

ВЛИЯНИЕ ОКИСЛЕННОГО ДЕКСТРАНА НА МЕТАБОЛИЗМ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ОРГАНОВ МЫШЕЙ С ЛИПОПОЛИСАХАРИД-ИНДУЦИРОВАННОЙ ПНЕВМОНИЕЙ

EFFECT OF OXIDIZED DEXTRAN ON THE METABOLISM OF THE EXTRACELLULAR MATRIX OF THE ORGANS OF MICE WITH LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED PNEUMONIA

Ким Л.Б. Kim L.B.
Троицкий А.В. Troitskiy A.V.
Путятина А.Н. Putyatina A.N.
Русских Г.С. Russkikh G.S.
Быстрова Т.Н. Bystrova T.N.

ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»,
г. Новосибирск, Россия

Federal Research Center of Fundamental
and Translational Medicine,
Novosibirsk, Russia

Проблема профилактики фиброза при воспалительных процессах остается актуальной.

Цель исследования – изучить метаболизм внеклеточного матрикса (ВКМ) в органах мышей при введении липополисахарида (ЛПС) и окисленного декстрана 40 кДа (ОД-40).

Материалы и методы. Исследование выполнено на мышах (n = 21), которые были распределены случайным образом на три группы по 7 особей: в 1-ю группу вошли интактные животные, во 2-й осуществлялось однократное интраназальное введение ЛПС, в 3-й – введение ЛПС и ингаляции ОД-40. Через 24 часа мышей выводили из эксперимента. В сыворотке крови и гомогенатах органов определяли содержание основных компонентов ВКМ и ферментов, регулирующих его обмен, а также гипоксия-индуцибельного фактора.

Результаты. В легких мышей 2-й группы наблюдали активацию матричных металлопротеиназ (ММП), обмена коллагенов и других компонентов ВКМ, увеличение содержания тканевых ингибиторов металлопротеиназ (ТИМП-1, -2), происходящих на фоне гипоксии тканей, в печени – снижение активности α 2-макроглобулина (α 2-МГ) и содержания ТИМП-2, в селезенке – увеличение деградации коллагенов в условиях растущей гипоксии тканей и синтеза гиалуронана. В легких мышей 3-й группы отмечено снижение активности ММП, содержания ТИМП-1 и сульфатированных гликозаминогликанов до показателей животных 1-й группы, в печени – уменьшение содержания белковосвязанного гидроксипролина, гиалуронансинтазы 2, эластина, сохраняющаяся активность ММП при снижении ингибиторов (ТИМП-1, ТИМП-2 и активности α 2-МГ) и гипоксии, в селезенке – снижение всех изученных показателей относительно 2-й группы.

Заключение. После введения ЛПС и ингаляции ОД-40 реакция ВКМ через 24 часа в органах оказалась различной.

Ключевые слова: окисленный декстран 40 кДа (ОД-40); липополисахарид; острое повреждение легких (ОПЛ); гипоксия-индуцибельный фактор-1 α ; гиалуронансинтаза 2; гликозаминогликаны; коллагены; матриксные металлопротеиназы/тканевые ингибиторы металлопротеиназ

The problem of preventing fibrosis in inflammatory processes remains relevant.

Objective – to study the metabolism of extracellular matrix (ECM) in mouse organs with the introduction of lipopolysaccharide (LPS) and oxidized dextran 40 kDa (OD-40).

Materials and methods. The study was performed on mice (n = 21) divided into three groups of 7 individuals: group 1 – intact animals, group 2 – animals with single intranasal administration of LPS, group 3 – introduction of LPS and inhalation of OD-40. After 24 hours, the mice were withdrawn from the experiment. The content of the main components of ECM and enzymes regulating its metabolism, as well as the content of hypoxia-inducible factor, were determined in blood serum and organ homogenates.

Results. In the lungs of mice of group 2, activation of matrix metalloproteinases (MMP), collagen metabolism and other components of ECM, and an increase in the content of tissue metalloproteinase inhibitors (TIMP-1, -2) occurring against the background of tissue hypoxia were observed. The liver showed a decrease in the activity of α 2-macroglobulin (α 2-MG) and the content of TIMP-2. The spleen had an increase in collagen degradation under conditions of increasing tissue hypoxia and hyaluronan synthesis. In the lungs of group 3, there was a decrease in the activity of MMP, the content of TIMP-1 and sulfated glycosaminoglycans to the indicators of group 1. The liver showed a decrease in the content of protein-bound hydroxyproline, hyaluronan synthase 2, elastin, and the continued activity of MMP with a decrease in inhibitors (TIMP-1, TIMP-2 and α 2-MG activity) and hypoxia. There is a decrease in all studied indicators in the spleen in relation to the group 2.

Conclusion. After administration of LPS and inhalation of OD-40, the reaction of ECM in the organs after 24 hours turned out to be different.

Key words: oxidized dextran 40 kDa (OD-40); lipopolysaccharide (LPS); acute lung injury (ALI); hypoxia-inducible factor-1 α ; hyaluronan synthase 2; glycosaminoglycans; collagens; matrix metalloproteinases/tissue inhibitors of metalloproteinases

Для цитирования: Ким Л.Б., Троицкий А.В., Путятина А.Н., Русских Г.С., Быстрова Т.Н. ВЛИЯНИЕ ОКИСЛЕННОГО ДЕКСТРАНА НА МЕТАБОЛИЗМ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ОРГАНОВ МЫШЕЙ С ЛИПОПОЛИСАХАРИД-ИНДУЦИРОВАННОЙ ПНЕВМОНИЕЙ //ПОЛИТРАВМА / POLYTRAUMA. 2024. № 2. С. 79-86.

