

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Джалилова Джулия Шавкатовна

**Клеточные и молекулярно-биологические механизмы взаимосвязи
воспаления, опухолевого процесса и устойчивости к гипоксии**

1.5.22. Клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва – 2025

Диссертация подготовлена в лаборатории иммуноморфологии воспаления «НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына» ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского»

Научный консультант – **Макарова Ольга Васильевна**,
доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты – **Александрова Антонина Юрьевна**, доктор биологических наук, лаборатория механизмов канцерогенеза Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ведущий научный сотрудник

Плотников Егор Юрьевич, доктор биологических наук, лаборатория структуры и функции митохондрий Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, заведующий лабораторией

Трегуб Павел Павлович, доктор медицинских наук, кафедра патологической физиологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), профессор кафедры

Защита диссертации состоится «16» декабря 2025 г. в 15 часов 30 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.9 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские Горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет, ауд. М-1.

E-mail: tlipina@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3604/>

Автореферат разослан «___» _____ 2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Т.В. Липина

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования

Кислородная недостаточность является одним из ключевых факторов, определяющих развитие и тяжесть течения многих заболеваний, в том числе сердечно-сосудистых, инфекционно-воспалительных и опухолевых (Semenza, 2010; Della Rocca et al., 2022; Luo et al., 2022; Zhao et al., 2024). Показано, что у пациентов с гипоксией, обусловленной хронической сердечной недостаточностью, хронической обструктивной болезнью легких, анемией и другими состояниями, наблюдается высокая частота развития злокачественных опухолей (Park et al., 2020; Roderburg et al., 2021; Boennelykke et al., 2022; Jaiswal et al., 2023). Гипоксия сопровождается нарушениями метаболизма, развитием окислительного стресса и воспаления, что способствует онкогенезу. Клеточные и молекулярно-биологические механизмы инициации опухолей и их прогрессии на фоне хронической гипоксии недостаточно изучены, однако считается, что ключевую роль в этих процессах играют индуцируемый гипоксией транскрипционный фактор HIF (Hypoxia-Inducible Factor) и ядерный фактор NF-κB (Nuclear Factor-κB), активация которых приводит к продукции провоспалительных цитокинов, окислительному стрессу, ангиогенезу и инициации опухолевого роста (Hunyor и Cook, 2018).

Недостаток кислорода активирует в клетках сигнальный путь транскрипционного фактора HIF, который имеет три изоформы – HIF-1, HIF-2, HIF-3, регулирующие экспрессию нескольких тысяч генов (Wicks и Semenza, 2022; Semenza, 2023). Известно, что организмы человека и лабораторных животных отличаются по исходной устойчивости к гипоксии, т.е. гипоксическое воздействие одной и той же тяжести и длительности вызывает разные реакции у особей одной популяции, одного возраста и пола (Jain et al., 2013; Kirova et al., 2013; Dzhililova и Makarova, 2020; Glazachev et al., 2020; Mallet et al., 2023; Post et al., 2024; Kurhaluk и Tkaczenko, 2025). Тем не менее, в настоящее время не учитывается роль индивидуальной исходной устойчивости организма к гипоксии при изучении механизмов различных заболеваний и разработке подходов к их диагностике, лечению и профилактике.

В экспериментальных исследованиях по результатам сублетальной гипоксической нагрузки в барокамере выделяют высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии лабораторных животных, которые различаются по биохимическим показателям, уровню окислительного стресса, активности ферментов антиоксидантной защиты, функциональному состоянию митохондрий и другим параметрам, в том числе по содержанию HIF-1α (Лукьянова, 2019; Ghosh et al., 2012; Jain et al., 2013; Kirova et al., 2013; Dzhililova et al., 2019a; Kurhaluk и Tkaczenko, 2025). По сравнению с ВУ у НУ животных содержание HIF-1α в разных органах выше (Kirova et al., 2013; Dzhililova et al., 2019a).

В 90% злокачественных опухолей разного гистогенетического типа выявлена локальная гипоксия (Semenza, 2010; Della Rocca et al., 2022; Luo et al., 2022). Показано, что дефицит кислорода в тканях опухоли коррелирует со степенью ее дифференцировки, темпами прогрессии, метастазирования и устойчивостью к терапии (Gorr et al., 2010; Semenza, 2010). В процессе развития и прогрессии опухолей активация HIF способствует изменениям метаболизма клеток с переключением окислительного фосфорилирования на гликолиз. Кроме этого, HIF стимулирует ангиогенез, регулирует адгезию, инвазию опухолевых клеток и метастазирование (Kierans и Taylor, 2021; Rodriguez et al., 2021; Semenza, 2022; Sharma et al., 2022; Schito и Rey-Keim, 2023). В последние десятилетия интенсивно развивается направление по исследованию возможностей фармакологической коррекции гипоксии в опухолях. С этой целью используют лекарственные средства, направленные на ингибирование HIF (Fallah и Rini, 2019; Semenza, 2019; Qannita et al., 2024; Nisar et al., 2025). Однако зависимость терапевтического эффекта этих новых противоопухолевых лекарственных средств от исходной устойчивости организма к гипоксии и

