

© Коллектив авторов, 2019

DOI: 10.31088/2226-5988-2019-29-1-47-55

УДК: 59.084, 57: 571.27

# МОРФОЛОГИЯ ПЕЧЕНИ И ЛЕГКИХ И ФАГОЦИТАРНАЯ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ СИСТЕМНОЙ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ У САМЦОВ КРЫС С РАЗНОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ГИПОКСИИ

*Д.Ш. Джалилова, А.М. Косырева, М.Е. Диатроптов, М.А. Макарова, О.В. Макарова*

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва

Индивидуальная устойчивость к гипоксии может определять выраженность воспалительных реакций, так как по сравнению с высокоустойчивыми у низкоустойчивых к гипоксии животных в норме выше содержание HIF-1, который взаимосвязан с NF-κB, регулирующим воспалительные процессы. Цели и задачи исследования – охарактеризовать морфологические изменения легких и печени и фагоцитарную активность клеток периферической крови при системном воспалительном ответе, индуцированном липополисахаридом (ЛПС), у животных, отличающихся по устойчивости к гипоксии. Устойчивость крыс Вистар к гипоксии определяли в барокамере по времени жизни на «высоте» 11 500 м. Системный воспалительный ответ моделировали с помощью внутрибрюшинного введения ЛПС в дозе 1,5 мг/кг.

После введения ЛПС как у высокоустойчивых, так и у низкоустойчивых к гипоксии крыс увеличивается количество нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких. По сравнению с высокоустойчивыми к гипоксии животными системный воспалительный ответ у крыс с низкой устойчивостью к гипоксии более выражен, что характеризуется значительной инфильтрацией межальвеолярных перегородок нейтрофилами, большей площадью некрозов в печени, повышенным уровнем активности АЛТ и АСТ, содержанием С-реактивного белка и кортикостерона в сыворотке крови. Более тяжелые проявления системного воспалительного ответа у низкоустойчивых к гипоксии крыс сопровождаются активацией фагоцитов периферической крови, тогда как у высокоустойчивых к гипоксии животных при введении ЛПС наблюдалось увеличение относительного числа гранулоцитов в периферической крови без изменений показателей активности фагоцитоза.

Полученные данные необходимо учитывать при разработке новых подходов к терапии инфекционно-воспалительных заболеваний с учетом индивидуальной чувствительности к содержанию кислорода.

*Ключевые слова:* гипоксия, индивидуальная устойчивость, липополисахарид, воспаление

Устойчивость организма к гипоксии определяется в первую очередь особенностями энергетического обмена и регуляторными механизмами, позволяющими приспособляться к недостатку кислорода. По данным литературы, между группами низкоустойчивых и высокоустойчивых к гипоксии животных существуют различия в поведенческих реакциях, уровне нейромедиаторов в центральной нервной системе, метаболизме, характере реакций сердечно-сосудистой и дыхательной систем, а также содержании HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) – фактора, индуцируемого гипоксией [2–5,

8, 23, 26]. HIF-1 тесно связан с транскрипционным фактором NF-κB (nuclear factor κB), который является ключевым медиатором воспалительного ответа и контролирует экспрессию генов различных цитокинов, хемокинов, белков острой фазы воспаления, молекул адгезии и тем самым может определять выраженность воспалительных реакций [21].

Известно, что HIF-1 способствует выживанию базофилов, эозинофилов, нейтрофилов и тучных клеток, активирует миграцию нейтрофилов и макрофагов, стимулирует продукцию провоспалительных цитокинов

дендритными клетками, индуцирует поляризацию макрофагов в M1 тип [9, 30]. Миелоидные клетки, включая нейтрофилы и моноциты/макрофаги, содержат множество протеолитических ферментов, быстро генерируют активные формы кислорода (АФК), осуществляют фагоцитоз, поэтому их активация может сопровождаться повреждением клеток и тканей [13, 19]. Установлено, что патологические изменения в легких, печени и других органах-мишенях при системных проявлениях воспаления, в том числе сепсисе, во многом опосредованы нейтрофилами [27, 40].

По данным литературы, гипоксия и содержание в клетках HIF-1 $\alpha$  являются критическими факторами для выживания и функционирования нейтрофилов и макрофагов [42]. При нормальной концентрации кислорода в кровотоке нейтрофилы находятся в неактивном состоянии, в них мало белка HIF-1 $\alpha$ , несмотря на обилие его мРНК, что свидетельствует о регуляции активности HIF-1 $\alpha$  пролилгидроксилазами (prolyl hydroxylase – PHDs) [24]. При миграции нейтрофилов в зону воспаления, где содержание кислорода низкое, HIF-1 $\alpha$  стабилизируется, что приводит к активации нейтрофилов [42]. Установлено, что в нейтрофилах человека, стимулированных липополисахаридом (ЛПС), HIF-1 $\alpha$  необходим для образования нейтрофильных внеклеточных ловушек (neutrophil extracellular traps, NETs) – сложных комплексов антимикробных белков, ДНК и гистонов, которые способствуют захвату и лизису бактериальных клеток [12, 35]. *In vitro* и *ex vivo* показано, что ЛПС активирует в нейтрофилах мишень рапамицина млекопитающих – mTOR (mammalian target of rapamycin), который посттрансляционно стабилизирует HIF-1 $\alpha$  и впоследствии способствует образованию NETs [44]. По данным литературы гипоксия и/или генетическая гиперэкспрессия HIF-1 $\alpha$  усиливает фагоцитарную способность активированных макрофагов [9].