Режим доступа: <http://poly-trauma.ru/index.php/pt/article/view/532>

DOI: 10.24412/1819-1495-2024-2-79-86

Острое повреждение легких (ОПЛ), особенно его тяжелая форма — острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС), представляет огромную проблему для здравоохранения, поскольку показатели смертности все еще остаются высокими.

Известно, что липополисахарид (ЛПС), основной компонент внешней оболочки клеток грамотрицательных бактерий, является доминирующим фактором индукции воспаления [1], и его часто применяют для моделирования острых системных воспалительных реакций [2-4]. Для моделирования ОПЛ используют интратрахеальный [5] или эндотрахеальный способ введения ЛПС [1], поскольку такие подходы эффективно индуцировали ОПЛ. Однако они сопряжены с риском травматизации дыхательных путей, особенно у мелких животных, и требуют дополнительного хирургического вмешательства и обезболивающих процедур. В этой связи поиск более физиологичных способов моделирования ОПЛ представляется актуальным.

Тяжесть состояния при ОПЛ обусловлена не только развитием стойкого воспаления и фиброза легких, но также синдромом полиорганной недостаточности разной степени тяжести [6]. Если проявления воспаления при ОПЛ общеизвестны, то фиброз как результат ремоделирования внеклеточного матрикса (ВКМ) остается в большей степени неизученным. Такое обстоятельство отразилось на слабой разработке вопросов профилактики и лечения фиброзных заболеваний [7], особенно на ранних его сроках, в связи с чем актуализируется вопрос о возможности регуляции этого процесса.

На сегодня известны два антифибротических средства — пирфенидон и нинтеданиб, рекомендованные для лечения идиопатического фиброза легких [8, 9], которые для широкого круга пациентов пока не всегда доступны. Недавно было продемонстрировано антифибротическое действие более доступного соединения — окисленного декстрана с молекулярной массой 40 кДа (ОД-40) на модели спаечной болезни брюшины у крыс [10, 11]. По-

скольку действие ОД-40 приводило к снижению количества спаек и объемной плотности коллагеновых волокон в них [10], а также содержания общих гликозаминогликанов (ГАГ) и белковосвязанного гидроксипролина (белГОП) в сыворотке крови уже на 7-е сутки после моделирования спаечного процесса [11], невольно возник вопрос о возможности его использования для ранней профилактики фиброза при ОПЛ.

Как правило, моделируя ОПЛ, исследования ограничиваются изучением отдельных сторон его патогенеза в легких, поскольку предполагается исключительное действие ЛПС на органы дыхания и не рассматривается реакция на другие органы.

С учетом вышесказанного целью настоящего исследования заключалась в изучении метаболизма ВКМ в легких, печени и селезенке мышей при интраназальном введении ЛПС и ингаляции ОД-40.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполняли на двухмесячных мышах линии ICR ($n = 21$), полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Россия). Во время двухнедельного карантина и на протяжении исследования животные находились в стандартных условиях вивария, имели свободный доступ к воде и корму. Соблюдались все принципы и правила работы с подопытными животными. Исследование получило одобрение локального этического комитета ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (протокол № 15 от 01.04.2024 г.).

В этом исследовании использовались только мыши-самцы, поскольку известно, что они более восприимчивы к повреждению легких, вызванному ЛПС [12]. Животных разделили случайным образом на три группы — в каждой по 7 мышей: 1-ю группу составили интактные животные, мышам 2-й и 3-й групп воспроизводилась модель ОПЛ однократным интраназальным введением ЛПС, полученным из *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich, США), в дозе 20 мкл (2 мг/мл в

0,9%-ном растворе NaCl) [13]. Мышам 3-й группы через 10 минут после введения 20 мкл ЛПС в течение 5 минут проводили ингаляции с помощью ультразвукового ингалятора «Комфорт-02-Smart» (Россия) 2%-ного водного раствора ОД-40 из расчета 20 мкл на животное [14]. Через 24 часа животных выводили из эксперимента под легким эфирным наркозом путем дислокации шейных позвонков.

Собирали кровь для получения сыворотки. Выделяли печень, легкие и селезенку, готовили 10%-ные гомогенаты. Гомогенаты и сыворотку крови хранили при -70°C . Определяли содержание сульфатированных ГАГ (сГАГ) [15], свободного ГОП (свГОП) и белГОП, в сыворотке крови — дополнительно пептидосвязанный ГОП (пепГОП) согласно описанию [16]. Методами ИФА оценивали содержание гипоксия-индуцибельного фактора-1 α (HIF-1 α), гиалуронансинтазы 2 (HAS2), эластина согласно инструкции производителя (ABclonal Biotechnology Co., Ltd, Китай).

О регуляции метаболизма ВКМ судили по суммарной активности матриксных металлопротеиназ (ММП) [17], активности гиалуронидаз [18] и $\alpha 2$ -макроглобулина ($\alpha 2$ -МГ) [19], содержанию тканевых ингибиторов металлопротеиназ — ТИМП-1 и ТИМП-2 (Abscam Co., США). Активность гиалуронидаз, ММП, $\alpha 2$ -МГ, содержание сГАГ, фракций ГОП, HIF-1 α , HAS2, эластина и ТИМП в органах пересчитывали на белок, измеренный по методу Bradford.

При выполнении работы использовали оборудование ЦКП «Современные оптические системы» и ЦКП «Спектрометрические измерения» ФИЦ ФТМ.

