, увеличением концентрации провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$  и С-реактивного белка в сыворотке крови, экспрессии генов *Hif-1 $\alpha$*  и *Nf- $\kappa$ b* в печени. У ВУ к гипоксии животных реакция менее выражена – наблюдается незначительное повышение уровня эндотоксина, при этом содержание провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$  и С-реактивного белка в сыворотке крови, экспрессия гена *Nf- $\kappa$ b* в печени статистически значимо не изменяются.

Противовоспалительные цитокины, такие как IL-10 и TGF- $\beta$ , регулируют развитие воспалительной реакции: IL-10 ее ограничивает, а TGF- $\beta$  играет важную роль в супрессии функциональной активности клеток врожденного иммунитета (Sanjabi S. et al., 2009; Clambey E.T. et al., 2012; van der Poll T. et al., 2017). Избыточная секреция противовоспалительных цитокинов может способствовать развитию иммунодефицитного состояния, повышению чувствительности к вторичным инфекциям и хронизации воспаления, а также увеличению риска развития полиорганной недостаточности (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). В нашем исследовании у ВУ к гипоксии крыс через 6 ч после введения ЛПС выявлено снижение уровня продукции клетками селезенки IL-10, а через 24 ч – содержания TGF- $\beta$  в сыворотке крови, что, по-видимому, предотвращает развитие иммуносупрессии и повышает выживаемость животных. У НУ к гипоксии крыс уровни противовоспалительных цитокинов не изменялись, а содержание провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$  и С-реактивного белка увеличивалось, что свидетельствует о развитии интенсивной воспалительной реакции в ответ на введение ЛПС.

Концентрация кортикостерона в сыворотке крови через 6 ч после введения ЛПС статистически значимо повышалась только у НУ к гипоксии крыс ( $p=0,03$ ), а через 24 ч она была выше у этих животных по сравнению с ВУ ( $p=0,04$ ). Глюкокортикоиды оказывают выраженный противовоспалительный эффект, взаимодействуя с коактиваторами, необходимыми для запуска транскрипции NF- $\kappa$ B и ответных генов, и активируя синтез противовоспалительных цитокинов. Кроме того, они регулируют развитие иммунных реакций, влияя на миграцию клеток в очаг воспаления, и способствуют поляризации иммунного ответа преимущественно по гуморальному типу (Chrousos G.P., 2000; Barnes P.J., 2010). Обнаруженное нами увеличение содержания кортикостерона после введения ЛПС только у НУ к гипоксии животных косвенно свидетельствует о смещении баланса иммунных реакций у этих крыс в сторону гуморальных. По данным литературы, IL-1 $\beta$  стимулирует выброс кортикостерона из надпочечников крыс (Silverman M.N. et al., 2005). По-видимому, значительное повышение концентрации этого цитокина в сыворотке крови у НУ к гипоксии животных способствует активации синтеза кортикостерона надпочечниками и обуславливает увеличение его содержания. Вероятно, у НУ к гипоксии крыс более высокая концентрация кортикостерона по сравнению с ВУ связана с активацией компенсаторных реакций в ответ на более выраженный ЛПС-индуцированный системный воспалительный ответ.

**Морфофункциональные различия иммунной системы у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии самцов крыс Вистар в разные сроки после введения ЛПС.** На качественном уровне через 3 и 6 ч после введения ЛПС в тимусе как у ВУ, так и у НУ к гипоксии крыс наблюдалась умеренная акцидентальная инволюция, характеризующаяся очаговым сужением коркового и расширением мозгового вещества, выявлялась картина «звездного неба» с гибелью тимоцитов. При морфометрическом исследовании тимуса показано, что показатели объемной доли коркового вещества, а также отношения коркового к мозговому веществу у НУ к гипоксии животных через 3 ч после введения ЛПС были статистически значимо ниже, чем у ВУ ( $p=0,04$  и  $0,02$ , соответственно). Сужение коркового вещества может свидетельствовать о процессах миграции или о более активной гибели клеток тимуса у НУ к гипоксии крыс в ответ на недостаток кислорода и введение ЛПС, высокое содержание кортикостерона, эндотоксина и провоспалительных цитокинов в сыворотке крови, так как 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).

По нашим данным, в селезенке только у НУ к гипоксии животных через 3 и 6 ч после введения ЛПС наблюдалось расширение светлых центров лимфоидных узелков (рис. 7), что свидетельствует о пролиферации и дифференцировке В-лимфоцитов и смещении баланса иммунных реакций в сторону гуморальных.