Индивидуальная устойчивость к гипоксии может определять выраженность воспалительных изменений при инфекционно-воспалительных заболеваниях, так как у низкоустойчивых к гипоксии животных в норме содержание HIF-1 выше [4], а после острого гипоксического воздействия у них повышается концентрация 8-изопростана в сыворотке крови, что сопряжено с повреждением клеточных макромолекул и увеличением уровня TGF- $\beta$  [3]. Более того, особенности реакции нейтрофилов у животных с разной устойчивостью к гипоксии могут влиять на выраженность повреждений органов при инфекционно-воспалительных заболеваниях, в частности при системном воспалительном ответе, индуцированном ЛПС. Тем не менее в литературе эта проблема не освещена.

Цель работы – охарактеризовать морфологические изменения легких и печени и фагоцитарную активность клеток периферической крови при системном воспалительном ответе, индуцированном ЛПС, у животных, отличающихся по устойчивости к гипоксии.

## Методика исследования

Работа выполнена на половозрелых самцах крыс Вистар (n=40) массой тела 220–270 граммов (филиал «Столбовая» НЦБМТ ФМБА России). 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 НИИ морфологии человека (протокол № 16 от 11 ноября 2015 года). Животных содержали по 6–7 особей в клетке при естественном освещении и температуре 20–22°C. Доступ к воде и пище был свободным.

С целью определения устойчивости к гипоксии животных помещали в вентилируемую барокамеру на «высоту» 11 500 м [1, 6], подъем осуществляли со скоростью 80 м/с. К высокоустойчивым к гипоксии относили крыс, время жизни (до принятия бокового положения) которых «на высоте» составляло более 240 секунд (n=15), к низкоустойчивым – менее 80 секунд (n=13). Среднеустойчивым к гипоксии крыс в эксперименте не использовали.

Для моделирования системного воспалительного ответа через месяц после определения устойчивости к гипоксии высокоустойчивым (n=10) и низкоустойчивым (n=8) крысам внутрибрюшинно вводили ЛПС *Escherichia coli* O26:B6 (Sigma-Aldrich, США) в дозе 1,5 мг/кг, которая вызывает патологические изменения во внутренних органах [29]. Высокоустойчивым (n=5) и низкоустойчивым (n=5) к гипоксии крысам контрольных групп внутрибрюшинно вводили физиологический раствор. Через 24 часа после введения ЛПС животных выводили из эксперимента передозировкой золетила (Virbac Sante Animale, Франция). Срок выведения из эксперимента объясняется тем, что в первые сутки после введения ЛПС развиваются выраженные морфологические изменения печени и легких [7].

Для морфологического исследования проводили забор фрагментов легких и печени, фиксировали их в жидкости Буэна в течение 24 часов. После гистологической проводки по спиртам восходящей концентрации и хлороформу в аппарате Tissue-Tek VIP5Jr (Sakura, США) кусочки органов заливали в гистомикс на аппарате 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). С помощью микроскопа Leica DM2500 в гистологических препаратах легких при  $\times 640$  получали цифровые изображения 10 полей зрения. В каждом поле зрения в программе Image Score M оценивали площадь межальвеолярных перегородок и количество нейтрофилов в них. Полученные данные нормировали на 10 000 мкм<sup>2</sup> площади межальвеолярных перегородок. У высокоустойчивых

( $n=5$ ) и низкоустойчивых ( $n=5$ ) к гипоксии животных с некрозами в печени их площадь оценивали в программе Image Scope M при  $\times 200$  в интерактивном режиме с использованием камеры Leica DFC290. Измерения проводили в 10 полях зрения, результаты выражали в микрометрах квадратных ( $\text{мкм}^2$ ).

Кровь забирали из шейных вен, в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) проводили определение содержания кортикостерона (IBL International, Германия) и С-реактивного белка (СРБ) (Cloud-Clone Corp., Китай), согласно приложенной инструкции. Для регистрации интенсивности цветной реакции использовали микропланшетный ИФА-анализатор (ANTHOS 2010, Австрия).

Для оценки функциональных нарушений гепатоцитов в сыворотке крови на автоматическом биохимическом анализаторе Mindray Bs-120 (Китай) кинетическим методом определяли активность ферментов аспартатаминотрансферазы (АСТ) и аланинаминотрансферазы (АЛТ). Использовали наборы реактивов Human GmbH (Германия).

Абсолютное и относительное количество гранулоцитов в периферической крови оценивали с помощью автоматического гематологического анализатора Mindray BC-2800Vet (Китай).

Для определения фагоцитарной активности клеток периферической крови использовали набор IngoFlowEx kit (Exbio Diagnostics, Чехия). Клетки крови инкубировали с *E. coli*, конъюгированной с FITC, при  $37^\circ\text{C}$  в термостате в течение 30 минут в соответствии с инструкцией. Несвязанные с клетками крови *E. coli* отмывали, эритроциты лизировали с помощью прилагаемого раствора. Параллельно проводили контрольную реакцию без добавления *E. coli* в кровь. Оценивали фагоцитарный показатель (процент клеток с *E. coli*-FITC<sup>+</sup>) и индекс стимуляции (средняя интенсивность свечения *E. coli*-FITC, фагоцитированной клетками) клеток периферической крови на приборе Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, США).