уровня активации HIF не исследована. Эффективность ингибиторов и активаторов HIF может быть неодинаковой у организмов с разной устойчивостью к гипоксии. В частности, показано, что эффект терапии антигипоксантами более выражен у НУ животных (Каркищенко, 2017).

Наряду с гипоксией, в процессах инициации и прогрессии опухолей важную роль играют локальный и системный воспалительный и иммунный ответы. Установлено, что около 25% всех злокачественных опухолей развиваются на фоне хронического воспаления (Murata, 2018; Greten и Grivennikov, 2019; Turizo-Smith et al., 2024). Ранее в эксперименте показано более тяжелое течение индуцированного липополисахаридом (ЛПС) системного воспалительного ответа по сравнению с ВУ у НУ крыс Вистар, что сопровождается более высокой экспрессией *Hif1a* и *Nfkb* (Dzhalilova et al., 2019a).

Таким образом, исходная устойчивость к гипоксии может определять тяжесть течения опухолевых заболеваний и их прогноз. Однако в литературе отсутствуют данные о механизмах взаимосвязи между исходной устойчивостью организма к гипоксии, воспалением и процессами инициации и прогрессии опухолей.

Степень разработанности темы исследования

В процессах инициации и прогрессии опухолей на молекулярно-биологическом уровне ключевую роль играет гипоксия и активация фактора HIF (Semenza, 2010; Della Rocca et al., 2022; Luo et al., 2022). По данным иммуногистохимических исследований биопсийного материала повышенное содержание белка HIF-1 α , регулирующего ответ на гипоксию, обнаружено в клетках практически всех опухолей человека разного гистогенетического типа: колоректального рака (КРР), глиобластомы, рака молочной железы, аденокарцином яичника, мочевого пузыря, простаты, поджелудочной железы и др. (Zhong et al., 1999; Talks et al., 2000). Высокое содержание белка HIF-1 α коррелирует с высокой пролиферативной активностью опухолевых клеток, неблагоприятным прогнозом и резистентностью к противоопухолевой терапии (Semenza, 2010; Takasaki et al., 2016; Shamis et al., 2021). Показано, что люди отличаются значительной индивидуальной вариабельностью по уровням экспрессии *HIF1A* и HIF-зависимых генов в лейкоцитах (Brooks et al., 2009; van Patot и Gassmann, 2011). У людей выявлено наличие полиморфизмов гена *HIF1A*, характеризующихся высоким уровнем его экспрессии. Один из полиморфизмов *HIF1A*, rs11549465 C>T, связан с увеличением риска развития опухолей (Gladek et al., 2017; Li et al., 2019).

По данным клинических и физиологических исследований влияния высокогорных условий на организмы лабораторных животных и людей выделяют две различные группы по их способности адаптироваться к недостатку кислорода, то есть по исходной устойчивости к гипоксии (Lu et al., 2016; Kammerer et al., 2020; Mallet et al., 2023; Post et al., 2024; Kurhaluk и Tkaczenko, 2025). Известно, что устойчивость к гипоксии может меняться с возрастом, а наиболее устойчивыми к недостатку кислорода являются новорожденные (Dzal и Milsom, 2021; Tregub et al., 2024a). При этом данные об изменениях активности HIF с возрастом противоречивы (Kang et al., 2005; Ndubuizu et al., 2009). В экспериментальных исследованиях после определения индивидуальной устойчивости к гипоксии в барокамере выявлены различия между ВУ и НУ половозрелыми животными по ряду показателей, в частности, уровню окислительного стресса, содержанию HIF-1 α , активности ферментов антиоксидантной защиты и др. (Jain et al., 2013; Kirova et al., 2013; Dzhalilova et al., 2019a; Kurhaluk, 2023). Существующие способы оценки исходной устойчивости организма к недостатку кислорода предполагают непосредственное воздействие на организм условий гипоксии, т.е. *in vivo*. При таких способах оценки, как правило, используется сублетальная гипоксическая нагрузка, которая может приводить к альтеративным и воспалительным изменениям во внутренних органах (Макарова и соавт., 2012). Данный способ определения устойчивости к гипоксии в барокамере является стрессорным, в связи с чем для нивелирования повреждающего эффекта острого гипоксического воздействия на организм

