

ИНТРАНАЗАЛЬНОЕ ВВЕДЕНИЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА КРЫСАМ SPRAGUE-DAWLEY КАК БИОМОДЕЛЬ ОСТРОГО РЕСПИРАТОРНОГО ДИСТРЕСС-СИНДРОМА

В. В. Киселева¹✉, П. А. Вишнякова², А. М. Косырева³, Е. Ю. Кананыхина³, И. И. Емельянов¹, А. В. Ельчанинов³, Т. Х. Фатхудинов³

¹ Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Москва, Россия

² Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова, Москва, Россия

³ Российский научный центр хирургии имени Б. В. Петровского, Москва, Россия

Для острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) характерны высокая частота летальных исходов и отсутствие патофизиологической терапии. Для воспроизведения у животных ОРДС используют интратрахеальное введение липополисахарида (ЛПС). Ограничением метода является необходимость использования оборудования для выполнения интубации и контроля за состоянием животного. Целью исследования было оценить возможность использования интраназального введения ЛПС вместо интратрахеального и определить его оптимальную дозу. ЛПС *E. coli* O111:B4 7,5 мг/кг или 15 мг/кг или NaCl 0,9% в объеме 150 мкл вводили 21 крысе Sprague-Dawley. Через 48 ч кровь из хвостовой вены отбирали для определения лейкоцитарной формулы и концентрации TNFα. Легкие извлекали для оценки сухого остатка (Wet/dry ratio), определения уровней экспрессии генов про- и противовоспалительных цитокинов методом ПЦР-PB, определения относительного количества CD68, CD86 и MHC II положительных клеток в ткани легкого методом проточной цитометрии. W/d ratio было выше при дозе 15 мг/кг массы тела ($p = 0,0228$, Ordinary one-way Anova). В крови содержание лимфоцитов было снижено ($p = 0,0019$, Ordinary one-way Anova), а нейтрофилов повышено ($p = 0,0021$, Ordinary one-way Anova) при обеих дозах введения. Количество CD86 ($p = 0,0014$, Ordinary one-way Anova) и MHC II положительных клеток ($p = 0,0050$, Ordinary one-way Anova) повышалось после введения ЛПС. Уровень экспрессии гена IL10 был значимо повышен при дозе 15 мг/кг ($p = 0,0024$, Ordinary one-way Anova), а IL4 ($p = 0,0194$, Ordinary one-way Anova) снижен при дозе 7,5 мг/кг. Таким образом, интраназальное введение ЛПС может быть использовано для воспроизведения ОРДС у крыс Sprague-Dawley. Высокая доза введения приводит к быстрому развитию воспалительных процессов в легких.

Ключевые слова: липополисахарид, ЛПС, крысы Sprague-Dawley, цитокин, модель на животных, ОРДС, уровень экспрессии

Финансирование: работа поддержана Российским научным фондом (номер гранта 24-25-00203).

Благодарности: авторы благодарят руководителя лаборатории патологии клетки НИИ морфологии человека имени А. П. Авцына к. б. н. Д. А. Арешидзе за измерение показателей общей формулы крови животных.

Вклад авторов: В. В. Киселева — дизайн и проведение эксперимента, анализ полученных результатов, написание статьи; П. А. Вишнякова — консультирование по вопросам проведения эксперимента, материальная база, редактирование; А. М. Косырева — консультирование по вопросам проведения эксперимента, редактирование; Е. Ю. Кананыхина, И. И. Емельянов — работа с животными; А. В. Ельчанинов — консультирование по вопросам проведения эксперимента, материальная база, редактирование; Т. Х. Фатхудинов — материальная база исследования.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом НИИ морфологии человека имени А. П. Авцына (протокол № 21 от 29 марта 2019 г.). Все манипуляции с животными проводили в соответствии с рекомендациями ARRIVE и Директивой ЕС 2010/63/EU о защите животных, используемых в научных целях.

✉ **Для корреспонденции:** Виктория Викторовна Киселева
ул. Опарина, д. 4, г. Москва, 117997, Россия; victoria.kurnosova.1991@gmail.com

Статья получена: 21.04.2025 **Статья принята к печати:** 06.05.2025 **Опубликована онлайн:** 20.05.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.027

Авторские права: © 2025 принадлежат авторам. **Лицензиат:** РНИМУ им. Н.И. Пирогова. Статья размещена в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

INTRANASAL LIPOPOLYSACCHARIDE ADMINISTRATION TO SPRAGUE-DAWLEY RATS AS A BIOMODEL OF ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME

Kiseleva VV¹✉, Vishnyakova PA², Kosyreva AM³, Kananykhina EYu³, Emelianov II¹, Elchaninov AV³, Fatkhudinov TH³

¹ Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

² Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

³ Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow, Russia

High fatality rate and the lack of pathophysiological therapy are typical for acute respiratory distress syndrome (ARDS). Intratracheal lipopolysaccharide (LPS) administration is used to model ARDS in animals. The method has the limitation of requiring the use of equipment to perform intubation and control the animal's state. The study aimed to assess the possibility of using intranasal LPS administration instead of intratracheal and determine the LPS optimal dose. A total of 150 mL of the *E. coli* O111:B4 LPS (7.5 mg/kg or 15 mg/kg) or 0.9% NaCl was administered to 21 Sprague-Dawley rats. After 48 h blood was collected from the tail vein to determine the white blood cell count and TNFα concentration. The lungs were retrieved to assess dry weight (wet/dry ratio) and to determine the expression of the genes encoding pro- and anti-inflammatory cytokines using real-time PCR. The relative counts of CD68-, CD86-, and MHC II-positive cells in the lung tissue were also evaluated using flow cytometry. The w/d ratio was higher when the dose of 15 mg/kg of body weight was used ($p = 0,0228$, ordinary one-way Anova). Blood lymphocyte counts were decreased ($p = 0,0019$, ordinary one-way Anova), and neutrophil counts were increased ($p = 0,0021$, ordinary one-way Anova) upon administration of both doses. The counts of CD86- ($p = 0,0014$, ordinary one-way Anova) and MHC II-positive cells ($p = 0,0050$, ordinary one-way Anova) increased after LPS administration. The IL10 gene expression was significantly increased upon administration of the dose of 15 mg/kg ($p = 0,0024$, ordinary one-way Anova), while the IL4 expression ($p = 0,0194$, ordinary one-way Anova) was decreased upon administration of the dose of 7.5 mg/kg. Thus, intranasal LPS administration can be used to model ARDS in the Sprague-Dawley rats. Administration of the high dose leads to the rapid development of inflammation in the lung.