Полученные данные подвергали статистической обработке. Характер распределения показателей устанавливали с помощью теста Колмогорова–Смирнова. Поскольку данные были распределены ненормально, для оценки статистической значимости полученных результатов использовали методы непараметрической статистики (U-критерий Манна–Уитни) в программе Statistica 8.0. Данные выражали в виде медианы и интерквартильного размаха (Med (Low-High)). Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Через 24 часа после введения ЛПС в легких как у высокоустойчивых, так и у низкоустойчивых к гипоксии крыс наблюдались очаговый интраальвеолярный отек и выраженное неравномерное полнокровие сосудов (рис. 1). По сравнению с контрольными группами и у высокоустойчивых, и у низкоустойчивых к

гипоксии крыс число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких было статистически значимо выше (табл. 1). Через 24 часа после введения ЛПС число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких было выше у низкоустойчивых к гипоксии крыс по сравнению с высокоустойчивыми. Повышение числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких обусловлено увеличением синтеза хемокинов и молекул адгезии эндотелиальными клетками в ответ на введение ЛПС [13, 38]. По-видимому, более выраженное повышение числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у низкоустойчивых к гипоксии животных связано с более высокой экспрессией *Hif-1 $\alpha$* , который усиливает миграцию и уменьшает апоптоз нейтрофилов [42]. Повышение уровня экспрессии гена *Hif-1 $\alpha$*  приводит к увеличению экспрессии *Nf- $\kappa$ b*, который регулирует воспалительные процессы и, в частности, усиливает экспрессию молекул адгезии и хемокинов [18, 25].

После введения ЛПС у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс в печени выявлялись альтеративные изменения – выраженная и распространенная средне- и мелкокапельная дистрофия гепатоцитов, очаговые и субтотальные ландшафтообразные некрозы (рис. 2). Выражено неравномерное полнокровие центральных вен и синусоидных капилляров, определялись стазы и сладжи.

В печени у высокоустойчивых к гипоксии крыс очаговые некрозы выявлялись у пяти из восьми животных (63%), у трех из восьми (37%) животных наблюдалась умеренно выраженная мелкокапельная дистрофия гепатоцитов. В печени у низкоустойчивых к гипоксии животных некрозы были обнаружены у всех пяти крыс (100%), причем у трех крыс из пяти (60%) они были ландшафтообразными. При морфометрической оценке площади некрозов было установлено, что у низкоустойчивых к гипоксии крыс этот показатель статистически значимо выше (рис. 3).

Таблица 1

**Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии крыс Вистар ( $n=23$ ) контрольных групп и через 24 часа после введения ЛПС (Ме; 25–75%).**

Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких/10 000 $\text{мкм}^2$			
Группы	Контрольные	24 часа ЛПС	p
ВУ ( $n=13$ )	2,1 (1,4–2,5)	6,8 (5,8–8,0)	0,003
НУ ( $n=10$ )	2,1 (1,7–2,7)	9,5 (8,7–9,9)	0,009
p	0,75	0,01	

p – статистическая значимость различий, критерий Манна–Уитни

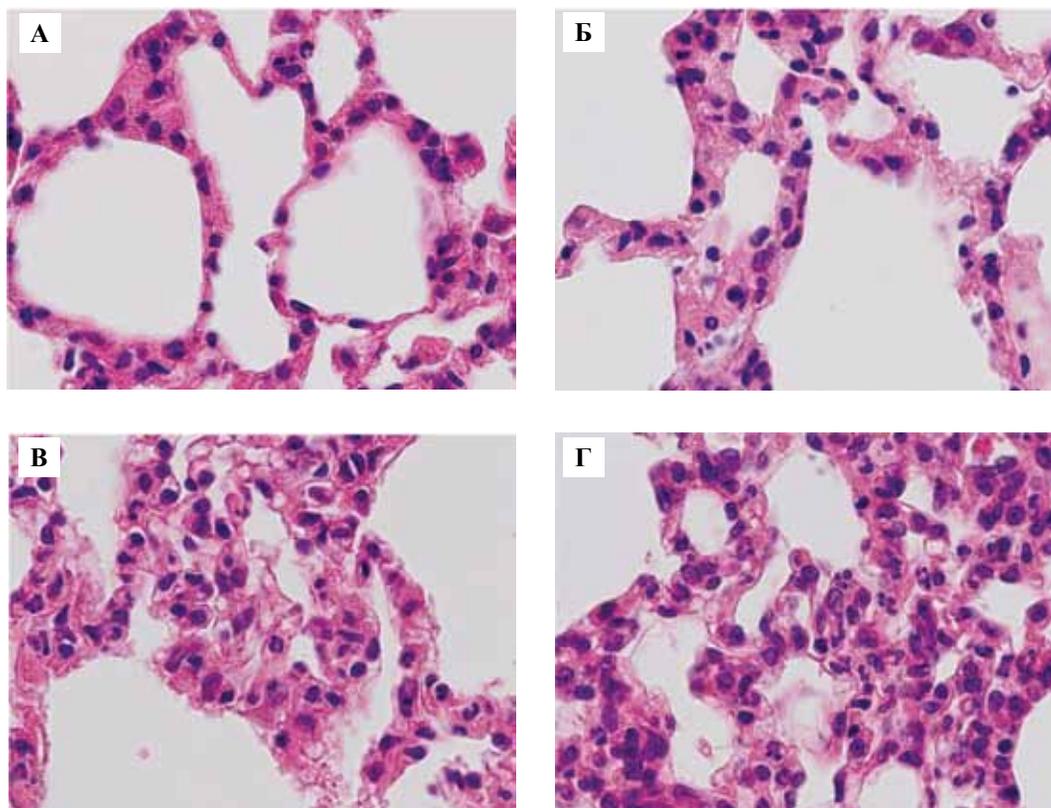


Рис. 1. Морфологические изменения в легких у высокоустойчивых (А, В) и низкоустойчивых (Б, Г) к гипоксии самцов крыс Вистар контрольных групп и через 24 часа после введения ЛПС (В, Г).

Контрольная группа. А, Б – небольшое количество нейтрофилов в межальвеолярных перегородках; 24 часа после введения ЛПС.