животных необходим временной интервал в один месяц до проведения экспериментов (Лукьянова и соавт., 2009; Лукьянова и Кирова, 2011; Каркищенко, 2017). В последние десятилетия увеличивается популярность основанной на повышении устойчивости к недостатку кислорода гипокситерапии для профилактики и лечения многих заболеваний (Меерсон, 1993; Николаева, 2015; Рыбникова и соавт., 2025; Timon et al., 2022; Brown et al., 2023; Li et al., 2024; Tregub et al., 2024b). Однако до сих пор не разработаны доступные и информативные способы определения индивидуальной устойчивости организма к гипоксии, позволяющие прогнозировать терапевтическую эффективность гипокситерапии, а также неблагоприятные реакции организма на недостаток кислорода (Verges et al., 2015). Поэтому одной из актуальных задач является разработка чувствительных лабораторных способов определения устойчивости организма к недостатку кислорода без гипоксической нагрузки.

Установлено, что частота развития опухолей различных гистогенетических типов варьирует у людей, проживающих в условиях гипоксии (в горах) и нормоксии (на уровне моря). Хотя общая смертность от злокачественных опухолей отрицательно коррелирует с увеличением высоты, в зависимости от гистогенеза опухоли определяется ряд особенностей показателей заболеваемости и смертности (Amsel et al., 1982; Weinberg et al., 1987; Hart, 2013; Simeonov и Himmelstein, 2015). Выявлено наличие обратной связи между уровнем заболеваемости и смертности от рака легких и высотой (Simeonov и Himmelstein, 2015). Установлено, что распространенность первичных опухолей головного мозга, в том числе глиобластомы, ниже у людей, живущих на высоте более 400 м над уровнем моря (Ardhini и Tugaworo, 2019). Высокая частота встречаемости рака желудка наблюдается в высокогорных районах Испании, Ирана, Китая и в Южной Америке (Torres et al., 2013; Zhao et al., 2017). В Эквадоре в условиях высокогорья повышена распространенность КРП (Garrido и Garrido, 2018). При этом механизмы, лежащие в основе различий в распространенности разных типов опухолей и обусловленной ими смертности в зависимости от высоты проживания, остаются неизученными.

В инициации и прогрессии опухолей наряду с гипоксией важную роль играют воспаление и реакции иммунной системы (Hanahan и Weinberg, 2011; Greten и Grivennikov, 2019). Еще в XIX в. Рудольф Вирхов при микроскопическом исследовании опухолей обнаружил в них инфильтрацию лейкоцитами и предположил наличие взаимосвязи между воспалением и онкогенезом (Virchow, 1858). В настоящее время установлено, что хроническое воспаление является определяющим фактором развития многих опухолей, включая колит-ассоциированный КРП (Schmitt и Greten, 2021; Yamamoto-Furusho и Gutierrez-Herrera, 2025). Как при развитии воспалительных, так и опухолевых процессов наблюдается активация HIF, NF-κB, VEGF, STAT3, ERK, C-MYC, EGFR, MMPs, GLUT-3 и др., контролирующих пролиферацию клеток, миграцию, ангиогенез и воспаление (Balkwill и Mantovani, 2001; Rastogi et al., 2023). Например, более 500 связанных с опухолями генов регулирует сигнальный путь NF-κB (Taniguchi и Karin, 2018), активация которого способствует синтезу провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, что приводит к нарушению баланса пролиферации и дифференцировки клеток и инициации опухолевой трансформации (Greten и Grivennikov, 2019). Хронический воспалительный процесс, связанный с опухолью, сопровождается увеличением содержания в крови медиаторов воспаления (цитокинов, хемокинов, эйкозаноидов, активных форм кислорода (АФК) и др.), белков острой фазы воспаления и факторов роста, которые иницируют не только локальный, но и системный воспалительный ответ (Dolan et al., 2017; Aguilar-Cazares et al., 2022). Тяжесть системного воспалительного ответа является одной из основных характеристик неблагоприятного прогноза злокачественных опухолей (Diakos et al., 2014; Dolan et al., 2017; Xie et al., 2025; Yang et al., 2025).