Keywords: lipopolysaccharide, LPS, Sprague-Dawley rats, cytokine, animal model, ARDS, expression level

Funding: the study was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 24-25-00203).

Acknowledgements: the authors would like to thank D.A. Arshidze, C. Sci. Biol., Head of the Cellular Pathology Laboratory of the Avtsyn Institute of Human Morphology for performing the complete blood count test in animals.

Author contribution: Kiseleva VV — experimental design and procedure, analysis of the results, manuscript writing; Vishnyakova PA — advice on the experimental procedure, material resources, editing; Kosyreva AM — advice on the experimental procedure, editing; Kananykhina EYu, Emelianov II — animal handling; Elchaninov AV — advice on the experimental procedure, material resources, editing; Fatkhudinov TH — material resources for the study.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Avtsyn Institute of Human Morphology (protocol No. 21 dated 29 March 2019). Animals were handled in accordance to the ARRIVE guidelines and the Directive EC 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes.

✉ **Correspondence should be addressed:** Victoria V. Kiseleva
Oparina, 4, Moscow, 117997, Russia; victoria.kurnosova.1991@gmail.com

Received: 21.04.2025 **Accepted:** 06.05.2025 **Published online:** 20.05.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.027

Copyright: © 2025 by the authors. **Licensee:** Pirogov University. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Острое повреждение легких и его наиболее тяжелая форма — острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) — комплексное многофакторное заболевание. На сегодняшний день не существует патофизиологической терапии ОРДС, а лечение остается исключительно симптоматическим, что обуславливает актуальность изучения данной патологии [1]. Использование моделей на животных («животных моделей») — неотъемлемая часть как изучения патофизиологических процессов при развитии заболевания, так и оценки эффективности потенциальных лекарственных препаратов.

Эффективность воспроизведения ОРДС человека на «животной модели» оценивают по наличию основных морфологических изменений, характерных для патологии: наличию интра-альвеолярного отека; увеличению количества нейтрофилов в межальвеолярных перегородках; формированию гиалиновых мембран, приводящему к утолщению межальвеолярных перегородок; образованию микротромбов [2]. Степень выраженности этих изменений обычно оценивают через 24 ч, более длительные интервалы времени после введения ЛПС остаются малоизученными.

Для моделирования ОРДС используют разные виды животных от грызунов до человекообразных обезьян [3]. Чаще всего ОРДС моделируют на мышах и крысах ввиду их максимальной доступности и относительной простоты работы с ними. Выделяют несколько подходов к моделированию ОРДС: прямое и не прямое повреждение легких (интраназальное/интратрахеальное или внутривенное введение липополисахарида (ЛПС) стенки грамотрицательных бактерий), а также комбинированные модели.

ЛПС состоит из трех частей, определяющих его иммуногенность. Липид А «заякоривает» молекулу ЛПС в клеточной стенке грамотрицательных бактерий и через Core-полисахарид связывается с О-цепью на поверхности бактерий. Последние уникальны для каждой бактерии и лежат в основе серотипирования, исторически используемого для идентификации грамотрицательных бактерий. Считается, что бактерии, формирующие гладкие колонии, имеют менее пирогенную О-цепь, состоящую из повторяющихся дисахаридов, при этом ЛПС из бактерии без О-цепи наиболее иммуногенен.

Преимущество использования ЛПС для моделирования ОРДС состоит в относительной доступности и возможности стандартизации экспериментов. Однако стоит помнить, что препараты ЛПС часто содержат загрязняющие вещества, такие как бактериальные липопроотеины, которые могут влиять на биологические эффекты ЛПС.

При попадании в организм ЛПС их распознают толл-подобные рецепторы 4-го типа (Toll-like receptor 4, TLR4) на поверхности моноцитов, макрофагов и дендритных клеток. ЛПС-связывающий белок (lipopolysaccharide-binding protein, LBP) и CD14, являющиеся корецепторами при этом взаимодействии, способствуют активации MyD88 и TRIF-зависимых сигнальных путей [4]. Эти каскады реакций приводят к активации транскрипционных факторов NF- κ B / MAPK (mitogen-activated protein kinases) и IRF3 соответственно. В итоге стимулируется продукция провоспалительных цитокинов TNF α , IL6, IL1 β и интерферонов I типа, что опосредует развитие воспаления [4].

Моделирование ОРДС с использованием интратрахеального введения ЛПС на сегодняшний день применяют чаще, чем интраназальное введение, что обусловлено более целенаправленным воздействием на нижние дыхательные пути. Однако такой подход требует использования специального оборудования для

доставки ЛПС в нижние дыхательные пути через нос либо введения препарата через интратрахеальный разрез, что увеличивает время восстановления животного, а также несет риски заражения постоперационной раны. Это может увеличивать как сроки исследований, так и финансовые ресурсы, необходимые для их реализации. При этом есть данные о сравнимых эффектах обоих способов введения. Сравнение интраназального и интратрахеального способов введения ЛПС *Escherichia coli* O55:B5 было проведено на 12 самках мышей C57Bl/6 J исследователями из Канады под руководством Fatemeh Khadangi. Использовали одну дозу ЛПС с выведением животных из эксперимента через 24 ч. Авторы показали, что способ введения не повлиял на выраженность воспалительного процесса, однако при интраназальном введении наблюдалась меньшая вариабельность исследуемых показателей (количество клеток и общего белка в бронхоальвеолярном лаваже, сухой остаток легкого, уровень воспаления по гистологическим препаратам легкого и механические показатели вентиляции) внутри группы [5].

Другими авторами показано, что интратрахеальное введение ЛПС *E. coli* O111:B4 приводит к бронхопневмонии, увеличению количества макрофагов костномозгового происхождения и макрофагов с провоспалительным фенотипом в бронхоальвеолярном лаваже. Развитие локального воспалительного процесса в легких отражалось в высоких уровнях экспрессии провоспалительных цитокинов и низких уровнях экспрессии противовоспалительных цитокинов. На системном уровне отмечали высокий уровень С-реактивного белка в сыворотке крови [6].

Целью данной работы было оценить возможность использования интраназального введения ЛПС крысам Sprague-Dawley (SD) для воспроизведения ОРДС и сравнить изменения в легких крыс после однократного введения ЛПС в дозе 7,5 мг/кг или 15 мг/кг.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Интраназальное введение ЛПС

Самцы крыс породы Sprague-Dawley массой 250–280 г были получены из питомника «Столбовая» (Московская область, Россия). Животных содержали при естественном освещении, при температуре 20–22 °C и относительной влажности воздуха 60–70%. Животные имели свободный доступ к питьевой воде и брикетированным кормам (ООО «Лабораторснаб», Россия).