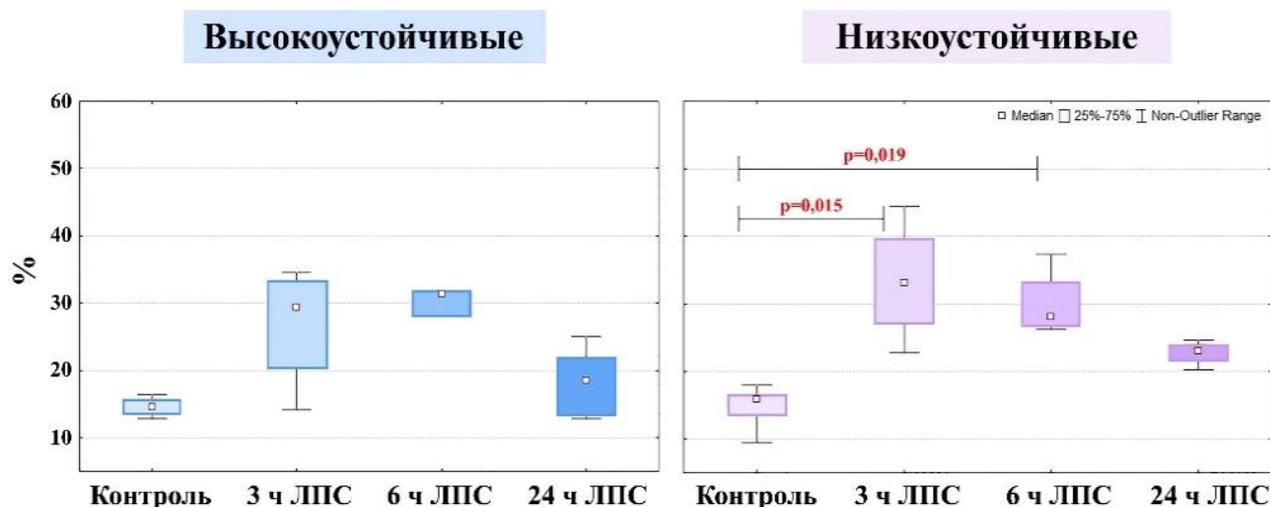


Рис. 7. Показатели объемной доли светлых центров лимфоидных узелков селезенки у ВУ и НУ к гипоксии крыс контрольных групп и в разные сроки (3, 6 и 24 ч) после введения ЛПС, Me (25%;75%).  $p$  – статистическая значимость различий, критерии Крускала-Уоллиса и Данна

Нами выявлено уменьшение объемной доли маргинальных зон лимфоидных узелков селезенки по сравнению с контрольной группой [59,6 (58,6-60,6)%] через 3 ч после введения ЛПС [41,6 (40,7-43,5)%,  $p=0,001$ ] только у НУ к гипоксии крыс. В селезенке у ВУ к гипоксии животных по сравнению с соответствующими показателями через 3 ч после введения ЛПС [69,7 (57,2-75,1)%] наблюдалось уменьшение объемной доли ПАЛМ-зоны через 24 ч [38,9 (37,6-46,2)%,  $p=0,041$ ].

По нашим данным, у НУ к гипоксии крыс после введения ЛПС выявлено повышение относительного числа В-лимфоцитов (рис. 8), но снижение абсолютного количества НК клеток в периферической крови. Через 24 ч после введения ЛПС у НУ к гипоксии животных абсолютное количество НК клеток было достоверно ниже, а относительное число В-лимфоцитов – выше, чем у ВУ (рис. 8).