Активация NF-κB и воспаление сопровождаются развитием гипоксии и индукцией HIF-1α, промотор гена которого имеет сайт связывания NF-κB, что при воспалительных заболеваниях

приводит к активации экспрессии как генов, регулирующих ответ на недостаток кислорода, так и генов, кодирующих провоспалительные молекулы (Rius et al., 2008; van Uden et al., 2008; Koyasu et al., 2018). Активация NF- κ B и HIF-1 α при развитии опухоли способствует экспрессии одних и тех же генов-мишеней, регулирующих воспаление, метаболизм, аутофагию, клеточный цикл, апоптоз, ангиогенез, миграцию, инвазию и метастазирование. HIF-1 α регулирует метаболизм и экспрессию генов как в миелоидных (моноциты, макрофаги, дендритные клетки, нейтрофилы и др.), так и в лимфоидных (Т- и В-лимфоциты) клетках (Colgan et al., 2020; Taylor и Scholz, 2022). Таким образом, клеточные и молекулярно-биологические механизмы гипоксии, воспаления и онкогенеза тесно взаимосвязаны.

Несмотря на ведущую роль гипоксии практически на всех этапах формирования опухолей, индивидуальная исходная устойчивость организма к недостатку кислорода до сих пор не рассматривается как фактор, влияющий на развитие и прогрессию опухолей. Различная предрасположенность организмов к развитию опухолей разных гистогенетических типов может определяться индивидуальной исходной устойчивостью к гипоксии.

Таким образом, в литературе отсутствуют данные о клеточных и молекулярно-биологических особенностях опухолевого процесса у животных с высокой и низкой исходной устойчивостью к гипоксии. Исследование клеточных и молекулярно-биологических механизмов взаимосвязи гипоксии, воспаления и опухолевого роста позволит определить мишени и биомаркеры устойчивости к гипоксии для разработки новых методов эффективной терапии злокачественных опухолей.

Цель и задачи исследования

Цель исследования. Цель исследования – установить клеточные и молекулярно-биологические механизмы взаимосвязи исходной устойчивости к гипоксии, воспаления, инициации и прогрессии опухолей.

Задачи исследования:

1. Охарактеризовать у самцов крыс Вистар возрастные различия исходной устойчивости к недостатку кислорода и активности фактора, индуцируемого гипоксией HIF-1 α , во взаимосвязи с показателями окислительного стресса и продукцией провоспалительных и противовоспалительных цитокинов.
2. Выявить морфологические и иммунологические особенности индуцированного декстрансульфатом натрия острого и хронического язвенного колита у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии самцов мышей C57Bl/6.
3. Определить морфологические, молекулярно-биологические и иммунологические особенности инициации и прогрессии опухолевого роста на экспериментальной модели ассоциированного с хроническим воспалением колоректального рака у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии самцов мышей C57Bl/6.
4. Выявить на модели глиобластомы 101.8 морфологические и молекулярно-биологические особенности опухолевой прогрессии и системного воспалительного ответа у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии самцов крыс Вистар.
5. Оценить в динамике на модели карциномы легких Льюис выраженность метастазирования и воспалительного ответа у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии самцов мышей C57Bl/6.
6. Охарактеризовать молекулярно-биологические особенности неактивированных и активированных липополисахаридом макрофагов у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии самцов крыс Вистар.
7. Установить взаимосвязь устойчивости самцов крыс Вистар к гипоксии и уровней спонтанной и стимулированной гипоксическим и воспалительным стимулом продукции цитокинов клетками периферической крови *ex vivo*.

Объект и предмет исследования

Самцы крыс Вистар и мышей C57Bl/6 с высокой и низкой устойчивостью к гипоксии; оценка взаимосвязи устойчивости к гипоксии и возраста; морфологические особенности острого и хронического колита у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии животных; морфологические и молекулярно-биологические особенности колит-ассоциированного колоректального рака, глиобластомы и карциномы легких у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии животных; молекулярно-биологические свойства макрофагов до и после стимуляции липополисахаридом; динамика продукции цитокинов клетками крови до и после воздействия гипоксического и воспалительных стимулов *ex vivo*.

Научная новизна

Впервые установлено, что темпы прогрессии экспериментальных опухолей и выраженности системного воспалительного ответа зависят от связанной с возрастом устойчивости организма к гипоксии.

Среди самцов крыс Вистар разных возрастных групп наименее устойчивы к гипоксии препубертатные животные с низким содержанием HIF-1 α в сыворотке крови. Высокое содержание белка HIF-1 α в печени и сыворотке крови у половозрелых крыс сочетается с высокими уровнями АФК и провоспалительных цитокинов TNF- α и IFN- γ .

Оптимальным возрастным периодом для исследования опухолевого процесса в зависимости от устойчивости организма к гипоксии является половозрелый период, так как в отличие от половозрелых у старых высокоустойчивых и низкоустойчивых к недостатку кислорода животных различия уровней экспрессии генов *Hif1a*, *Nfkb* и *Vegf* в печени не выражены.

По сравнению с высокоустойчивыми у низкоустойчивых к гипоксии мышей при остром и хроническом колите язвенно-воспалительный процесс более выражен, у них развивается вторичный иммунодефицит с акцидентальной инволюцией тимуса и снижением содержания основных субпопуляций лимфоцитов в крови.