В – диффузно рассеянные полиморфноядерные лейкоциты в межальвеолярных перегородках.

Г – нейтрофильная инфильтрация межальвеолярных перегородок. Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 1000$

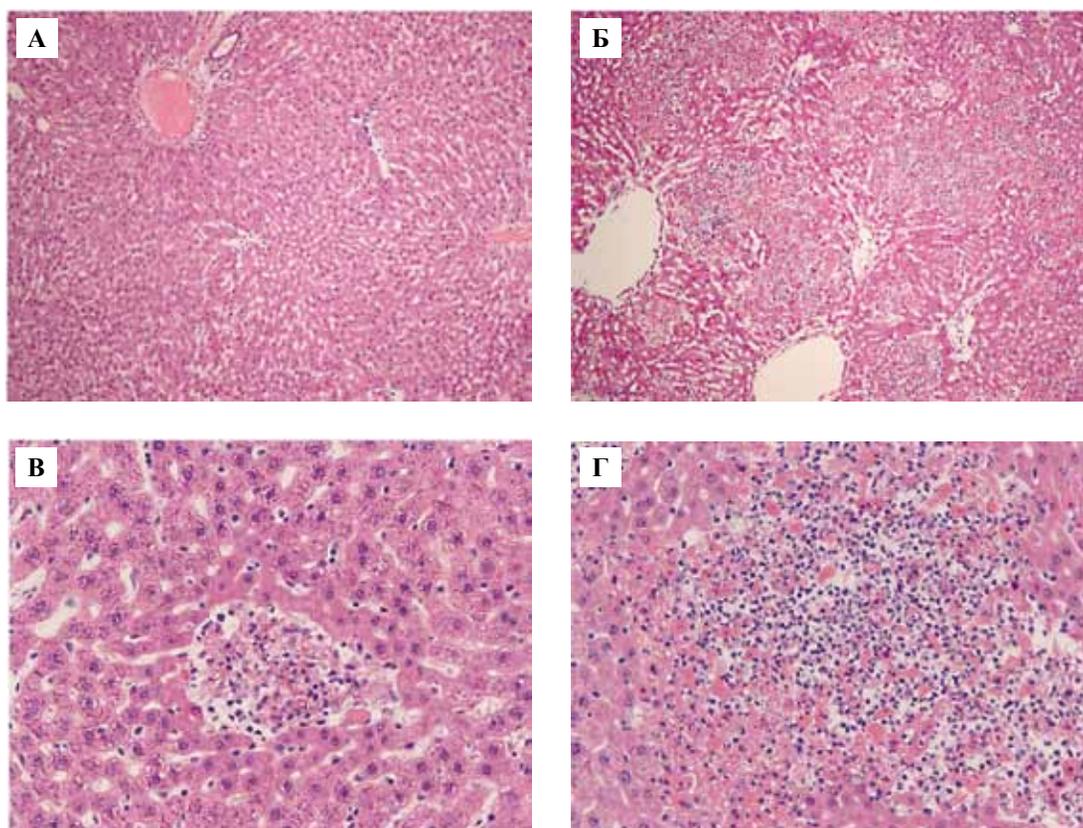
По данным биохимического анализа нами показано, что через сутки после введения ЛПС в сыворотке крови как у высокоустойчивых, так и у низкоустойчивых к гипоксии крыс уровень активности ферментов печени (АСТ и АЛТ) повышался по сравнению с контрольными группами (табл. 2). Между высокоустойчивыми и низкоустойчивыми к гипоксии животными контрольных и опытных групп статистически значимые различия не выявлены, 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. Значительное повышение активности АСТ и АЛТ в сыворотке крови свидетельствует о выраженных повреждениях гепатоцитов [31, 36].

Известно, что повреждение гепатоцитов печени развивается в ответ на прямое действие ЛПС, микроциркуляторные нарушения, повышение уровня цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-10), активных форм кислорода и NO [15, 16, 28]. Нами было показано, что концентрация некоторых провоспалительных цитокинов, в частности IL-1 $\beta$ , в крови у низкоустойчивых к гипоксии крыс выше по сравнению с высокоустойчивыми [18], что может определять большие повреждения гепатоцитов у низкоустойчивых к гипоксии крыс,

о чем свидетельствуют высокий показатель площади некрозов печени и уровень активности АЛТ и АСТ в сыворотке крови у них.

По данным ИФА по сравнению с контрольной группой через 24 часа после введения ЛПС только у низкоустойчивых к гипоксии крыс концентрация маркера воспаления – СРБ в сыворотке крови увеличилась (табл. 2). СРБ является одним из клинических маркеров тяжести инфекционно-воспалительных заболеваний, в том числе сепсиса [37], и его высокие концентрации свидетельствуют о неблагоприятном прогнозе заболевания [10].

Таким образом, более выраженные патологические изменения, обнаруженные в печени у низкоустойчивых к гипоксии крыс, сопровождаются увеличением концентрации СРБ в сыворотке крови, тогда как у высокоустойчивых к гипоксии крыс, у которых содержание СРБ в сыворотке крови статистически значимо не отличалось от контрольных значений, патологические изменения в печени были менее выраженными. Выявленные различия в тяжести индуцированного ЛПС системного воспалительного ответа у животных с разной устойчивостью к гипоксии, возможно, определяются содержанием HIF-1 $\alpha$ , так как в условиях низкого содержания кислорода при воспалении у низкоустойчивых к