Исследование проводили на 21 животном. ЛПС *E. coli* O111:B4 (Sigma, США) 7,5 мг/кг или 15 мг/кг в объеме 150 мкл вводили интраназально под глубоким инъекционным наркозом (Золетил, Virbac, Франция) опытным животным. Контрольным крысам вводили 150 мкл физиологического раствора (NaCl 0,9%).

Легкие 10 крыс были извлечены через 48 ч после введения NaCl 0,9% (три особи), ЛПС в дозе 7,5 мг/кг массы тела (четыре особи) и ЛПС в дозе 15 мг/кг массы тела (три особи) для определения сухого остатка.

У девяти крыс (те же группы, по три особи в каждой) через 48 ч после введения ЛПС или NaCl 0,9% извлекали правое легкое. Небольшую его часть помещали в Фиксатор РНК («Евроген», Россия) с целью дальнейшего выделения РНК, постановки ОТ и ПЦР для оценки степени локального воспаления. Оставшееся легкое гомогенизировали, фиксировали и окрашивали для определения маркеров макрофагов CD68, CD86 и MHC II

Таблица 1. Ключевые реагенты и материалы, использованные в исследовании

Реагенты, приборы и ресурсы	Производитель	Номер в каталоге
Химические вещества, пептиды и рекомбинантные белки		
ЛПС <i>E.coli</i> O111:B4	Sigma-Aldrich, США	#LPS25
Ключевые коммерческие наборы		
Фиксатор IntactRNA	«Евроген», Россия	#BC031
ELISA Kit for Tumor Necrosis Factor Alpha (TNFa)	Cloude-Clone, Китай	#SEA133Ra
MLLV RT kit	«Евроген», Россия	# SK021
Magzol	Magen, Китай	#R480101
5x qPCRmixHS SYBR	«Евроген», Россия	#PK147L
Приборы		
DTprime DT96	ДНК-Технология, Россия	NA
ИФА-анализатор Multiskan FC	Thermo Scientific	NA
Проточный цитофлуориметр BD FASC Calibur	Becton, Dickinson and Company, США	
Животные		
Самцы крыс линии Sprague-Dawley	Питомник «Столбовая», Россия	NA
Праймеры 3'-5'		
IL4 For - ATGTAACGACAGCCCTCTGA Rev - AGCACGGAGGTACATCACG	«Евроген», Россия	NA
TNF α For - CCACCACGCTCTTCTGTCTA Rev - GCTACGGGCTTGTCACTCG	«Евроген», Россия	NA
IL1 β For - CTGTCTGACCCATGTGAGCT Rev - ACTCCACTTTGGTCTTGACTT	«Евроген», Россия	NA
IL10 For - GCCCAGAAATCAAGGAGCAT Rev - TGAGTGTACGTAGGCTTCTA	«Евроген», Россия	NA
Arg-1 For - GGATGAGCATGAGCTCCAAG Rev - GCCAGCTGTTTCATTGGCTT	«Евроген», Россия	NA
IL18 For - GACAAAAGAAACCCGCCTG Rev - ACATCCTTCCATCCTTACACG	«Евроген», Россия	NA
IL13 For - CCAGAAGACTTCCCTGTGCA Rev - CCCTCAGTGGCCATAGCG	«Евроген», Россия	NA
NOS2 For - CGCTGGTTTGAACTTCTCAG Rev - GGCAAGCCATGTCTGTGAC	«Евроген», Россия	NA
NF-kb For - AGAGCAACCGAAACAGAGAGG Rev - TTTGCAGGCCCCACATAGTT	«Евроген», Россия	NA
b2m For - CTCGCTCGGTGACCGTGAT Rev - GGACAGATCTGACATCTCGA	«Евроген», Россия	NA
Другое		
Золетил	VIRBAC, Франция	NA
Брикетируемый корм	ООО «Лабораторснаб», сертификат соответствия № РОССТУ. п081.B00113, ГОСТ Р50258-92, Россия	#ПК-120-1
Floriadae [https://floreada.io/]	Онлайн-программа для обсчета цитометрических данных [7]	NA

методом проточной цитофлуориметрии. Из хвостовой вены этих же животных отбирали 2–3 мл крови для выделения сыворотки и проведения иммуноферментного анализа с целью исследования концентрации TNFa (Cloude-Clone, #SEA133Ra), а также для оценки общей формулы крови.

Наконец, для определения маркеров макрофагов методом проточной цитофлуориметрии были использованы легкие еще трех интактных животных.

Оценка сухого остатка легкого (Wet/dry ratio)

Для оценки выраженности отека легкие 10 животных извлекали и взвешивали через 48 ч после введения ЛПС или физиологического раствора. Повторное взвешивание проводили через 7 дней высушивания легких при температуре 60 °С. Рассчитывали отношение массы в день забора легкого к массе после высушивания [8].

Выделение РНК, реакция обратной транскрипции и ПЦР

Для определения уровней экспрессии генов про- (TNF α , IL18, IL13, IL1 β) и противовоспалительных (IL10, IL4) цитокинов, генов ферментов, вовлеченных в метаболизм аргинина (NOS2 и Arg1), и гена транскрипционного фактора NF-kb тотальную РНК выделяли из образцов правых легких, помещенных в Фиксатор РНК («Евроген», Россия) с помощью реагента Magzol (Magen, Китай) в соответствии с рекомендациями производителя. Первую цепь кДНК для определения уровня экспрессии генов получали из 1 мкг тотальной РНК с помощью набора MMLV RT kit («Евроген», Россия) в соответствии с рекомендациями производителя.

ПЦР в реальном времени проводили в объеме 25 мкл, содержащем 400 нг первой цепи кДНК, по 400 нМ прямых и обратных праймеров (последовательности указаны в табл. 1) и 5x qPCRmixHS SYBR («Евроген», Россия). Все реакции проводили в трех повторах в детектирующем амплификаторе DTprime DT96 («ДНК-Технология», Россия) при следующих условиях: предварительная денатурация — 95 °C 5 мин; 40 циклов амплификации, включающих денатурацию — 95 °C 15 с, отжиг — 60 °C 12 с и элонгацию — 72 °C 15 с. Специфичность полученного продукта проверяли с помощью анализа кривой плавления ПЦР-продукта в программе Real Time PCR («ДНК-Технология», Россия). По кривой накопления флуоресцентного сигнала определяли пороговые циклы (Ct) для всех исследуемых генов. Относительный уровень экспрессии генов рассчитывали методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Для нормализации экспрессии каждого гена использовали ген «домашнего хозяйства» бета-2-микроглобулин.