По сравнению с высокоустойчивыми у низкоустойчивых к гипоксии животных в норме в ободочной кишке выявлены высокие уровни экспрессии генов *Hif1a*, *Hif3a*, *Nfkb* и *Il10*, что свидетельствует о провоспалительном фенотипе, а более низкая экспрессия *Muc1*, *Muc13* и *Cldn7* – о более высокой проницаемости эпителиального барьера ободочной кишки, и эти различия определяют темпы инициации и прогрессии колит-ассоциированного колоректального рака.

Впервые показано, что темпы инициации и прогрессии колит-ассоциированного колоректального рака по сравнению с высокоустойчивыми к гипоксии животными у низкоустойчивых выше – у них больше размеры опухолей, все опухоли представлены аденокарциномами, в то время как у высокоустойчивых преимущественно железистой интраэпителиальной неоплазией.

В опухолях при колит-ассоциированном колоректальном раке по сравнению с высокоустойчивыми у низкоустойчивых к недостатку кислорода животных наблюдается более высокая экспрессия генов, регулирующих ответ на гипоксию – *Hif1a* и *Vegf*, воспаление – *Tnfa*, *Il6*, *Il10* и *Tgfb*, клеточный цикл и апоптоз – *Cmet*, *Egf*, *Egfr*, *Bax*, и генов, кодирующих компоненты эпителиального барьера – *Muc1* и *Cldn7*. Темпы инициации и прогрессии колоректального рака у низкоустойчивых к гипоксии животных выше, что сопровождается более выраженными иммунными нарушениями и системным воспалительным ответом.

На моделях глиобластомы 101.8 и карциномы легких показано, что прогрессия опухолей у низкоустойчивых к гипоксии животных сопровождается развитием системного воспалительного ответа с повышением содержания провоспалительных цитокинов IL-1 β и TNF- α в сыворотке крови, уровней экспрессии *Hif1a*, *Nfkb*, *Tnfa* в печени, нейтрофильно-лимфоцитарного индекса NLR и индекса системного воспалительного ответа SIRI.

Впервые показано, что клетки крови низкоустойчивых к гипоксии животных характеризуются провоспалительным фенотипом. Установлено, что воздействие в барокамере на критической «высоте» вызывает изменение *ex vivo* продукции IL-1 β и IL-10, которое сохраняется через один месяц после определения устойчивости к гипоксии.

По сравнению с низкоустойчивыми у высокоустойчивых животных в полученных из крови неактивированных макрофагах выше экспрессия гена и содержание белка VEGF, а у низкоустойчивых к гипоксии крыс статистически значимо выше экспрессия генов провоспалительных цитокинов *Il1b* и *Tnfa* и гена *Epas1 (Hif2a)*. На активацию липополисахаридом макрофаги низкоустойчивых к гипоксии животных реагируют увеличением экспрессии *Hif1a*, содержания белка HIF-1 α , HGF и хемокинового рецептора CCR7.

При низкой устойчивости к недостатку кислорода обнаружена высокая спонтанная продукция IL-6, IL-10 и TNF- α после инкубации клеток крови *ex vivo* в течение 24 ч без гипоксического воздействия на организм в барокамере. После стимуляции клеток крови комплексным митогеном – ЛПС, фитогемагглютинином и Конканавалином А продукция IL-1 β увеличивается только у низкоустойчивых к гипоксии крыс.

Теоретическая и практическая значимость

Результаты работы имеют как теоретическую, так и практическую значимость. Теоретическая значимость исследования заключается в том, что впервые установлены и детально охарактеризованы молекулярно-биологические механизмы инициации и прогрессии колит-ассоциированного колоректального рака в зависимости от индивидуальной устойчивости к гипоксии. На моделях глиобластомы и карциномы легких выявлены различия выраженности ассоциированного с опухолевой прогрессией системного воспалительного ответа у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии животных. Полученные данные расширяют представления о молекулярно-биологических особенностях опухолевого и воспалительного процессов у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии животных. Установлено, что неактивированные и активированные липополисахаридом макрофаги у низкоустойчивых к гипоксии животных характеризуются провоспалительным фенотипом.

Полученные в работе данные вносят значительный вклад в понимание роли индивидуальной устойчивости организма к гипоксии в развитии опухолей и связанного с ними воспаления, и свидетельствуют о необходимости определения групп риска, в частности, при прогнозировании клинического течения заболевания и применении лекарственных средств, направленных на коррекцию уровня фактора, индуцируемого гипоксией – HIF. В перспективе комбинированное применение ингибиторов HIF в сочетании с хирургическими и медикаментозными методами у пациентов с учетом их индивидуальной устойчивости к гипоксии позволит повысить эффективность лечения опухолевых заболеваний.