Для статистической обработки полученных результатов использовали пакет прикладных программ Statistica v. 10,0 (StatSoft Inc., США). В связи с тем, что в большинстве случаев распределение признаков в выборках не подчинялось закону нормального распределения использовали непараметрический метод: учитывали медиану (Me), нижний и верхний квартили (Q_{25} ; Q_{75}). Для проверки статистической гипотезы разности значений

для двух независимых переменных использовали U-критерий Манна – Уитни. Критическим уровнем значимости при проверке статистической гипотезы принимали $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ответная реакция компонентов ВКМ на введение ЛПС и ОД-40 оказалась различной в изу-

ченных органах. В легких мышей 2-й группы отмечено увеличение содержание сГАГ, эластина, фракций ГОП, которое можно связать с ростом активности ММП и содержания ТИМП-1 и ТИМП-2, отражающих активацию метаболизма основных компонентов ВКМ, с развитием фиброэластогенеза (табл.). Наряду с этим повышенное содер-

жание HAS2 позволяет ожидать и активацию синтеза гиалуронана, происходящего при нарастании гипоксии, о чем свидетельствовало повышенное содержание HIF-1 α в 1,8 раза относительно данных 1-й группы.

Активность ММП, содержание сГАГ и ТИМП-1 в 3-й группе оказались сниженными относительно

Таблица

Содержание основных компонентов ВКМ и отдельные ферменты контроля обмена в органах при введении ОД-40 мышам с ЛПС-индуцированным воспалением, Ме (Q25; Q75)

Table

The content of the main components of ECM and individual enzymes for controlling metabolism in organs when administered to OD-40 mice with LPS-induced inflammation, Me (Q25; Q75)

Показатель Parameter	Орган Organ	Интактные мыши (1-я группа, n = 7) Intact mice (1 st group, n = 7)	ЛПС (2-я группа, n = 7) LPS (2 nd group, n = 7)	ЛПС + ОД (3-я группа, n = 7) LPS + OD (3 ^d group, n = 7)	p
сГАГ, мкг/мг белка sGAG, $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein	Печень Liver	0.98 (0.88; 1.34)	0.77 (0.73; 1.96)	0.73 (0.63; 0.87)	1-3 = 0.035
	Легкие Lung	0.93 (0.65; 0.94)	2.44 (1.55; 2.59)	0.85 (0.43; 1.47)	1-2 = 0.002 2-3 = 0.003
	Селезенка Spleen	2.54 (1.79; 3.19)	2.44 (1.93; 3.91)	1.15 (0.85; 1.78)	1-3 = 0.012 2-3 = 0.015
HIF-1 α , пг/мг белка HIF-1 α , pg/mg protein	Печень Liver	1158.25 (1148.78; 1230.10)	1204.88 (1135.70; 1258.79)	634.22 (589.97; 681.27)	1-3 = 0.0005 2-3 = 0.0005
	Легкие Lung	176.99 (139.25; 191.74)	318.88 (258.11; 377.55)	255.16 (185.84; 520.16)	1-2 = 0.004 1-3 = 0.018
	Селезенка Spleen	26.47 (25.00; 27.98)	29.78 (28.78; 30.10)	11.80 (11.77; 12.30)	1-2 = 0.0005 1-3 = 0.0005 2-3 = 0.0005
HAS2, пг/мг белка HAS2, pg/mg protein	Печень Liver	6887.12 (6377.10; 7221.20)	7397.94 (5761.65; 8266.78)	3687.32 (3071.78; 4351.03)	1-3 = 0.0005 2-3 = 0.0005
	Легкие Lung	255.10 (213.86; 306.78)	591.72 (479.35; 765.31)	361.36 (327.43; 806.45)	1-2 = 0.002 1-3 = 0.002
	Селезенка Spleen	54.12 (46.77; 57.18)	82.32 (74.70; 89.29)	27.89 (25.45; 31.37)	1-2 = 0.001 1-3 = 0.0005 2-3 = 0.0005
Эластин, нг/мг белка Elastin, ng/mg protein	Печень Liver	66.33 (51.02; 112.90)	48.22 (38.05; 94.35)	26.28 (20.94; 36.01)	1-3 = 0.002 2-3 = 0.004
	Легкие Lung	0.88 (0.73; 0.97)	1.93 (1.12; 2.09)	1.14 (0.94; 2.10)	1-2 = 0.005 1-3 = 0.047
	Селезенка Spleen	0.24 (0.16; 1.21)	0.13 (0.09; 0.26)	0.06 (0.04; 0.07)	1-3 = 0.003 2-3 = 0.006
Свободный гидроксипролин, мкг/ мг белка Free hydroxyproline, $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein	Печень Liver	3.79 (3.10; 4.92)	3.33 (2.44; 7.09)	3.16 (2.63; 3.35)	-
	Легкие Lung	2.66 (1.93; 2.94)	3.93 (2.94; 4.97)	3.35 (3.25; 7.16)	1-2 = 0.028 1-3 = 0.029
	Селезенка Spleen	2.44 (1.75; 3.24)	4.40 (2.94; 5.65)	2.73 (2.14; 4.00)	1-2 = 0.023 2-3 = 0.033
Белковосвязанный гидроксипролин, мкг/мг белка Protein-bound hydroxyproline, $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein	Печень Liver	4.62 (2.63; 5.80)	3.51 (2.63; 7.18)	2.56 (1.99; 2.83)	2-3 = 0.030
	Легкие Lung	1.47 (1.28; 1.85)	3.39 (2.63; 4.51)	2.80 (1.69; 4.90)	1-2 = 0.001 1-3 = 0.027
	Селезенка Spleen	4.22 (3.40; 4.91)	3.71 (3.32; 5.65)	2.97 (1.96; 3.35)	1-3 = 0.017 2-3 = 0.023