Проточная цитометрия

Оценку содержания панмакрофагального маркера CD68, CD86, характерного для провоспалительных макрофагов, и MHC II, характерного для противовоспалительных макрофагов, проводили методом проточной цитометрии. Для этого легкие 12 животных (интактные животные, животные после введения NaCl 0,9%, и ЛПС в дозе 7,5 мг/кг или 15 мг/кг; по три особи в каждой группе) гомогенизировали механически, затем пропускали через сито с диаметром пор 100 мкм для избавления от оставшихся крупных фрагментов и фиксировали 2%-м параформальдегидом. 106 клеток отбирали для пермеабиллизации реагентом Inside Perm (#130-090-477, Miltenyi, Германия). Окрашивали CD68 FITC (#130-133-301, Miltenyi, Германия) или CD68 PE-Vio 770 (#130-134-152 Miltenyi, Германия), CD86 Vio Bright FITC (#130-109-180 Miltenyi, Германия) и MHC II PE (#205308, Biolegend). Собирали как минимум 50 000 событий на проточном цитометре BD FACS Calibur (CUSA). Оценку относительного количества CD68, CD86 и MHC II положительных клеток проводили в онлайн-программе FlowCytometry (https://flowcytometry.io/) [7].

Иммуноферментный анализ

Для определения концентрации TNF α в сыворотке крови из хвостовой вены крысы SD под глубоким наркозом отбирали 2 мл крови в пробирки с активатором свертывания. Центрифугирование проводили при 3200 об./мин в течение 20 мин. Далее сыворотку отбирали в новые пробирки и хранили при -20 °C. Исследование проводили с использованием набора ELISA Kit for Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF α) (Cloude-Clone,

Китай, #SEA133Ra) в соответствии с рекомендациями производителя. Оптическую плотность определяли при длине волны 450 нм на ИФА-анализаторе Multiskan FC (Thermo Scientific, CUSA).

Статистический анализ

Статистический анализ проводили в программе Prism 8.0. При сравнении двух групп использовали критерий Манна-Уитни, при сравнении большего количества групп использовали Ordinary one-way ANOVA. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для графического представления данных использовали боксплоты, включающие медиану и верхние/нижние экстремальные значения.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценку развития острого повреждения легких в первую очередь проводили по отношению массы интактного легкого к сухому остатку (Wet/dry ratio или W/D), которое является объективным показателем содержания воды в тканях легких и отражает развитие экссудативной фазы ОРДС. Для определения отношения W/D использовали целое легкое. Значимо высокий показатель W/D относительно контрольной группы был определен при введении дозы 15 мг/кг массы тела ($p = 0,0228$, Ordinary one-way Anova) (рис. 1).

На системном уровне интраназальное введение ЛПС в обеих дозировках привело к значимо низкому относительному содержанию лимфоцитов ($p = 0,0019$, Ordinary one-way Anova) и значимо высокому содержанию нейтрофилов ($p = 0,0021$, Ordinary one-way Anova).

После введения ЛПС у опытных крыс в сыворотке крови наблюдали увеличение концентрации провоспалительного цитокина TNF α более чем в 4 раза по сравнению с контрольной группой, однако различия не достигли статистической значимости (рис. 2).

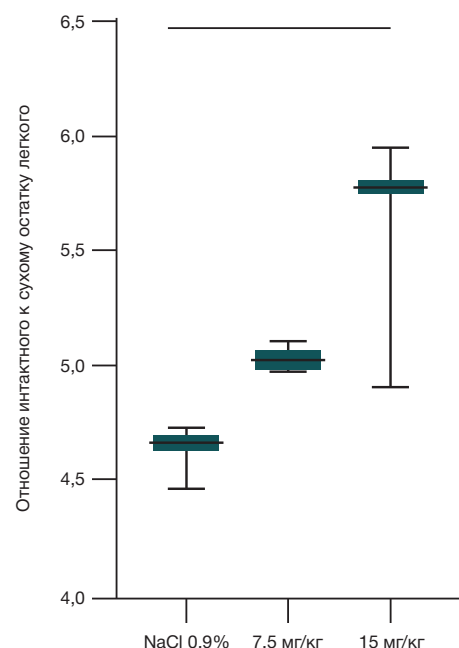


Рис. 1. Результат определения сухого остатка легкого через 48 ч после интраназального введения ЛПС *E. coli* O111:B4. Значимо высокий показатель W/D относительно контрольной группы был определен при введении дозы 15 мг/кг массы тела ($p = 0,0228$, Ordinary one-way Anova)

Известно, что макрофаги определяют исход ОРДС, поэтому на следующем этапе в гомогенатах легких крыс оценивали относительное количество клеток, несущих панмакрофагальный маркер CD68, а также маркеры, описанные для провоспалительных и противовоспалительных макрофагов (CD86 и MHC II соответственно) [9–11]. В легких опытных животных по сравнению с интактными при введении обеих дозировок ЛПС был выявлен значимо высокий уровень CD86-положительных клеток ($p = 0,0014$, Ordinary one-way Anova), а при использовании дозы ЛПС 7,5 мг/кг массы тела — еще и значимо высокий уровень MHC II положительных клеток ($p = 0,0050$, Ordinary one-way Anova) (рис. 3).

Развитие локального воспаления оценивали путем определения уровней экспрессии генов провоспалительных цитокинов TNF α , IL1 β , IL13 и IL18, гена транскрипционного фактора NF-kb, противовоспалительных цитокинов IL10 и IL4, а также генов ферментов, вовлеченных в метаболизм аргинина, NOS2 и Arg1 (рис. 3).

Уровень экспрессии гена *IL10* был значимо повышен у опытных крыс при введении ЛПС в дозе 15 мг/кг массы тела (Ordinary one-way Anova, $p = 0,0024$), а уровень *IL4* — снижен при введении дозы 7,5 мг/кг массы тела (Ordinary one-way Anova, $p = 0,0194$) по сравнению с животными, которым вводили физиологический раствор. Для генов *IL18* и *IL10* значимые различия были выявлены между животными после введения ЛПС в разных дозировках (Ordinary one-way Anova, $p = 0,009$ и $0,0024$ соответственно).