Практическая значимость заключается в том, что в работе выявлена взаимосвязь низкой устойчивости к гипоксии, спонтанной и стимулированной комплексным митогеном (ЛПС, ФГА и КонА) продукции цитокинов IL-6, IL-10, TNF- α и IL-1 β клетками крови, и на этой основе разработан способ *ex vivo* определения индивидуальной устойчивости организма к недостатку кислорода. Полученные данные послужат основой для разработки новых персонализированных подходов к профилактике, диагностике и терапии злокачественных опухолей у людей.

Положения, выносимые на защиту

1. Темпы инициации и прогрессии опухолей и тяжести системного воспалительного ответа зависят от устойчивости организма к гипоксии, связанной с возрастом.
2. Наименее устойчивыми к гипоксии среди разных возрастных групп крыс Вистар являются препубертатные животные.
3. По сравнению с высокоустойчивыми и низкоустойчивыми к гипоксии половозрелыми у старых животных различия уровней экспрессии генов *Hif1a*, *Nfkb* и *Vegf* в печени не выражены.

4. По сравнению с высокоустойчивыми у низкоустойчивых к гипоксии половозрелых животных при экспериментальном остром и хроническом колите язвенно-воспалительный процесс более выражен, и он сопровождается формированием вторичного иммунодефицитного состояния.
5. Темпы инициации и прогрессии опухолевого процесса при экспериментальном колит-ассоциированном колоректальном раке по сравнению с высокоустойчивыми у низкоустойчивых к гипоксии мышей выше – у них больше размеры опухолей, и меньше степень их дифференцировки.
6. У низкоустойчивых к гипоксии животных при развитии колоректального рака более выражены изменения экспрессии генов, контролирующих ангиогенез, клеточный цикл и апоптоз, кодирующих компоненты эпителиального барьера, а также генов, регулирующих ответ на гипоксию и воспаление, что сопровождается системным воспалительным ответом.
7. Прогрессия опухолей у низкоустойчивых к гипоксии животных сопровождается при глиобластоме высокой гибелью и повышением содержания в сыворотке крови провоспалительных цитокинов IL-1 β и TNF- α , при карциноме легких – экспрессии *Hif1a*, *Nfkb* и *Tnfa* в печени и индекса системного воспалительного ответа SIRI.
8. Неактивированные и активированные ЛПС *in vitro* макрофаги низкоустойчивых к гипоксии животных характеризуются провоспалительным фенотипом.
9. Обнаружена высокая спонтанная продукция IL-6, IL-10 и TNF- α и стимулированная комплексным митогеном – ЛПС, ФГА и КонА продукция IL-1 β после *ex vivo* инкубации клеток крови только у низкоустойчивых к гипоксии животных.
10. Группой риска неблагоприятного течения опухолевого процесса являются животные с низкой устойчивостью к гипоксии, которые характеризуются провоспалительным фенотипом, что следует учитывать при разработке новых подходов к терапии пациентов со злокачественными опухолями.

Методология и методы исследования. Работа выполнена в лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ имени академика Б.В. Петровского». Методологически работа построена на принципах системного анализа комплекса данных. Для решения поставленных задач были применены гистологические, морфометрические, гистохимические, иммуногистохимические и культуральные методы, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, Вестерн-блоттинг, проточная цитофлуориметрия, иммуноферментный анализ, клинический и биохимический анализ крови, световая микроскопия и другие подходы, подробно охарактеризованные в разделе «Материалы и методы».

Степень достоверности данных. Представленные в работе данные получены с применением современных экспериментальных методов и подходов с использованием достаточного для статистической обработки количества животных и образцов. Полученные данные проанализированы и обработаны с помощью адекватных, стандартных статистических методов и тестов; эксперименты и результаты, представленные в работе, воспроизводимы. Достоверность результатов обоснована достаточным количеством экспериментальных групп и объемом данных для каждой из них, воспроизводимостью результатов, использованием современных адекватных поставленным цели и задачам методов исследования, критическим анализом полученных результатов в сопоставлении с актуальными литературными данными. Результаты исследования опубликованы в высокорейтинговых рецензируемых научных журналах и доложены на Всероссийских и Международных конференциях. Публикации, в которых представлены результаты работы, имеют цитирования. В литературном обзоре и разделе, посвященном обсуждению результатов, использованы современные сведения, опубликованные в специализированных научных журналах и изданиях.