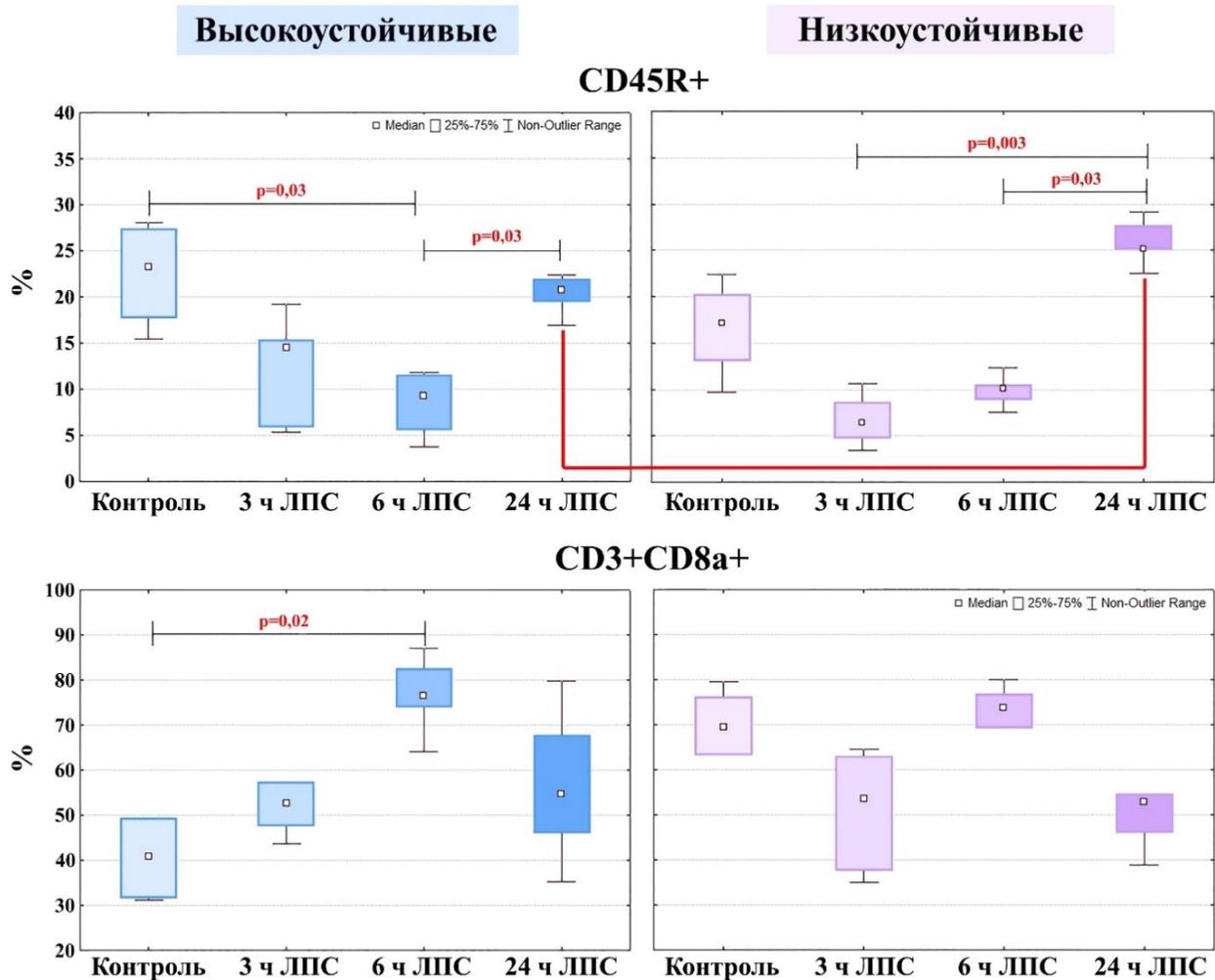


Рис. 8. Относительное количество В-лимфоцитов (CD45R+) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3+CD8a+) в периферической крови у ВУ и НУ к гипоксии крыс контрольных групп и в разные сроки (3, 6 и 24 ч) после введения ЛПС, Ме (25%;75%). р – статистическая значимость различий, критерии Крускала-Уоллиса и Данна

Кроме того, содержание неспецифического маркера активации клеточного иммунитета – неоптерина, у НУ к гипоксии крыс снижалось по сравнению с контрольной группой [2,15 (1,94-2,60) нмоль/л] через 24 ч после введения ЛПС [1,76 (1,65-1,87) нмоль/л,  $p=0,04$ ], а у ВУ животных – не изменялось (соответственно, 1,91 (1,70-1,96) и 1,85 (1,64-2,03) нмоль/л,  $p=0,66$ ). Это свидетельствует о преимущественном смещении баланса иммунных реакций у НУ к недостатку кислорода крыс в сторону гуморальных.

В отличие от НУ у ВУ к гипоксии животных при системной воспалительной реакции, индуцированной ЛПС, в исследованные сроки наблюдалась активация врожденного и клеточного иммунитета: у них увеличивалось содержание цитотоксических Т-лимфоцитов (рис. 8) и НК клеток в периферической крови, но снижалось относительное количество В-лимфоцитов (рис. 8).