Сравнение степеней изменения уровней экспрессии ($2^{-(\Delta\Delta Ct)}$) при введении двух дозировок ЛПС относительно группы введения физиологического раствора с использованием критерия Манна-Уитни показало значимое повышение уровня экспрессии генов провоспалительного цитокина *IL18* и противовоспалительного цитокина *IL10* при введении дозы 15 мг/кг массы тела (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Моделирование ОРДС для изучения его патогенеза и поиска потенциальной терапии является нетривиальной задачей, что обусловлено в большей степени комплексностью патогенетической картины.

Вне зависимости от причин принято выделять три стадии заболевания: экссудативную, пролиферативную и фибротическую. Экссудативная стадия ОРДС длится 1–7 дней. В это время повреждающие факторы приводят к нарушению аэро-гематического барьера и развитию интра-альвеолярного отека [1]. В большинстве работ оценивают инфильтрацию нейтрофилами межальвеолярных перегородок и развитие интра-альвеолярного отека в легких через 24 ч. Особенностью данной работы является валидирование модели ОРДС через 48 ч. Значимо высокое отношение массы легкого после извлечения из тела животного к его сухому остатку при введении дозы ЛПС *E. coli* O111:B4 15 мкг/кг массы тела говорит о высоком содержании жидкости в ткани легкого, что свидетельствует об экссудативной стадии заболевания.

На системном уровне были отмечены признаки развития воспалительной реакции, о чем говорит значимо низкое относительное содержание лимфоцитов и значимо высокое содержание нейтрофилов. Лимфоциты — клетки адаптивной иммунной системы, помогающие организму противостоять вторжениям патогенных микроорганизмов в том числе через привлечение нейтрофилов в очаги инфекции во время острого воспаления. Под воздействием ЛПС запускается каскад реакций, приводящий к стимулированию костного мозга и высвобождению большого количества нейтрофилов в кровеносную систему [12]. Низкий уровень лимфоцитов может быть следствием перераспределения клеток в очаг воспаления [13]. Похожие изменения были выявлены при секвенировании мононуклеарных клеток крови у людей, больных ОРДС, по сравнению со здоровыми донорами. Были отмечены низкие уровни основных представителей лимфоцитов: В-клеток и CD4-T-клеток [14].

Характерной особенностью ОРДС является феномен, получивший название «цитокиновый шторм», который характеризуется высокой концентрацией провоспалительных цитокинов (TNF α , IFN γ , IL6 IL1 β) в крови. Показано участие TNF α в развитии лихорадки, усилении системного воспаления, активации антимикробных реакций и повышении секреции других провоспалительных цитокинов (например, IL6).

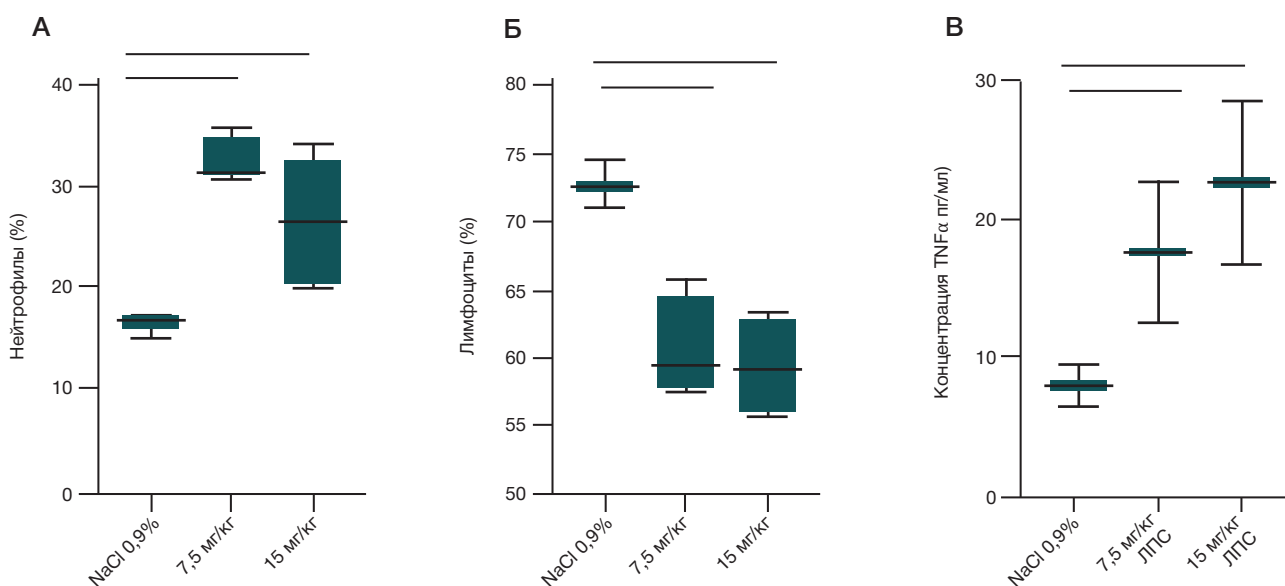


Рис. 2. Изменения общей формулы крови через 48 ч после интраназального введения ЛПС (А) и концентрации TNF α в сыворотке крови (Б). А. Относительное содержание лимфоцитов снижено по сравнению с контрольной группой ($p = 0,0019$, Ordinary one-way Anova), а нейтрофилов повышено при обеих дозах введения ($p = 0,0021$, Ordinary one-way Anova). Б. По сравнению с контрольной группой после введения ЛПС в сыворотке крови наблюдалось увеличение концентрации провоспалительного цитокина TNF α более чем в 4 раза, однако различия не достигли статистической значимости