Активность α T-макроглобулина, ИЕ/ мг белка α T-Macroglobulin activity, IU/mg protein	Печень Liver	0.44 (0.32; 0.63)	0.23 (0.08; 0.42)	0.09 (0.04; 0.12)	1-2 = 0.033 1-3 = 0.0003 2-3 = 0.049
	Легкие Lung	0.17 (0.17; 0.22)	0.14 (0.09; 0.33)	0.16 (0.09; 0.34)	–
	Селезенка Spleen	0.19 (0.17; 0.24)	0.20 (0.15; 0.26)	0.11 (0.08; 0.14)	1-3 = 0.006 2-3 = 0.014
Активность ММП, μ М МСА/мин/мг белка MMP activity μ M MCA/min/mg protein	Печень Liver	4.57 (3.23; 8.53)	4.35 (2.89; 5.85)	4.18 (2.38; 4.82)	–
	Легкие Lung	3.94 (2.12; 5.51)	9.13 (5.78; 13.40)	3.34 (1.88; 4.57)	1-2 = 0.003 2-3 = 0.002
	Селезенка Spleen	6.68 (5.29; 8.35)	5.19 (2.55; 5.78)	2.51 (1.17; 5.02)	1-3 = 0.005 2-3 = 0.040
ТИМП-1, пг/мг белка TIMP-1, pg/mg protein	Печень Liver	104.59 (96.94; 107.64)	100.81 (95.87; 112.90)	46.63 (44.25; 56.05)	1-3 = 0.0005 2-3 = 0.0005
	Легкие Lung	45.72 (41.36; 74.77)	77.11 (61.95; 120.97)	47.58 (42.77; 92.74)	1-2 = 0.025 2-3 = 0.048
	Селезенка Spleen	62.36 (41.30; 71.43)	67.47 (41.30; 68.88)	34.61 (24.84; 41.30)	1-3 = 0.005 2-3 = 0.015
ТИМП-2, пг/мг белка TIMP-2, pg/mg protein	Печень Liver	1683.67 (1533.92; 1941.75)	589.97 (530.97; 685.48)	442.48 (442.48; 516.22)	1-2 = 0.0005 1-3 = 0.0005 2-3 = 0.005
	Легкие Lung	405.60 (340.63; 514.02)	688.78 (412.98; 727.04)	412.98 (398.23; 725.81)	1-2 = 0.029
	Селезенка Spleen	619.15 (420.35; 739.80)	669.88 (410.03; 717.74)	284.97 (244.01; 410.03)	1-3 = 0.003 2-3 = 0.004

Примечание: ЛПС – липополисахарид, ОД-40 – окисленный декстран 40 кДа, сГАГ – сульфатированные гликозаминогликаны, HIF-1 α – гипоксия-индуцибельный фактор-1 α , HAS2 – гиалуронансинтаза 2, ММП – матриксная металлопротеиназа, ТИМП – тканевой ингибитор металлопротеиназы. При $p > 0,05$ между любыми двумя группами результат p в таблицу не вносился.

Note: LPS – lipopolysaccharide, OD-40 – oxidized dextran 40 kDa, sGAG – sulfated glycosaminoglycans, HIF-1 α – hypoxia-inducible factor 1 α , HAS2 – hyaluronan synthase 2, MMP – matrix metalloproteinase, TIMP – tissue inhibitor of metalloproteinase. At $p > 0.05$ between any two groups, the result of p was not included in the table.

данных мышей 2-й группы и не отличались от 1-й (табл.). При этом другие показатели, такие как HIF-1 α , HAS2, эластин, свГОП, белГОП, не отличались от данных 2-й группы, но оставались выше показателей 1-й, отражая тем самым наличие условий для пролонгирования фиброза в органе.

В печени мышей 2-й группы два показателя: ТИМП-2 и активность α 2-МГ – были снижены относительно данных 1-й группы (табл.). Наметилась тенденция к увеличению содержания HIF-1 α . По-видимому, введение ЛПС не стало достаточным стимулом для ремоделирования ВКМ печени. У мышей 3-й группы оказались сниженными содержание HIF-1 α , HAS2, эластина, ТИМП-1, ТИМП-2 и активность α 2-МГ относительно данных 1-й и 2-й групп. Кроме того, в этой группе уровень белГОП был ниже, чем во 2-й, а содержание сГАГ меньше относительно данных 1-й. Введение ОД-40 способствовало

дальнейшему снижению содержания ТИМП-2 и активности α 2-МГ.

В селезенке мышей 2-й группы повышенными оказались показатели HIF-1 α , HAS2 и свГОП относительно данных 1-й группы, что свидетельствует об усилении деградации коллагенов в условиях гипоксии (табл.). У мышей 3-й группы отмечено снижение содержания сГАГ, эластина, белГОП, ТИМП-1 и ТИМП-2, HIF-1 α , HAS2, активности α 2-МГ и ММП по сравнению с данными 1-й и 2-й групп. Уровень свГОП был ниже, чем во 2-й группе и не отличался от 1-й. В этой группе животных на фоне снижения активности ферментов, контролирующих обмен ВКМ, снижалось содержание компонентов, формирующих фиброзную ткань.

В сыворотке крови у мышей 2-й группы увеличилась активность ММП (223,14 (183,45; 243,16) мкМ МСА/мл/мин, $p = 0,0005$) и содержание пепГОП (16,10 (13,97;

16,44) мкг/мл, $p = 0,0005$) относительно 1-й (125,11 (112,25; 126,71) мкМ МСА/мл/мин и 9,68 (9,60; 9,70) мкг/мл соответственно). У животных 3-й группы отмечено снижение активности гиалуронидаз (8,45 (8,04; 9,54) мкМ NAG/мин/л) и содержания всех фракций ГОП (свГОП 21,30 (19,56; 22,40), пепГОП (10,00 (9,46; 10,40), белГОП (17,80 (17,51; 18,00) мкг/мл), $p < 0,050$ по сравнению с данными 2-й группы (активность гиалуронидаз 10,55 (10,05; 11,40) мкМ NAG/мин/л, свГОП 24,86 (23,50; 29,60), пепГОП (16,10 (13,97; 16,44), белГОП (19,21 (19,11; 19,40) мкг/мл, соответственно), что соответствует изменениям в селезенке.