Таким образом, ВУ и НУ к гипоксии животные в ответ на введение ЛПС характеризуются разнонаправленной реакцией иммунной системы. По сравнению с ВУ у НУ крыс отмечается смещение баланса иммунных реакций в сторону гуморальных: у них более выражено сужение коркового вещества тимуса, наблюдается активация В-зоны селезенки, увеличение числа В-лимфоцитов в крови. У ВУ к гипоксии животных, напротив, в селезенке выявляется сужение Т-зависимой ПАЛМ-зоны, увеличивается число цитотоксических Т-лимфоцитов и НК клеток в крови, что свидетельствует о преимущественной активации врожденного и клеточного иммунитета.

## 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-1α* и *Nf-κb*. 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-1α* 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.

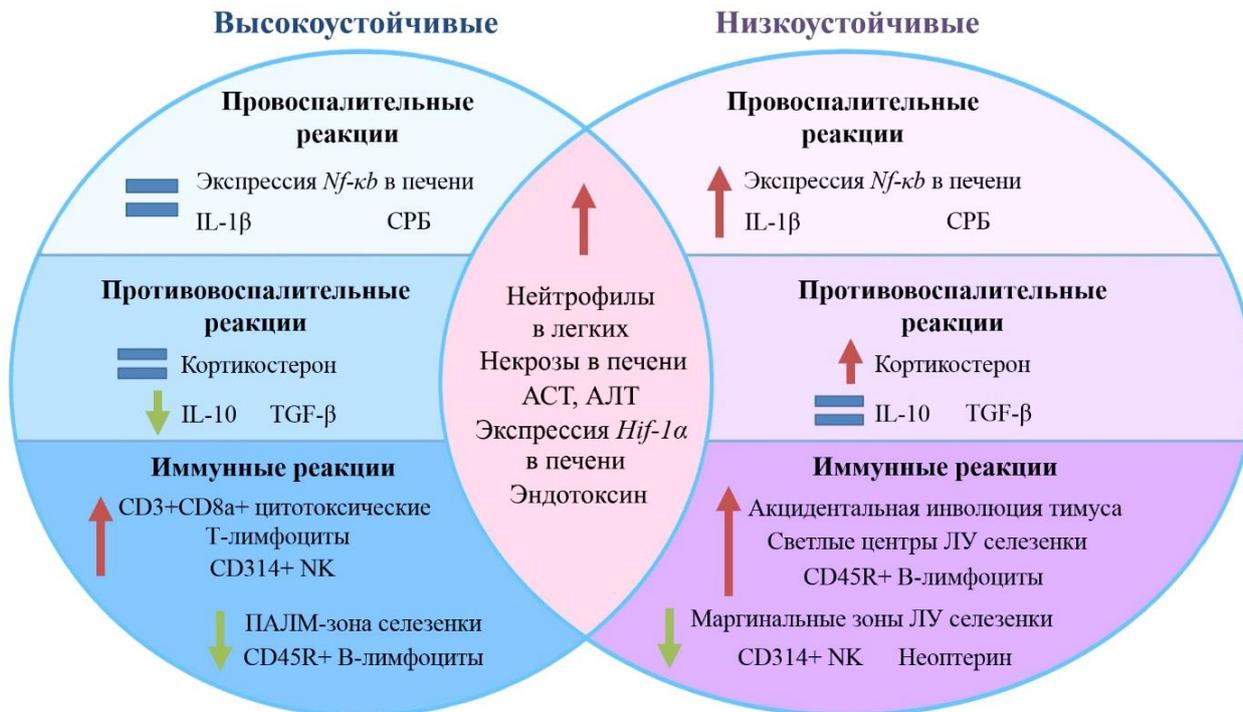


Рис. 9. Сравнительная характеристика провоспалительных, противовоспалительных и иммунных реакций у животных с разной устойчивостью к гипоксии в ответ на введение ЛПС

В ответ на введение ЛПС высокоустойчивые и низкоустойчивые к недостатку кислорода крысы характеризуются разнонаправленными провоспалительными, противовоспалительными и иммунными реакциями (рис. 9). 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 $\alpha$*  и *Nf- $\kappa$ b* в печени. Содержание провоспалительного IL-1 $\beta$  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- $\beta$  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 $\alpha$* , ядерного фактора *Nf- $\kappa$ 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- $\beta$ , 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 $\alpha$*  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 $\alpha$*  и провоспалительного гена *Nf- $\kappa$ b* в печени, содержание IL-1 $\beta$ , 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- $\beta$ .
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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи 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