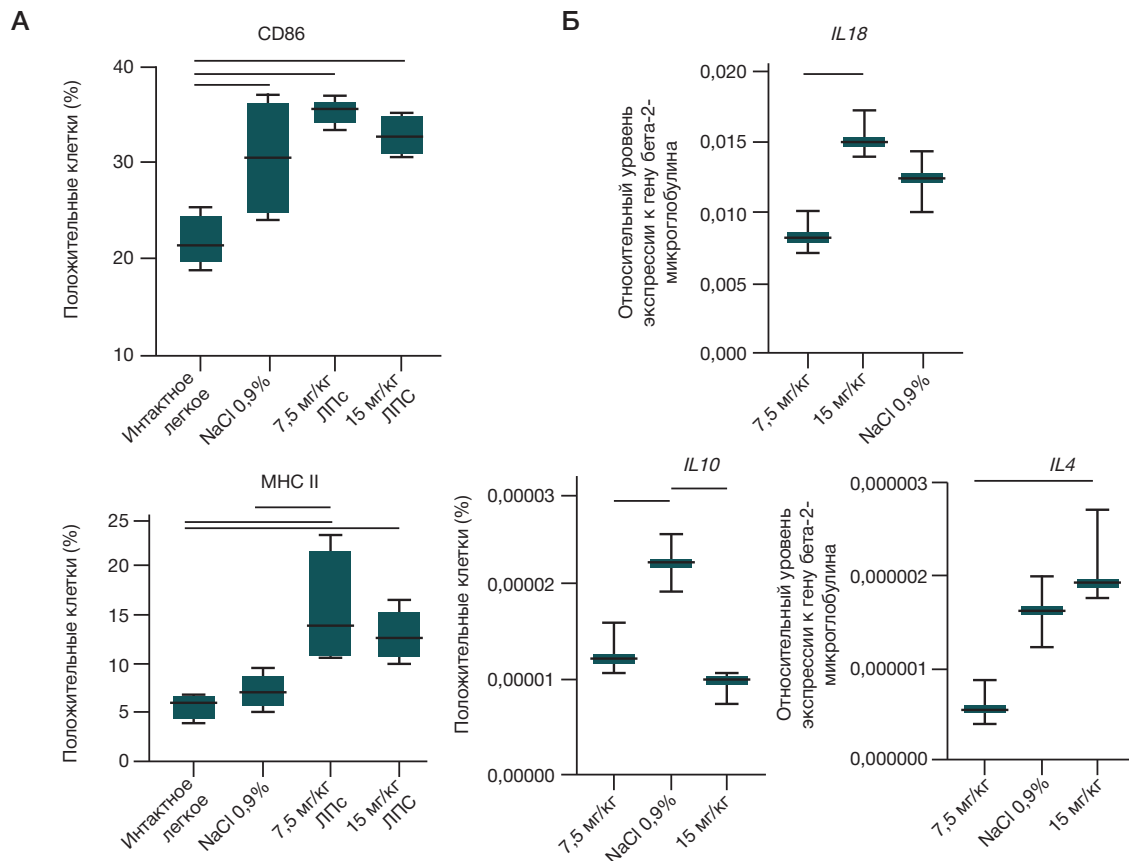


Рис. 3. Изменения в ткани легких через 48 ч после интраназального введения ЛПС. **А.** Содержание клеток, несущих маркер провоспалительных макрофагов CD86 увеличено во всех группах относительно интактного легкого ($p = 0,0014$, Ordinary one-way Anova). Количество клеток, несущих маркер противовоспалительных макрофагов MHC II ($p = 0,0050$, Ordinary one-way Anova), значительно повышено относительно интактного легкого после интраназального введения ЛПС в двух дозах. Относительно группы введения физиологического раствора повышено содержание MHC II положительных клеток после введения ЛПС в дозе 7,5 мг/кг массы тела. **Б.** При введении дозы ЛПС 15 мг/кг массы тела значительно повышался уровень экспрессии гена *IL10* (Ordinary one-way Anova, $p = 0,0024$) относительно введения физиологического раствора (группа NaCl 0,9%). Уровень экспрессии гена *IL4* (Ordinary one-way Anova, $p = 0,0194$) при введении дозы 7,5 мг/кг массы тела снижался. Для генов *IL18* и *IL10* значимо высокие уровни экспрессии были выявлены при введении дозы ЛПС 15 мг/кг массы тела (Ordinary one-way Anova, p (*IL18*) = 0,009, p (*IL10*) = 0,0024)

TNF α активирует транскрипционный фактор NF- κ B, который стимулирует множество генов, участвующих в воспалительной реакции [15].

Легкие — барьерный орган с мощно развитой системой защиты от микроорганизмов. Первыми клетками, отвечающими на вторжение из вне, являются макрофаги. В легких выделяют два типа макрофагов: населяющие альвеолы альвеолярные макрофаги и располагающиеся в интерстициальном пространстве интерстициальные макрофаги [16]. Фенотип первых описывают как противовоспалительный с высокой экспрессией IL10 и TGF β [17]. Интерстициальные макрофаги на сегодняшний день активно изучаемая популяция клеток [16]. Макрофаги, рекрутируемые из моноцитов крови, имеют фенотип, близкий к провоспалительному, и экспрессируют в значительных количествах костимулирующие молекулы CD86, необходимые для адекватной антигенной передачи сигнала, в комплексе с молекулами главного комплекса гистосовместимости первого типа (MHC I) [9]. Исход заболевания зависит от баланса двух состояний альвеолярных макрофагов. При этом показано, что в случае вирусного заболевания из них формируется популяция клеток памяти MHC IIhi [18, 19]. В экссудативной фазе провоспалительные макрофаги преобладают над противовоспалительными клетками. Активация распознающих паттерн рецепторов макрофагов приводит к формированию инфламмы, в которой каспаза-1 способствует созреванию IL1 и IL18. Прогрессирование заболевания может быть тяжелым,

если процесс созревания инфламмы нарушается. В пролиферативной фазе ОРДС провоспалительные макрофаги сменяются противовоспалительными макрофагами, которые удаляют клеточные остатки и выделяют противовоспалительные цитокины. Было показано, что дефектный эффероцитоз может приводить к затяжному воспалению, наблюдаемому при ОРДС; кроме того, избыточное участие противовоспалительных макрофагов в процессах реорганизации матрикса на этой стадии может привести к хроническому фиброзу и окклюзии кровеносных сосудов [20]. Таким образом, выявленное нами повышение количества CD86 и MHC II положительных клеток позволяет предположить, что через 48 ч после интраназального введения ЛПС макрофаги легкого находятся в переходном состоянии от провоспалительного к противовоспалительному [18].