Таким образом, результаты исследования показали, что при введении ЛПС мышам через 24 часа в легких происходит избыточное отложение коллагенов, повышение содержания HAS2, сГАГ, HIF-1 α , эластина и активация ферментов. В это же время в печени и селезенке

изменения были незначительными (снижение активности $\alpha 2$ -МГ и содержания ТИМП-2 в печени; рост содержания HIF-1 α , HAS2 и увеличение свГОП в селезенке).

Однако после ингаляции ОД-40 наиболее выраженным оказалось ремоделирование ВКМ в селезенке, проявившееся в снижении всех изучаемых показателей, которые отражают уменьшение тканевой гипоксии, снижении интенсивности обмена коллагенов, приводящее в целом к уменьшению фиброза. В печени в условиях снижения ингибиторов протеаз – специфических (ТИМП-1 и ТИМП-2) и неспецифических ($\alpha 2$ -МГ), был подавлен синтез коллагенов, тогда как деградация их не изменялась, поскольку активность ММП и содержание свГОП сохранялись на уровне 2-й группы. В легких введение ОД-40 привело к снижению активности ММП и содержания ТИМП-1 до значений контрольной группы, тем не менее, интенсивность обмена коллагенов оставалась на уровне группы ЛПС.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования показали, что однократное интраназальное введение ЛПС позволило смоделировать ОПЛ и зафиксировать признаки фиброза в легких на раннем сроке (через 24 часа). Об этом свидетельствует повышенное содержание белГОП, отражающее количество синтезированного белка коллагена. Одновременно увеличенное содержание свГОП свидетельствует об ускоренном метаболизме коллагенов в легких мышей в группе ЛПС.

В другом исследовании при интрахеальном введении ЛПС также через 24 часа были отмечены увеличение содержания коллагеновых волокон III типа и утолщение альвеолярного интерстиция, цитоплазматическая деструкция пневмоцитов II типа, иммуногистохимически обнаружено повышение экспрессии ММП-9 в нейтрофилах [2]. Одновременно авторы отметили изменения механических и морфометрических параметров легких (резистивного и вязкоупругого давления, статической эластичности). В исследовании S.T. Tsikis

и соавт. [20] после интрахеального введения ЛПС мышам-самцам C57BL/6J через 24 часа было выявлено снижение экспрессии васкулоэндотелиального фактора роста в легких, переносимости физических нагрузок и работоспособности, которые сохранялись до 4 недель.

Интраназальное введение ЛПС индуцировало ремоделирование других компонентов ВКМ: эластина и ГАГ (увеличение сГАГ, вероятно, связанное с повышением содержания HAS2) (табл.). Есть данные о значительном снижении экспрессии гена фибронектина, но увеличение содержания коллагена III типа в легких крыс Sprague-Dawley получено через 24 часа после интрахеального введения ЛПС [21]. На мышинной модели ОПЛ, индуцированного ЛПС, уже через 24 часа была повышена экспрессия люмикана в стенках альвеол и эпителии дыхательных путей, увеличено содержание люмикана, фибронектина и фактора некроза опухоли α , $\alpha 1$ коллаген III типа [COL3A1] в жидкости бронхоальвеолярного лаважа [22]. Содержание люмикана коррелировало с провоспалительными и профибротическими уровнями цитокинов в жидкости бронхоальвеолярного лаважа.

В легких отмечено двукратное увеличение содержания HIF-1 α (табл.). Повышенную экспрессию мРНК HIF-1 α и воспалительных цитокинов в легочной ткани наблюдали и раньше [23]. Известно, что ЛПС запускает воспалительную реакцию в легких [1, 22], отражаясь на дыхательной функции крови. Сообщалось, что внутривенное введение ЛПС телятам буйволов вызывает нарушение кислотно-основного состояния крови, которое проявлялось артериальной гипоксемией и венозной гипероксией, снижением оксигенации артериальной и увеличением оксигенации венозной крови [24]. Эти данные свидетельствуют о развитии дыхательной (газообменной) недостаточности в легких и тканевой гипоксии. Поскольку HIF-1 α экспрессируется в условиях гипоксии, его увеличение указывает на раннее развитие тканевой гипоксии (уже через 24 часа) после введения ЛПС.

Имеются данные, свидетельствующие о том, что развитию гипоксии способствует также отмеченное в легких через 12 часов после инъекции ЛПС выраженное утолщение альвеолярной перегородки, которое следует рассматривать как результат интерстициального фиброза и коллапса альвеолярного пространства [5].

На более жесткой модели ЛПС-индуцированного ОПЛ, воспроизведенного на крысах трехкратным введением ЛПС (через эндотрахеальную трубку, внутрибрюшинно и через эндотрахеальную трубку), уже на 1-е сутки была обнаружена повышенная экспрессия α -гладкомышечного актина, белка, маркера активации миофибробластов, интенсивное окрашивание коллагеновых волокон, на 3-и сутки – увеличение содержания ГОП в легких [1].