1. **Джалилова Д.Ш.**, Косырева А.М., Диатроптов М.Е., Макарова О.В. Зависимость устойчивости к гипоксии от фазы 4-суточного биоритма кортикостерона // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2017. – №5. – С. 647-651.
2. **Джалилова Д.Ш.**, Диатроптов М.Е., Цветков И.С., Макарова О.В., Кузнецов С.Л. Экспрессия генов *Hif-1α*, *Nf-κb* и *Vegf* в печени и содержание HIF-1α, эритропоэтина, VEGF, TGF-β, 8-изопростаина и кортикостерона в сыворотке крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2018. – №6. – С. 742-747.
3. **Джалилова Д.Ш.**, Косырева А.М., Диатроптов М.Е., Макарова М.А., Макарова О.В. Морфология печени и легких и фагоцитарная активность клеток периферической крови при системной воспалительной реакции у самцов крыс с разной устойчивостью к гипоксии // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2019. – №1. – С. 47-55. [doi: 10.31088/2226-5988-2019-29-1-47-55](https://doi.org/10.31088/2226-5988-2019-29-1-47-55).
4. **Dzhalilova D.Sh.**, Kosyreva A.M., Diatroptov M.E., Ponomarenko E.A., Tsvetkov I.S., Zolotova N.A., Mkhitarov V.A., Khochanskiy D.N., Makarova O.V. Dependence of the severity of the systemic inflammatory response on resistance to hypoxia in male Wistar rats // Journal of Inflammation Research. – 2019. – V. 12. – P. 73-86. [doi: 10.2147/JIR.S194581](https://doi.org/10.2147/JIR.S194581).
5. **Dzhalilova D.Sh.**, Kosyreva A.M., Diatroptov M.E., Zolotova N.A., Tsvetkov I.S., Mkhitarov V.A., Makarova O.V., Khochanskiy D.N. Morphological characteristics of the thymus and spleen, and the subpopulation composition of lymphocytes in peripheral blood during systemic inflammatory response in male rats with different resistance to hypoxia // International Journal of Inflammation. – 2019. – V. 2019. – Article ID 7584685, 17 pages. [doi: 10.1155/2019/7584685](https://doi.org/10.1155/2019/7584685).

### Другие публикации

6. **Джалилова Д.Ш.** Взаимосвязь устойчивости к гипоксии и 4-суточного биоритма кортикостерона у самцов крыс. Сборник тезисов XXIII Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии и биохимии – 2017». Санкт-Петербург. – 2017. – С. 72-74.
7. **Dzhalilova D.Sh.**, Kosyreva A.M., Tsvetkov I.S., Diatroptov M.E. Intensity of LPS-induced inflammation of Wistar rats with different hypoxia tolerance // «PhD Scientific Days 2017». Budapest, Hungary. – 2017. <http://phd.kmcongress.com/osszefoglalo/1949> (дата обращения 13.10.2017).
8. **Джалилова Д.Ш.**, Диатроптов М.Е. Четырехсуточный биоритм устойчивости к гипоксии и уровня кортикостерона у самцов крыс и их возможные внешние синхронизаторы. Материалы XXIII Съезда физиологического общества им. И.П. Павлова. Воронеж. – 2017. – С. 338-340.
9. **Джалилова Д.Ш.**, Косырева А.М., Пономаренко Е.А. Различия реакции органов иммунной системы, печени и легких у крыс Вистар с разной устойчивостью к гипоксии при системном воспалительном ответе, индуцированном липополисахаридом. Материалы Всероссийской конференции молодых специалистов «Актуальные вопросы фундаментальной, экспериментальной и клинической морфологии». Рязань. – 2017. – С. 104-105.
10. **Джалилова Д.Ш.** Уровни HIF-1A, эритропоэтина, VEGF, TGF-β, 8-изопростаина и кортикостерона в сыворотке крови и экспрессии генов HIF-1A, NF-κB и VEGF в печени у

высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс в разные сроки после гипоксического воздействия. Материалы XXIV Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2018». Санкт-Петербург. – 2018. – С. 89-91.

11. **Джалилова Д.Ш.** Различия системных воспалительных реакций у самцов крыс с разной устойчивостью к гипоксии. Сборник научных трудов научной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии». Москва. – 2018. – С. 12-13.

12. **Джалилова Д.Ш.** Характеристика системной воспалительной реакции у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии самцов крыс Вистар. Материалы XXV Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2019». Санкт-Петербург. – 2019. – С. 82-83.

13. **Джалилова Д.Ш.** Инфраниантный биоритм устойчивости к гипоксии половозрелых самцов крыс. Материалы «XVIII Конференции молодых ученых, специалистов и студентов». Москва. – 2019. – С. 19-20.