**Рис. 2.** Морфологические изменения в печени у высокоустойчивых (А, В) и низкоустойчивых (В, Г) к гипоксии крыс Вистар через 24 часа после введения ЛПС. Высокоустойчивые (А, В) – очаговые некрозы, неравномерное полнокровие междольковых вен и артерий, синусоидных капилляров. Низкоустойчивые (В, Г) – обширные некрозы. Окраска гематоксилином и эозином. А, Б –  $\times 100$ , В, Г –  $\times 320$

Таблица 2

**Уровень активности АЛТ и АСТ, содержание СРБ и кортикостерона в сыворотке крови у высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии крыс Вистар (n=23) контрольных групп и через 24 часа после введения ЛПС (Ме; 25–75%)**

Показатели	Группы	Контрольные	24 часа ЛПС	p
АСТ, МЕ/л	ВУ (n=10)	147,6 (132,2–157,3)	895,5 (378,7–1290,9)	0,03
	НУ (n=10)	152,4 (140,8–168,9)	5048,3 (1599,5–6691,0)	0,02
	p	0,67	0,35	
АЛТ, МЕ/л	ВУ (n=10)	64,8 (55,6–74,5)	790,4 (246,2–1046,9)	0,01
	НУ (n=10)	67,6 (64,3–72,4)	4132,0 (1490,8–4420,4)	0,006
	p	0,83	0,25	
СРБ, пг/мл	ВУ (n=13)	1833 (1645–2585)	2115 (1974–2397)	0,60
	НУ (n=10)	1363 (1128–1551)	2421 (1810–2844)	0,04
	p	0,09	0,81	
Кортикостерон, нмоль/л	ВУ (n=13)	739,6 (384,6–767,2)	426,8 (402,4–556,0)	0,85
	НУ (n=10)	715,2 (701,6–764,0)	701,6 (653,2–725,6)	0,66
	p	0,92	0,04	

p – статистическая значимость различий, критерий Манна–Уитни

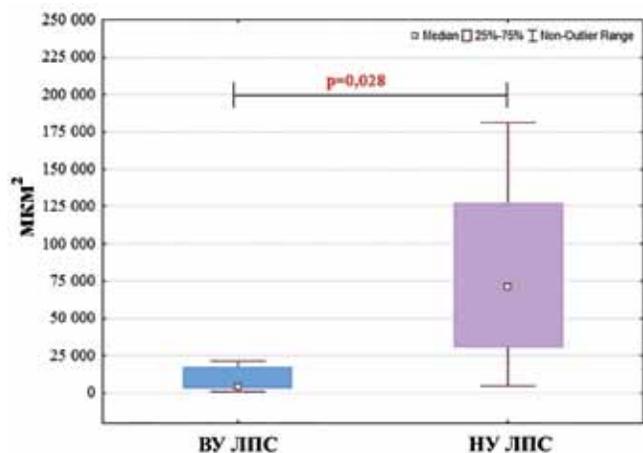


Рис. 3. Площадь некрозов на стандартной площади среза (50 000 мкм²) печени у высокоустойчивых (ВУ) (n=5) и низкоустойчивых (НУ) (n=5) к гипоксии крыс Вистар через 24 часа после введения ЛПС (Me; 25–75%).

Данные представлены без учета животных, имеющих только дистрофические изменения

p – статистическая значимость различий, критерий Манна–Уитни

гипоксии особой высокая продукция HIF-1a приводит к выраженной активации NF-kB-зависимой продукции провоспалительных цитокинов [17, 21].

По 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 [11, 33]. Глюкокортикоиды подавляют синтез цитокинов иммунными клетками, регулируют их миграцию в очаги воспаления и поляризуют иммунный ответ преимущественно по Th2-типу [14]. Нами показано, что через сутки после введения ЛПС по сравнению с низкоустойчивыми к гипоксии животными в сыворотке крови у высокоустойчивых крыс концентрация кортикостерона была статистически значимо ниже (табл. 2). Вероятно, более высокий уровень кортикостерона у низкоустойчивых к гипоксии крыс по сравнению с высокоустойчивыми обусловлен

активацией компенсаторных реакций в ответ на более выраженный ЛПС-индуцированный системный воспалительный ответ.

При оценке относительного и абсолютного числа гранулоцитов в периферической крови между высокоустойчивыми и низкоустойчивыми к гипоксии крысами контрольных и опытных групп различия не выявлены. Через сутки после введения ЛПС только у высокоустойчивых к гипоксии крыс происходило статистически значимое повышение относительного числа гранулоцитов в крови (табл. 3).

Оценка фагоцитарной активности клеток периферической крови показала, что по сравнению с высокоустойчивыми у низкоустойчивых к гипоксии крыс процент фагоцитирующих клеток был статистически значимо выше как в контрольной группе, так и через 24 часа после введения ЛПС (рис. 4 А). Тем не менее по сравнению с соответствующей контрольной группой у крыс и с высокой, и с низкой устойчивостью к гипоксии в ответ на введение ЛПС изменения фагоцитарного показателя не выявлены. Возможно, высокий показатель числа фагоцитирующих клеток крови у низкоустойчивых к гипоксии крыс как в норме, так и после введения ЛПС определяется исходной высокой генетически запрограммированной продукцией HIF-1a в гранулоцитах. В литературе данные о содержании HIF-1a в гранулоцитах животных, отличающихся по устойчивости к гипоксии, не представлены, но известно, что у низкоустойчивых животных в норме содержание HIF-1 в неокортексе и печени выше [4, 18].