Работа поддержана государственными заданиями Министерства образования и науки Российской Федерации №АААА-А17-117013050045-5 «Исследование иммуноморфологических, клеточных и молекулярных механизмов взаимосвязи воспаления и устойчивости к гипоксии» (2017-2018 гг.), №АААА-А19-119021490067-4 «Клеточные и молекулярные механизмы воспаления во взаимосвязи с устойчивостью к гипоксии и стрессорными воздействиями» (2019-2021 гг.), №122030200530-6 «Клеточные и молекулярно-биологические механизмы воспаления в развитии социально значимых заболеваний человека» (2022-2024 гг.), грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук МК-2573.2022.1.4 «Прогнозирование течения системной воспалительной реакции у старых крыс на основе исходной устойчивости к гипоксии» (2022-2023 гг.), грантом Российского научного фонда №23-25-00294 «Индивидуальная устойчивость к гипоксии и молекулярно-биологические особенности инициации опухолевого роста на экспериментальной модели колоректального рака» (2023-2024 гг.), грантом Фонда содействия инновациям УМНИК-2022 18539ГУ/2023 «Разработка диагностического набора для определения индивидуальной устойчивости к гипоксии и прогнозирования тяжести течения заболеваний человека, ассоциированных с недостатком кислорода» (2023-2024 гг.).

Личный вклад соискателя. Все исследования, представленные в диссертации, выполнены непосредственно самим соискателем либо под его руководством. Некоторые этапы работы выполнены в сотрудничестве с другими исследователями, однако во всех случаях постановку целей, задач и анализ полученных результатов осуществлял соискатель. Соискатель лично определял направления исследований, формулировал гипотезы, планировал и выполнял эксперименты, осуществлял статистическую обработку данных, написание статей и представление результатов на Всероссийских и Международных конференциях.

Апробация материалов работы. Достоверность полученных результатов подтверждается публикациями в отечественных и зарубежных рецензируемых научных журналах. Опубликованные работы в полной мере отражают содержание диссертации. По материалам диссертации опубликовано 24 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ им. М.В. Ломоносова по специальности 1.5.22. Клеточная биология, индексируемых в международных системах цитирования Web of Science, Scopus, Russian Science Citation Index. Зарегистрировано 2 патента РФ на изобретение. В статьях и патентах, опубликованных в соавторстве, основополагающий вклад принадлежит соискателю. По результатам диссертации опубликовано 43 тезиса в сборниках/материалах конференций, сделано 50 устных и стендовых докладов.

Результаты работы были представлены в виде тезисов, устных и стендовых докладов на Всероссийских и Международных конференциях, включая Всероссийскую конференцию молодых специалистов «Актуальные вопросы фундаментальной, экспериментальной и клинической морфологии» (Рязань, 2017), Международную конференцию «PhD Scientific Days 2018» (Будапешт, Венгрия, 2018), XV Конгресс Международной ассоциации морфологов (Ханты-Мансийск, 2020), 1st International Electronic Conference on Molecular Sciences: Druggable Targets of Emerging Infectious Diseases session Emerging and Re-Emerging Infectious Diseases in Human and Veterinary Medicine (онлайн, 2021), XIX Симпозиум с международным участием «Эколого-физиологические проблемы адаптации» (Казань, 2022), конференцию с Международным участием «Фундаментальные исследования stopper или driver современной онкологии» (Ростов-на-Дону, 2022), III Объединенном научном форуме физиологов, биохимиков и молекулярных биологов (Сочи, 2022), XXIV Всероссийскую конференцию с международным участием «Жизнеобеспечение при критических состояниях» (Москва, 2022), IV Всероссийскую научно-практическую конференцию с международным участием «Агаджаньяновские чтения» (Москва, 2023), Международную конференцию «PhD Scientific Days 2023» (Будапешт, Венгрия,

2023), Гомельский международный конгресс «Инфекционные болезни, микробиология и иммунология» (Гомель, Республика Беларусь, 2023), I Конгресс Международного общества клинической физиологии и патологии (ISCPP 2023) (Москва, 2023), X Юбилейный Всероссийский форум молодых исследователей «ХимБиоSeasons 2024» (Калининград, 2024), IV Балтийский симпозиум по иммунологии, молекулярной и регенеративной медицине: «Механизмы воспаления и регенерации в норме и при патологии» с международным участием (Калининград, 2024), Международную конференцию «PhD Scientific Days 2024» (Будапешт, Венгрия, 2024), II Научно-практическую конференцию «Клиническая диагностика и персонализированная медицина» (Москва, 2024), VII Международный Форум онкологии и радиотерапии «Ради жизни/For Life» (Москва, 2024), XI Всероссийский форум биотехнологий OpenBio (Новосибирск, 2024), IX Всероссийскую Конференцию по молекулярной онкологии с международным участием (Москва, 2024), XI Всероссийскую научную конференцию молодых ученых и студентов с международным участием «ВолгаМед» (Нижний Новгород, 2025), III Всероссийскую научную конференцию молодых ученых и специалистов по патофизиологии с международным участием (Москва, 2025).