Незначительные изменения, обнаруженные в метаболизме ВКМ печени и селезенке при интраназальном введении ЛПС, можно связать с отсутствием непосредственного воздействия ЛПС, тогда как в легких биохимические процессы, участвующие в фиброэластогенезе, способны быстро реагировать на индуктор воспаления и фиброза. Как отмечалось выше, прямых данных о влиянии ЛПС на обмен ВКМ в печени и селезенке не выявлено. Однако есть сообщения, что ЛПС подвергается деацилированию в печени и селезенке ацилоксиацилгидролазой, эндогенной липазой, которая избирательно удаляет вторичные жирные ацильные цепи, необходимые для распознавания ЛПС его сигнальным рецептором млекопитающих, ко-рецепторным миелидным дифференцировочным белком 2 (MD-2-TLR4) [25]. Авторы показали, что клетки Купфера продуцируют ацилоксиацилгидролазу, необходимую для деацилирования ЛПС в печени *in vivo*. Именно деацилирование, опосредованное ацилоксиацилгидролазой, по мнению авторов, является ранее недооцененным механизмом, который предотвращает длительные воспалительные реакции на грамотрицательные бактерии и ЛПС в печени.

Разную реакцию органов на введение ЛПС в некоторой степени

объясняют результаты, полученные в эксперименте со спленэктомизированными крысами [26]. Через 12 часов после внутривенного введения ЛПС (5 мг/кг) у ложнопериорированных крыс наблюдали снижение концентрации АТФ и перекиси липидов в ткани печени и увеличение концентрации лактатдегидрогеназы в сыворотке крови по сравнению с данными спленэктомизированных животных. При этом средняя концентрация белка в жидкости бронхоальвеолярного лаважа не отличалась между группами, что позволило авторам сделать вывод о том, что селезенка не влияет на повреждение легких.

Более подробная информация о сложных межклеточных и межорганных взаимосвязях, направленных на борьбу с инфекцией и защиту тканей, представлена в ряде работ [27, 28].

В нашем исследовании после ингаляции ОД-40 в печени и селезенке уменьшалось содержание HIF-1 α , в легких наметилась тенденция к снижению. Эти результаты перекликаются с работой [24], где внутривенное введение 7,2%-ного раствора NaCl в дозе 4 мл/кг массы тела в течение 6,5 мин с последующим введением декстрана-40 в дозе 10 мл/кг массы тела через 120 и 300 минут после внутривенного введения ЛПС телятам буйволов значительно увеличивало оксигенацию артериальной крови и уменьшало гипоксемию. По-ви-

димому, ОД-40 в нашем случае проявил антигипоксическое действие, регулируя HIF-1 α . Однако для подтверждения этой гипотезы необходимы целенаправленные исследования с ОД-40.

Известно, что декстран-40 проявляет антиоксидантную, а также иммуномодулирующую активность, поскольку он ингибирует реакции перекисного окисления липидов и стимулирует пролиферацию макрофагов на выработку оксида азота [29]. Результаты настоящего исследования позволяют предполагать, что ОД-40 может проявлять антигипоксическое и антифибротическое действие у мышей через 24 часа после индукции ЛПС-индуцированного воспаления.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования показали возможность моделирования ОПЛ у мышей щадящим интраназальным способом введения ЛПС. Признаки развития фиброза в легких наблюдались уже через 24 часа после индукции. При этом в печени и селезенке изменения метаболизма ВКМ были незначительные.

В легких мышей ингаляционное введение ОД-40 привело к нормализации активности ММП, содержания сГАГ и ТИМП-1. Однако такие показатели, как HIF-1 α , HAS2, эластин, свГОП, белГОП, соответствовали данным ЛПС-инфицированных мышей, оставаясь выше контроля, что можно рассматри-

вать как возможность дальнейшего прогрессирования фиброза в органе. В печени был снижен уровень HIF-1 α , HAS2, эластин, белГОП, ТИМП-1, ТИМП-2 и активности α 2-МГ, отражающий снижение синтеза коллагенов. В селезенке была ингибирована активность ферментов, контролирующих обмен ВКМ, что привело к снижению содержания компонентов, формирующих фиброзную ткань.

При введении ОД-40 ЛПС-индуцированным мышам значимое уменьшение содержания HIF-1 α в печени и селезенке и тенденция к снижению в легких могут служить проявлением антигипоксического эффекта ОД-40. Антифибротическое действие ОД-40 в печени связано с подавлением синтеза коллагена, в селезенке — с замедлением обмена коллагенов. Для объяснения полученных результатов необходимы дополнительные исследования.

Информация о финансировании и конфликте интересов

Исследование выполнено в рамках государственного задания № 122032300155-4 с использованием оборудования ЦКП «Современные оптические системы» и ЦКП «Спектрометрические измерения» ФИЦ ФТМ.