Индекс стимуляции фагоцитарной активности клеток периферической крови в контрольных группах у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс не различался (рис. 4 Б), однако через 24 часа после введения ЛПС только у низкоустойчивых к гипоксии крыс наблюдалось увеличение этого показателя, в то время как у высокоустойчивых животных изменения индекса стимуляции фагоцитарной активности не обнаружены. Выявленная нами ЛПС-индуцированная стимуляция фагоцитарной активности гранулоцитов только у низкоустойчивых к гипоксии животных мо-

Таблица 3

Относительное и абсолютное число гранулоцитов в периферической крови у высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии крыс Вистар (n=23) контрольных групп и через 24 часа после введения ЛПС (Me; 25–75%)

Показатели	Группы	Контрольные	24 часа ЛПС	p
Абсолютное число, 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	
Относительное число, %	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	

p – статистическая значимость различий, критерий Манна–Уитни

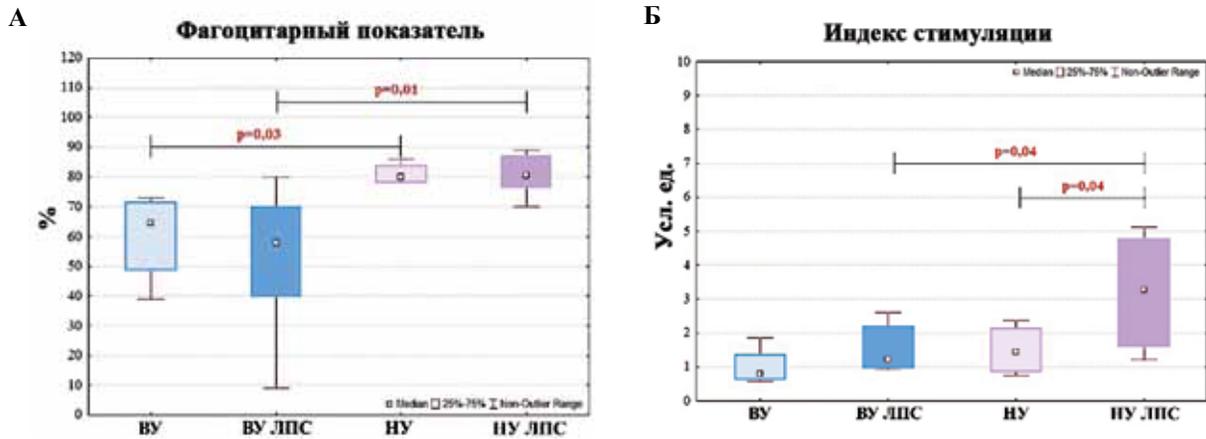


Рис. 4. Фагоцитарный показатель (А) и фагоцитарный индекс стимуляции (Б) клеток периферической крови у высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии крыс Вистар контрольных групп (ВУ, НУ) и через 24 часа после введения ЛПС (ВУ ЛПС, НУ ЛПС), Ме (25%; 75%)

p – статистическая значимость различий, критерий Манна–Уитни

жет определяться более выраженным воспалительным ответом, характеризующимся в том числе повышенным уровнем NF-κB-зависимой продукции провоспалительных цитокинов [32] и активацией HIF-1α [41]. S. Frede et al. [22] показано, что активация HIF-1α может осуществляться как непосредственно ЛПС, так и транскрипционным фактором NF-κB [39, 43]. 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, отражает высокую тяжесть воспалительного процесса [22]. В свою очередь, гиперстимуляция фагоцитарной активности моноцитов и гранулоцитов, направленная на нейтрализацию ЛПС, может приводить к повреждению органов и тканей и развитию полиорганной недостаточности.

Таким образом, по сравнению с высокоустойчивыми к гипоксии животными ЛПС-индуцированный системный воспалительный ответ у крыс с низкой устойчивостью к гипоксии более выражен, что характеризуется большей нейтрофильной инфильтрацией межальвеолярных перегородок легких, площадью некрозов печени, высоким уровнем активности АЛТ и АСТ, содержания СРБ и кортикостерона в сыворотке крови. Более тяжелые проявления системного воспалительного ответа у низкоустойчивых к гипоксии крыс сопровождаются активацией фагоцитарной активности моноцитов и гранулоцитов периферической крови, тогда как у высокоустойчивых к гипоксии животных при введении ЛПС наблюдалось увеличение относительного числа гранулоцитов в периферической крови без изменений показателей активности фагоцитоза. Полученные новые данные о различиях морфологических изменений печени и фагоцитарной активности гранулоцитов периферической крови при ЛПС-

индуцированном системном воспалительном ответе у самцов крыс Вистар с высокой и низкой устойчивостью к гипоксии необходимо учитывать при разработке новых подходов к терапии инфекционно-воспалительных заболеваний в зависимости от индивидуальной чувствительности к содержанию кислорода.

**Литература/References**

1. Агаджанян Н.А., Хачатурьян М.Л., Панченко Л.А. Влияние острого гипоксического воздействия на устойчивость крыс к гипоксии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1999. Т. 127, № 6. С. 625–628 [Agadzhanian N.A., Khachatryan M.L., Panchenko L.A. Effect of acute hypoxia on resistance to hypoxia in rats. // Bulletin of experimental biology and medicine. 1999. V. 127, No 6. P. 625–628 (In Russ.)].
2. Грек О.Р., Ефремов А.В., Шаранов В.И. Гипобарическая гипоксия и метаболизм ксенобиотиков. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. 120 с. [Grek O.R., Efremov A.V., Sharapov V.I. Hypobaric hypoxia and metabolism of xenobiotics. M.: GEOTAR-Media, 2007. 120 s. (In Russ.)].
3. 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-изопростана и кортикостерона в сыворотке крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2018. Т. 165, № 6. С. 742–747 [Dzhalilova D.Sh., Diatroptov M.E., Tsvetkov I.S., Makarova O.V., Kuznetsov S.L. Expression of Hif-1α, Nf-κb and Vegf genes in the liver and the content of HIF-1α, erythropoietin, VEGF, TGF-β, 8-isoprostane and corticosterone in the blood serum in tolerant and susceptible to hypoxia Wistar rats // Bulletin of experimental biology and medicine. 2018. V. 165, No 6. P. 742–747 (In Russ.)].
4. Кирова Ю.И., Германова Э.Л., Лукьянова Л.Д. Фенотипические особенности динамики содержания HIF-1α в неокортексе крыс при различных режимах гипоксии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2012. Т. 154, № 12. С. 681–686 [Kirova Y.I., Germanova E.L., Lukyanova L.D. Phenotypic features of the dynamics of HIF-1α content in the neocortex of rats under different hypoxia regimes // Bulletin of experimental biology and medicine. 2012. T. 154, No 12. P. 681–686 (In Russ.)].