На геномном уровне было отмечено, что интраназальное введение ЛПС в дозе 15 мг/кг массы тела приводит к изменению уровней экспрессии генов как про- так и противовоспалительных цитокинов (IL18 и IL10 соответственно). При этом использование более высокой дозы значительно активировало противовоспалительный иммунный ответ, о чем свидетельствует высокий уровень экспрессии гена IL10 [21]. В патогенезе ОРДС IL10 играет неоднозначную роль: он может как способствовать разрешению заболевания путем ингибирования секреции провоспалительных цитокинов, таких как TNF α , IL1 β , IL6 и IFN γ , так и осложнять его путем снижения

Таблица 2. Изменение уровня экспрессии изучаемых генов в легких крыс после введения ЛПС в двух дозировках относительно контрольной группы

2 ^{Δ(-ΔΔCt)} относительно группы NaCl 0,9% при введении дозы 7,5 мг/кг	2 ^{Δ(-ΔΔCt)} относительно группы NaCl 0,9% при введении дозы 15 мг/кг	P value, тест Манна–Уитни (сравнение двух доз)
Гены провоспалительных цитокинов и транскрипционного фактора		
<i>TNFα</i>		
0,58 (± 0,66)	0,77 (± 0,14)	0,7
<i>IL18</i>		
0,69 (± 0,12)	1,25 (± 0,13)	0,05
<i>IL13</i>		
1,11 (± 0,1)	1,09 (± 0,62)	0,35
<i>IL1β</i>		
0,34 (± 0,32)	0,79 (± 0,21)	0,1
<i>NF-kb</i>		
0,73 (± 0,14)	1,11 (± 0,26)	0,1
Гены противовоспалительных цитокинов		
<i>IL10</i>		
1,41 (± 0,31)	2,44 (± 0,34)	0,05
<i>IL4</i>		
0,9 (± 0,11)	0,51 (± 0,47)	0,35
Гены ферментов, вовлеченных в метаболизм аргинина		
<i>NOS2</i>		
2,19 (± 1,00)	1,19 (± 0,26)	0,1
<i>Arg1</i>		
0,64 (± 0,44)	1,05 (± 0,3)	0,2

дифференцировки стволовых клеток в альвеолоциты II типа, таким образом препятствуя восстановлению легких [22]. Высокий уровень экспрессии IL10 потенциально может указывать на поляризацию макрофагов в противовоспалительный фенотип, что согласуется с высоким уровнем МНС II положительных клеток по результатам проточной цитометрии [17].

Провоспалительный цитокин IL18, который был впервые описан как фактор, индуцирующий интерферон IFNγ через воздействие на клетки как врожденного, так и адаптивного иммунного ответа, участвует в защите от инфекционных агентов и в противоопухолевом иммунитете. Активация паттерн-распознающих рецепторов врожденного иммунитета (PRR) в легких приводит к активации транскрипционного фактора NF-kb в эпителиальных и эндотелиальных клетках, а также в резидентных иммунных клетках. NF-kb в свою очередь способствует увеличению про-IL1β, про-IL18 и прокаспазы-1, зрелые формы которых формируются в инфламмосомах и запускают порочный круг развития воспаления. IL18 является мощным хемоаттрактантом для нейтрофилов, увеличенное количество которых в легких является важнейшим признаком острой фазы ОРДС; это согласуется с полученными нами данными о

высоком уровне экспрессии гена IL18 после введения дозы ЛПС 15 мг/кг массы тела, а также о высоком содержании нейтрофилов в крови.

Выводы

Интраназальное введение крысам ЛПС внешней стенки грамотрицательных бактерий через 48 ч приводит к развитию процессов, характерных для экссудативной и пролиферативной фаз ОРДС: отек легких, снижение количества лимфоцитов и повышение количества нейтрофилов в крови, а также повышение концентрации TNFα в сыворотке крови. Введение ЛПС в дозе 15 мг/кг приводит к быстрому развитию воспалительных процессов в легких, и уже через 48 ч в значительной мере прослеживается активация противовоспалительных реакций. Таким образом, использование интраназального введения ЛПС O111:B4 в дозе 15 мг/кг массы тела крысам породы Sprague-Dawley может быть использовано с целью моделирования ОРДС для оценки эффективности лекарственной терапии, в том числе клеточной, по таким показателям как сухой остаток легкого, содержание CD86 и МНС II положительных клеток в гомогенатах легких и уровни экспрессии генов IL10 и IL18.

Литература

1. Bos LDJ, Ware LB. Acute respiratory distress syndrome: causes, pathophysiology, and phenotypes. The Lancet. 2022; 400: 1145–56.
2. Aeffner F, Bolon B, Davis IC. Mouse Models of Acute Respiratory Distress Syndrome. Toxicol Pathol. 2015; 43: 1074–92.
3. Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology. 2008; 295: L379–99.
4. Soloveva T, Davydova V, Krasikova I, Yermak I. Marine Compounds

with Therapeutic Potential in Gram-Negative Sepsis. *Mar Drugs*. 2013; 11: 2216–29.