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Li H, Du S, Yang L, Chen Y, Huang W, Zhang R, et al. Rapid pulmonary fibrosis induced by acute lung injury via a lipopolysaccharide three-hit regimen. *Innate Immun.* 2009; 15(3): 143-154. DOI: 10.1177/1753425908101509
2. Santos FB, Nagato LK, Boechem NM, Negri EM, Guimarães A, Capelozzi VL, et al. Time course of lung parenchyma remodeling in pulmonary and extrapulmonary acute lung injury. *J. Appl. Physiol.* 2006; 100(1): 98-106. DOI: 10.1152/jappphysiol.00395.2005
3. Mohamed HA, Elbastawisy YM, Elsaed WM. Attenuation of lipopolysaccharide-induced lung inflammation by ascorbic acid in rats: Histopathological and ultrastructural study. *SAGE Open Med.* 2019; 7: 2050312119828260. DOI: 10.1177/2050312119828260
4. Du Y, Zhu P, Wang X, Mu M, Li H, Gao Y, et al. Pirfenidone alleviates lipopolysaccharide-induced lung injury by accentuating BAP31 regulation of ER stress and mitochondrial injury. *J Autoimmun.* 2020; (112): 102464. DOI: 10.1016/j.jaut.2020.102464
5. Chen H, Ma N, Song X, Wei G, Zhang H, Liu J, et al. Protective effects of N-acetylcysteine on lipopolysaccharide-induced respiratory inflammation and oxidative stress. *Antioxidants (Basel).* 2022; 11(5): 879. DOI: 10.3390/antiox11050879
6. Girsh AO, Mishchenko SV, Stepanov SS, Klementyev AV, Leyderman IN, Stukanov MM, et al. Organ and system dysfunctions in patients with acute respiratory distress syndrome. *Polytrauma.* 2022; (2): 18-25. Russian (Гирш А.О., Мищенко С.В., Степанов С.С., Клементьев А.В., Лейдерман И.Н., Стуканов М.М. и др. Дисфункция органов и систем у больных с острым респираторным дистресс-синдромом //Политравма. 2022. № 2. С. 18-25.) DOI: 10.24412/1819-1495-2022-2-18-25
7. Wu KK. Control of tissue fibrosis by 5-methoxytryptophan, an innate anti-inflammatory metabolite. *Front Pharmacol.* 2021; (12): 759199. DOI: 10.3389/fphar.2021.759199
8. Lehmann M, Buhl L, Alsafadi HN, Klee S, Hermann S, Mutze K, et al. Differential effects of Nintedanib and Pirfenidone on lung alveolar epithelial cell function in ex vivo murine and human lung tissue cultures of pulmonary fibrosis. *Respir Res.* 2018; 19(1): 175. DOI: 10.1186/s12931-018-0876-y
9. Sugino K, Ono H, Watanabe N, Ando M, Tsuboi E, Homma S, et al. Efficacy of early antifibrotic treatment for idiopathic pulmo-

- nary fibrosis. *BMC Pulm Med.* 2021; 21(1): 218. DOI: 10.1186/s12890-021-01595-3
10. Karpov MA, Shkurupy VA, Troitskii AV. The study of efficiency of the approach to prevent the adhesions in the abdominal cavity of rats. *Bul. Exp Biol Med.* 2021; 171(4): 416-420. DOI: 10.1007/s10517-021-05240-1
 11. Kim LB, Putyatina AN, Russkikh GS, Komkov NA. Effect of oxidized dextran on the adhesive process in rats. *Polytrauma.* 2023; (1): 83-88. Russian (Ким Л.Б., Путятина А.Н., Русских Г.С., Комков Н.А. Влияние окисленного декстрана на спаечный процесс у крыс // Политравма. 2023. № 1. С. 83-88.) DOI: 10.24412/1819-1495-2023-1-83-88
 12. Card JW, Carey MA, Bradbury JA, DeGraff LM, Morgan DL, Moorman MP, et al. Gender differences in murine airway responsiveness and lipopolysaccharide-induced inflammation. *J Immunol.* 2006; 177(1); 621-630. DOI: 10.4049/jimmunol.177.1.621
 13. Katelnikova AE, Kryshen KL, Makarova MN, Makarov VG. Experimental animal models of acute bronchitis. *Laboratory Animals for Science.* 2019; (1): 127-151. Russian (Кательникова А.Е., Крышень К.Л., Макарова М.Н., Макаров В.Г. Экспериментальные модели острого бронхита на животных //Лабораторные животные для научных исследований. 2019. № 1. С. 127-151.) DOI: 10.29926/2618723X-2019-01-10
 14. Means for the prevention of interstitial pneumonia: patent for invention No. 2747550, May 6, 2021. AV Troitsky, TN Bystrova, AA Starostenko, AN Kopylov; applicant and patentee: Federal Research Center for Basic and Translational Medicine; application from November 24, 2011, published on May 6, 2021. Bulletin No. 13; 1-10 p. Russian (Средство для профилактики интерстициальной пневмонии: патент на изобретение № 2747550 от 06.05.2021 г. /А.В. Троицкий, Т.Н. Быстрова, А.А. Старостенко, А.Н. Копылов; заявитель и патентообладатель ФИЦ ФТМ; заявл. 24.11.2020, опуб. 06.05.2021. Бюлл. № 13. С. 1-10.)
 15. Oke SL, Hurtig MB, Keates RA, Wright JR, Lumsden JH. Assessment of three variations of the 1,9-dimethylmethylene blue assay for measurement of sulfated glycosaminoglycan concentrations in equine synovial fluid. *Am J Vet Res.* 2003; 64(7): 900-906. DOI: 10.2460/ajvr.2003.64.900
 16. Putyatina AN, Kim LB, Russkikh GS. Assessing the collagen metabolism in experimental BCG-induced tuberculous inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series.* 2024; 21(1): 62-67. Russian (Путятина А.Н., Ким Л.Б., Русских Г.С. Оценка метаболизма коллагенов при экспериментальном БЦЖ-индуцированном туберкулезном воспалении //Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. 2024. Т. 21, № 1. С. 62-67.) DOI: 10.29235/1814-6023-2024-21-1-62-67
 17. de Grauw JC, van de Lest CH, van Weeren PR. Inflammatory mediators and cartilage biomarkers in synovial fluid after a single inflammatory insult: a longitudinal experimental study. *Arthritis Res Ther.* 2009; 11(2): R35. DOI: 10.1186/ar2640
 18. Isman FK, Kucur M, Baysal B, Ozkan F. Evaluation of serum hyaluronic acid level and hyaluronidase activity in acute and chronic hepatitis C. *J Int Med Res.* 2007; 35(3): 346-352. DOI: 10.1177/147323000703500309
 19. Yarovaya GA., Dotsenko VL, Pashintseva LP, Nartikova VF, Paskhina TS. Testing the activity of α 1-antitrypsin and α 2-macroglobulin in human blood plasma by a unified enzymatic method. *Clinical Biochemistry Methods. Textbook.* VN Orekhovich, eds., Moscow, TSOLIUV Publ., 1982, 22-26 p. Russian (Яровая Г.А., Доценко В.Л., Пашинцева Л.П., Нартикова В.Ф., Пасхина Т.С. Определение активности α 1-антитрипсина и α 2-макроглобулина в плазме крови человека унифицированным энзиматическим методом // Методы клинической биохимии: учебное пособие /под ред. В.Н. Ореховича. Москва: ЦОЛИУВ, 1982. С. 22-26.)
 20. Tsikis ST, Fligor SC, Hirsch TI, Pan A, Yu LJ, Kishikawa H, et al. Lipopolysaccharide-induced murine lung injury results in long-term pulmonary changes and downregulation of angiogenic pathways. *Sci Rep.* 2022; 12(1): 10245. DOI: 10.1038/s41598-022-14618-8
 21. Samoilova EV, Chepurnova DA, Fesenko AG, Korotaeva AA. Extracellular matrix components of rat lungs after direct and indirect lung injury. *Bull Exp Bio. Med.* 2022; 172(4): 407-409. DOI: 10.1007/s10517-022-05403-8
 22. Wang K, Wang Y, Cao Y, Wang H, Zhou Y, Gao L, et al. Lumican is elevated in the lung in human and experimental acute respiratory distress syndrome and promotes early fibrotic responses to lung injury. *J Transl Med.* 2022; 20(1): 392. DOI: 10.1186/s12967-022-03597-z
 23. Yeh CH, Cho W, So EC, Chu CC, Lin MC, Wang JJ et al. Propofol inhibits lipopolysaccharide-induced lung epithelial cell injury by reducing hypoxia-inducible factor-1alpha expression. *Br J Anaesth.* 2011; 106(4): 590-599. DOI: 10.1093/bja/aer005
 24. Singh DV, Sodhi SPS. Effect of whole blood transfusion in combination with plasmex-D-40 and hypertonic saline solution on acid-base and blood gas status of endotoxemic buffalo calves. *Indian Journal of Animal Sciences.* 2008; 78(7): 700-705.
 25. Shao B, Lu M, Katz SC, Varley AW, Hardwick J, Rogers TE, et al. A host lipase detoxifies bacterial lipopolysaccharides in the liver and spleen. *J Biol Chem.* 2007; 282(18): P. 13726-13735. DOI: 10.1074/jbc.M609462200
 26. Hiraoka E, Nonami T, Kurokawa T, Kobayashi H, Takagi H. The role of the spleen in endotoxin-induced liver injury. *Liver.* 1995; 15(1): 35-38. DOI: 10.1111/j.1600-0676.1995.tb00104.x
 27. Quinton LJ, Walkey AJ, Mizgerd JP. Integrative physiology of pneumonia. *Physiol Rev.* 2018; 98(3): 1417-1464. DOI: 10.1152/physrev.00032.2017
 28. Fonseca MT, Moretti EH, Marques LMM, Machado BF, Brito CF, Guedes JT, et al. A leukotriene-dependent spleen-liver axis drives TNF production in systemic inflammation. *Sci Signal.* 2021; 14(679): eabb0969. DOI: 10.1126/scisignal.abb0969
 29. Soeiro VC, Melo KR, Alves MG, Medeiros MJ, Grilo ML, Almeida-Lima J, et al. Dextran: influence of molecular weight in antioxidant properties and immunomodulatory potential. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(8): 1340. DOI: 10.3390/ijms17081340