- Lukyaynova L.D.* Phenotypic features of the dynamics of HIF-1 $\alpha$  levels in rat neocortex in different hypoxia regimens // Bulletin of experimental biology and medicine. 2012. V. 154, No 12. P. 681–686 (In Russ.).
5. Лукьянова Л.Д. Молекулярные механизмы тканевой гипоксии и адаптации организма. Физиологический журнал. 2003. Т. 49, № 3. С. 17–35. [*Lukyaynova L.D.* Molecular mechanisms of tissue hypoxia and adaptation // *Fiziologichnyi zhurnal*. 2003. V. 49, No 3. P. 17–35 (In Russ.).]
  6. Лукьянова Л.Д., Кирова Ю.И. Влияние гипоксического preconditionирования на свободнорадикальные процессы в тканях крыс с различной толерантностью к гипоксии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2011. Т. 151, № 3. С. 263–268 [*Lukyaynova L.D., Kirova Y.I.* Effect of hypoxic preconditioning on free radical processes in tissues of rats with different resistance to hypoxia // *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2011. V. 151, No 3. P. 263–268 (In Russ.).]
  7. Писарев В.Б., Богомолова Н.В., Новочадов В.В. Бактериальный эндотоксикоз: взгляд патолога. Волгоград: Издательство Волгоградского государственного медицинского университета, 2008. 208 с. [*Pisarev V.B., Bogomolova N.V., Novochadov V.V.* Bacterial endotoxemia: pathologist's view. Volgograd: Publisher Volgograd state medical university, 2008. 208 s. (In Russ.).]
  8. Саноцкая Н.В., Мацневский Д.Д., Лебедева М.А. Изменение гемодинамики и дыхания крыс с различной чувствительностью к острой гипоксии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2004. Т. 138, № 7. С. 24–28 [*Sanotskaya N.V., Matsievskii D.D., Lebedeva M.A.* Changes in hemodynamics and respiration in rats with different resistance to acute hypoxia // *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2004. V. 138, No 7. P. 24–28 (In Russ.).]
  9. Anand R.J., Gribar S.C., Li J., Kohler J.W. et al. Hypoxia causes an increase in phagocytosis by macrophages in a HIF-1 $\alpha$ -dependent manner // *J Leukoc Biol*. 2007;82(5):1257–65.
  10. Beltempo M., Viel-Therault I., Thibeault R., Julien A.S. C-reactive protein for late-onset sepsis diagnosis in very low birth weight infants // *BMC Pediatr*. 2018;18:16.
  11. Bornstein S.R., Ziegler C.G., Krug A.W., Kanczkowski W. et al. The role of Toll-like receptors in the immune-adrenal crosstalk // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2006;1088:307–18.
  12. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria // *Science*. 2004;303(5663):1532–5.
  13. Brown K.A., Brain S.D., Pearson J.D., Edgeworth J.D. et al. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis // *Lancet*. 2006;368(9530):157–69.
  14. Chrousos G.P. The stress response and immune function: clinical implications. The 1999 Novera H. Spector lecture // *Ann N. Y. Acad. Sci.* 2000;917:38–67.
  15. Cinel I., Opal S.M. Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer // *Crit Care Med*. 2009;37(1):291–304.
  16. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis // *Nature*. 2002;420(6917):885–91.
  17. Cummins E.P., Berra E., Comerford K.M., Ginouvès A. et al. Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates I $\kappa$ B kinase-beta, giving insight into hypoxia-induced NF $\kappa$ B activity // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:18154–9.
  18. Dzhililova D.S., Kosyreva A.M., Diatroptov M.E., Ponomarenko E.A. et al. Dependence of the severity of the systemic inflammatory response on resistance to hypoxia in male Wistar rats // *Journal of Inflammation Research*. 2019;12:1–14.
  19. Fang H., Jiang W., Cheng J., Lu Y. et al. Balancing Innate Immunity and Inflammatory State via Modulation of Neutrophil Function: A Novel Strategy to Fight Sepsis // *Journal of Immunology Research*. 2015. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/187048>.
  20. Flores-Mejia L.A., Cabrera-Rivera G.L., Ferat-Osorio E., Mancilla-Herrera I. et al. Function is dissociated from activation-related immunophenotype on phagocytes from patients with sirs/sepsis syndrome // *Shock*. 2018.doi: 10.1097/SHK.0000000000001314.
  21. 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;44:207–18.
  22. Frede S., Stockmann C., Freitag P., Fandrey J. Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF- $\kappa$ B // *Biochem. J*. 2006;396:517–27.
  23. Ghosh D., Kumar R., Pal K. Individual variation in response to simulated hypoxic stress of rats // *Ind J Exp Biol*. 2012;50:744–48.
  24. 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.
  25. Hirota K. Involvement of hypoxia-inducible factors in the dysregulation of oxygen homeostasis in sepsis // *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 2015;15:29–40.
  26. 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.
  27. Kabay B., Kocaepe C., Baykal A., Ozden H. et al. 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):105–15.
  28. 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;83:151–7.
  29. Kosyreva A.M., Makarova O.V., Kakturskiy L.V., Mikhailova L.P. et al. Sex differences of inflammation in target organs, induced by intraperitoneal injection of lipopolysaccharide, depend on its dose // *J Inflamm Res*. 2018;11:431–45.
  30. Krzywinska E., Stockmann C. Hypoxia, metabolism and immune cell function // *Biomedicines*. 2018;6:1–20.
  31. Lee T.H., Kim W.R., Poterucha J.J. Evaluation of elevated liver enzymes // *Clin Liver Dis*. 2012;16:183–98.
  32. Liu T., Zhang L., Joo D., Sun S.-C. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2017;2:e17023.
  33. Ma X.C., Chen L.T., Oliver J., Horvath E. et al. Cytokine and adrenal axis responses to endotoxin // *Brain Research*. 2000;861:135–42.
  34. Ma A.C., Kubes P. Platelets, neutrophils, and neutrophil extracellular traps (NETs) in sepsis // *J. Thromb Haemost*. 2008;6(3):415–20.
  35. McInturff A.M., Cody M.J., Elliott E.A., Glenn J.W. et al. Mammalian target of rapamycin regulates neutrophil extracellular trap formation via induction of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  // *Blood*. 2012;120(15):3118–25.