5. Khadangi F, Forgues A-S, Tremblay-Pitre S, Dufour-Mailhot A, Henry C, Boucher M, et al. Intranasal versus intratracheal exposure to lipopolysaccharides in a murine model of acute respiratory distress syndrome. *Sci Rep*. 2021; 11: 7777.
6. Kosyreva AM, Miroshnichenko EA, Tsvetkov IS, Lokhonina AV, Sentyabreva AV, Dzhalilova DSh, et al. Morphofunctional Characteristics of Lung Macrophages in Rats with Acute Respiratory Distress Syndrome. *Bull Exp Biol Med*. 2023; 175: 822–7.
7. Онлайн-программа для обсчета цитометрических данных. Доступно по ссылке: <https://floreada.io/>.
8. Parker JC, Townsley MI. Evaluation of lung injury in rats and mice. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2004; 286: L231–46.
9. Vishnyakova P, Poltavets A, Karpulevich E, Maznina A, Vtorushina V, Mikhaleva L, et al. The response of two polar monocyte subsets to inflammation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021; 139: 111614.
10. Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev YV. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Laboratory Investigation*. 2017; 97: 4–13.
11. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, et al. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity*. 2014;41:14–20.
12. Qazi MR, Bogdanska J, Butenhoff JL, Nelson BD, DePierre JW, Abedi-Valugherdi M. High-dose, short-term exposure of mice to perfluorooctanesulfonate (PFOS) or perfluorooctanoate (PFOA) affects the number of circulating neutrophils differently, but enhances the inflammatory responses of macrophages to lipopolysaccharide (LPS) in a similar fashion. *Toxicology*. 2009; 262: 207–14.
13. Chakraborty S, Zawieja SD, Wang W, Lee Y, Wang YJ, von der Weid P-Y, et al. Lipopolysaccharide modulates neutrophil recruitment and macrophage polarization on lymphatic vessels and impairs lymphatic function in rat mesentery. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2015; 309: H2042–57.
14. Torres M, Casado G, Vigón L, Rodríguez-Mora S, Mateos E, Ramos-Martín F, et al. Changes in the immune response against SARS-CoV-2 in individuals with severe COVID-19 treated with high dose of vitamin D. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022; 150: 112965.
15. Riyaz Tramboo S, Elkhaila AME, Quibtiya S, Ali SI, Nazir Shah N, Taifa S, et al. The critical impacts of cytokine storms in respiratory disorders. *Heliyon*. 2024; 10: e29769.
16. Hou F, Xiao K, Tang L, Xie L. Diversity of Macrophages in Lung Homeostasis and Diseases. *Front Immunol*. 2021; 12.
17. Fakoya AO, Naeem A, Louisdon P. Histology. Alveolar Macrophages. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513313/#:~:text=Alveolar%20macrophages%20produce%20anti%2Dinflammatory,processes%20and%20promote%20tissue%20repair>.
18. Morrell ED, Bhatraju PK, Mikacenic CR, Radella F, Manicone AM, Stapleton RD, et al. Alveolar Macrophage Transcriptional Programs Are Associated with Outcomes in Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019; 200: 732–41.
19. Yao Y, Jeyanathan M, Haddadi S, Barra NG, Vaseghi-Shanjani M, Damjanovic D, et al. Induction of Autonomous Memory Alveolar Macrophages Requires T Cell Help and Is Critical to Trained Immunity. *Cell*. 2018; 175: 1634–50.e17.
20. Mahida RY, Scott A, Parekh D, Lugg ST, Hardy RS, Lavery GG, et al. Acute respiratory distress syndrome is associated with impaired alveolar macrophage efferocytosis. *European Respiratory Journal*. 2021; 58: 2100829.
21. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *The Journal of Immunology*. 2008; 180: 5771–7.
22. Sun Z, Chen A, Fang H, Sun D, Huang M, Cheng E, et al. B cell-derived IL-10 promotes the resolution of lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Cell Death Dis*. 2023; 14: 418.

References

1. Bos LDJ, Ware LB. Acute respiratory distress syndrome: causes, pathophysiology, and phenotypes. *The Lancet*. 2022; 400: 1145–56.
2. Aeffner F, Bolon B, Davis IC. Mouse Models of Acute Respiratory Distress Syndrome. *Toxicol Pathol*. 2015; 43: 1074–92.
3. Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2008; 295: L379–99.
4. Soloveva T, Davydova V, Krasikova I, Yermak I. Marine Compounds with Therapeutic Potential in Gram-Negative Sepsis. *Mar Drugs*. 2013; 11: 2216–29.
5. Khadangi F, Forgues A-S, Tremblay-Pitre S, Dufour-Mailhot A, Henry C, Boucher M, et al. Intranasal versus intratracheal exposure to lipopolysaccharides in a murine model of acute respiratory distress syndrome. *Sci Rep*. 2021; 11: 7777.
6. Kosyreva AM, Miroshnichenko EA, Tsvetkov IS, Lokhonina AV, Sentyabreva AV, Dzhalilova DSh, et al. Morphofunctional Characteristics of Lung Macrophages in Rats with Acute Respiratory Distress Syndrome. *Bull Exp Biol Med*. 2023; 175: 822–7.
7. Available from: <https://floreada.io/>.
8. Parker JC, Townsley MI. Evaluation of lung injury in rats and mice. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2004; 286: L231–46.
9. Vishnyakova P, Poltavets A, Karpulevich E, Maznina A, Vtorushina V, Mikhaleva L, et al. The response of two polar monocyte subsets to inflammation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021; 139: 111614.
10. Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev YV. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Laboratory Investigation*. 2017; 97: 4–13.
11. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, et al. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity*. 2014;41:14–20.
12. Qazi MR, Bogdanska J, Butenhoff JL, Nelson BD, DePierre JW, Abedi-Valugherdi M. High-dose, short-term exposure of mice to perfluorooctanesulfonate (PFOS) or perfluorooctanoate (PFOA) affects the number of circulating neutrophils differently, but enhances the inflammatory responses of macrophages to lipopolysaccharide (LPS) in a similar fashion. *Toxicology*. 2009; 262: 207–14.
13. Chakraborty S, Zawieja SD, Wang W, Lee Y, Wang YJ, von der Weid P-Y, et al. Lipopolysaccharide modulates neutrophil recruitment and macrophage polarization on lymphatic vessels and impairs lymphatic function in rat mesentery. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2015; 309: H2042–57.
14. Torres M, Casado G, Vigón L, Rodríguez-Mora S, Mateos E, Ramos-Martín F, et al. Changes in the immune response against SARS-CoV-2 in individuals with severe COVID-19 treated with high dose of vitamin D. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022; 150: 112965.
15. Riyaz Tramboo S, Elkhaila AME, Quibtiya S, Ali SI, Nazir Shah N, Taifa S, et al. The critical impacts of cytokine storms in respiratory disorders. *Heliyon*. 2024; 10: e29769.
16. Hou F, Xiao K, Tang L, Xie L. Diversity of Macrophages in Lung Homeostasis and Diseases. *Front Immunol*. 2021; 12.
17. Fakoya AO, Naeem A, Louisdon P. Histology. Alveolar Macrophages. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513313/#:~:text=Alveolar%20macrophages%20produce%20anti%2Dinflammatory,processes%20and%20promote%20tissue%20repair>.
18. Morrell ED, Bhatraju PK, Mikacenic CR, Radella F, Manicone AM, Stapleton RD, et al. Alveolar Macrophage Transcriptional Programs Are Associated with Outcomes in Acute Respiratory

- Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019; 200: 732–41.
19. Yao Y, Jeyanathan M, Haddadi S, Barra NG, Vaseghi-Shanjani M, Damjanovic D, et al. Induction of Autonomous Memory Alveolar Macrophages Requires T Cell Help and Is Critical to Trained Immunity. *Cell*. 2018; 175: 1634–50.e17.
 20. Mahida RY, Scott A, Parekh D, Lugg ST, Hardy RS, Lavery GG, et al. Acute respiratory distress syndrome is associated with impaired alveolar macrophage efferocytosis. *European Respiratory Journal*. 2021; 58: 2100829.
 21. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *The Journal of Immunology*. 2008; 180: 5771–7.
 22. Sun Z, Chen A, Fang H, Sun D, Huang M, Cheng E, et al. B cell-derived IL-10 promotes the resolution of lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Cell Death Dis*. 2023; 14: 418.