Сведения об авторах:

Ким Л.Б., д.м.н., главный научный сотрудник, руководитель группы биохимии соединительной ткани ФГБНУ ФИЦ ФТМ, г. Новосибирск, Россия.

Information about authors:

Kim L.B., MD, PhD, chief researcher, head of connective tissue biochemistry group, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia.

Троицкий А.В., к.м.н., ведущий научный сотрудник, руководитель лаборатории биосовместимых наночастиц, наноматериалов и средств адресной доставки ФГБНУ ФИЦ ФТМ, г. Новосибирск, Россия.

Путятина А.Н., к.м.н., научный сотрудник группы биохимии соединительной ткани ФГБНУ ФИЦ ФТМ, г. Новосибирск, Россия.

Русских Г.С., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории медицинской биотехнологии ФГБНУ ФИЦ ФТМ, г. Новосибирск, Россия.

Быстрова Т.Н., научный сотрудник лаборатории биосовместимых наночастиц, наноматериалов и средств адресной доставки ФГБНУ ФИЦ ФТМ, г. Новосибирск, Россия.

Адрес для переписки:

Ким Лена Борисовна, ул. Тимакова 2, г. Новосибирск, Россия, 630060

Тел: +7 (383) 274-94-97

E-mail: lbkim@frcftm.ru

Статья поступила в редакцию: 05.04.2023

Рецензирование пройдено: 07.05.2024

Подписано в печать: 01.06.2024

Troitskiy A.V., candidate of medical sciences, leading researcher, head of laboratory of biocompatible nanoparticles, nanomaterials and means of targeted delivery, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia.

Putyatina A.N., candidate of medical sciences, researcher of connective tissue biochemistry group, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia.

Russkikh G.S., candidate of biological sciences, senior researcher of laboratory of medical biotechnology, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia.

Bystrova T.N., researcher of laboratory of biocompatible nanoparticles, nanomaterials and means of targeted delivery, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia.

Address for correspondence:

Kim Lena Borisovna, Timakova St., 2, Novosibirsk, Russia, 630060

Tel: +7 (383) 274-94-97

E-mail: lbkim@frcftm.ru

Received: 05.04.2023

Review completed: 07.05.2024

Passed for printing: 01.06.2024