36. *Nesslerer N., Launey Y., Aninat C., Morel F. et al.* Clinical review: the liver in sepsis // *Critical Care*. 2012;16:235.
37. *Póvoa P., Souza-Dantas V.C., Soares M., Salluh J.F.* C-reactive protein in critically ill cancer patients with sepsis: influence of neutropenia // *Crit Care*. 2011;15:R129.
38. *Remick D.G.* Pathophysiology of sepsis // *Am J Pathol*. 2007;170(5):1435–44.
39. *Rius J., Guma M., Schachtrup C., Akassoglou K. et al.* NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha // *Nature*. 2008;453:807–11.
40. *Stehr S.N., Knels L., Weissflog C., Schober J. et al.* Effects of IGM-enriched solution on polymorphonuclear neutrophil function, bacterial clearance, and lung histology in endotoxemia // *Shock*. 2008;29:167–72.
41. *Taylor C.T., Colgan S.P.* Regulation of immunity and inflammation by hypoxia in immunological niches // *Nature*. 2017;17:774–85.
42. *Thompson A.A., Binham J., Plant T., Whyte M.K. et al.* Hypoxia, the HIF pathway and neutrophilic inflammatory responses // *Biol Chem*. 2013;394(4):471–7.
43. *Van Uden P., Kenneth N.S., Rocha S.* Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB // *Biochem J*. 2008;412:477–84.
44. *Vollger L., Akong-Moore K., Cox L., Goldmann O. et al.* Iron-chelating agent desferrioxamine stimulates formation of neutrophil extracellular traps (NETs) in human blood-derived neutrophils // *Biosci Rep*. 2016;36(3):e00333.

## LIVER AND LUNG MORPHOLOGY AND PHAGOCYTTIC ACTIVITY OF PERIPHERAL BLOOD CELLS DURING SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE IN MALE RATS WITH DIFFERENT RESISTANCE TO HYPOXIA

*D.Sh. Dzhililova, A.M. Kosyreva, M.E. Diatroptov, M.A. Makarova, O.V. Makarova*

Research Institute of Human Morphology, Moscow

Individual tolerance to hypoxia may determine the severity of inflammatory reactions, since hypoxia susceptible animals show elevated HIF-1 levels compared with hypoxia tolerant ones. HIF-1 is known to correlate with NF-kB regulating inflammatory responses.

The goals and objectives of the study are to characterize the morphological changes in the lungs and liver as well as the phagocytic activity of peripheral blood cells in the systemic inflammatory response induced by lipopolysaccharide (LPS) in animals with different hypoxic resistance.

The resistance of Wistar rats to hypoxia was determined in the barochamber by the gasping time at the altitude of 11,500 m. The systemic inflammatory response was modeled by intraperitoneal injection of LPS at a dose of 1.5 mg/kg.

After the administration of LPS, the number of neutrophils in the interalveolar septa of the lungs increased in both hypoxia tolerant and hypoxia susceptible rats. In tolerant animals, systemic inflammatory response in susceptible rats was more pronounced, which was expressed in dense infiltration of interalveolar septa with neutrophils, larger area of liver necrosis, higher levels of ALT, AST, serum C-reactive protein and corticosterone. The more prominent manifestations of the systemic inflammatory response in hypoxia susceptible rats were accompanied by the activation of peripheral blood phagocytes. In hypoxia tolerant animals after LPS administration, the increased relative number of granulocytes in the peripheral blood with unchanged phagocytosis activity was detected.

The obtained data should be considered in the development of new approaches to the therapy of infectious and inflammatory diseases, taking into account the individual sensitivity to oxygen content.

*Key words:* hypoxia, individual resistance, lipopolysaccharide, inflammation

### Информация об авторах

Джалилова Джулия Шавкатовна – младший научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон 8 906 715 7024. E-mail: juliajal93@mail.ru

Косырева Анна Михайловна – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека.

Диатроптов Михаил Евгеньевич – доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека.

Макарова Мария Александровна – младший научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека.

Макарова Ольга Васильевна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. E-mail: morfolhum@mail.ru

*Материал поступил в редакцию 15 февраля 2019 года*