За доклады по основным результатам работы на XXVII Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины-2021» (Санкт-Петербург, 2021) получен диплом II степени на секции молодых ученых «Актуальные проблемы общей патофизиологии», на Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной памятной дате института (60-летию НИИ морфологии человека им. академика А.П. Авцына) (Москва, 2021) – диплом Победителя конкурса молодых ученых (I место) в секции «Клеточная биология и регенеративная медицина» и диплом III степени в конкурсе стендовых докладов, на Всероссийской научной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии. Регенеративная биология и медицина» (Москва, 2023) – диплом Победителя конкурса молодых ученых (II место) в конкурсе стендовых докладов.

Материалы диссертации апробированы на межлабораторной конференции «НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына» ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского» 16 июня 2025 г. и на заседании кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова 24 сентября 2025 г.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, четырех основных глав («Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», «Общее обсуждение»), заключения, выводов, списка литературы и приложений. Диссертация изложена на 512 страницах и содержит 176 рисунков, 99 таблиц и 1163 источника литературы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на самцах крыс Вистар (n=486), полученных из Филиала «Столбовая» Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУН НЦБМТ ФМБА России) и мышей C57Bl/6 (n=386), полученных из Филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (Филиал ГНЦ ИБХ РАН).

Животных содержали по 6-7 особей в клетке при естественном освещении, температуре +20-22°C, относительной влажности 35-65%, свободном доступе к воде и полнорационному гранулированному комбикорму № ПК 120-2_306 для лабораторных животных по ГОСТ Р 34566-2019 (ООО «Лабораторкорм», РФ).

При работе с экспериментальными животными руководствовались Межгосударственным стандартом «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP). Термины и определения» (ГОСТ 33647-2015) и ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами», 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), а также The ARRIVE Guidelines 2.0. На проведение экспериментов получены разрешения биоэтической комиссии НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына (Протоколы №16 от 19 ноября 2015 г., №21 от 29 марта 2019 г., №33(9) от 7 февраля 2022 г., №36(12) от 28 марта 2022 г.), локального этического комитета ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского» (Протокол №11 от 20 декабря 2024 г.).

Определение устойчивости к гипоксии. Для определения устойчивости животных к гипобарической гипоксии во всех экспериментах использовали вентилируемую барокамеру, конструкция которой по техническим характеристикам соответствует требованиям, представленным в работах (Березовский, 1978; Агаджанян и соавт., 1999; Lukyanova и Kirgova, 2011; Jain et al., 2013; Kurhaluk et al., 2019). Определение устойчивости животных к гипоксии проводили однократно по «времени жизни» на критической «высоте» до появления признаков асфиксии – нарушения дыхания и принятия бокового положения. Для крыс Вистар критическая «высота» составляет 11 500 м или 157 мм рт.ст., 20,9 кПа (Агаджанян и соавт., 1999; Грек и соавт., 2007; Безруков и соавт., 2012; Tregub et al., 2013), а для мышей C57Bl/6 – 10 000 м или 198,3 мм рт.ст., 26,4 кПа (Зиновьев и соавт., 1988; Vedunova et al., 2014). Животных разделяли на три группы по устойчивости к гипоксии – ВУ, СУ и НУ. СУ животных в экспериментах не использовали (n=391), поэтому итоговое число животных, включенных в исследования, составило 481 (247 самцов крыс Вистар и 234 самца мышей C57Bl/6). Крыс Вистар выводили из экспериментов передозировкой (15 мг/кг) Золетила 100 («Virbac Sante Animale», Франция), а мышей C57Bl/6 – цервикальной дислокацией.

Материалы исследования. Кровь получали из шейных вен, для иммуноферментного анализа (ИФА) сыворотку замораживали и хранили при -70°C . Для клинического анализа и определения субпопуляционного состава клеток кровь забирали из шейных вен в пробирки с антикоагулянтом – этилендиаминтетрауксусной кислотой (КЗ-ЭДТА). Для исследования спонтанной и стимулированной продукции цитокинов кровь забирали из хвостовой вены крыс в пробирки с 15 МЕ/мл гепарина («Славянская аптека», Россия), а для выделения моноцитов смешивали с раствором Хенкса («ПанЭко», Россия), содержащим 1000 МЕ/мл гепарина («Синтез», Россия) в соотношении 1:1. Фракцию моноклеарных клеток из крови крыс выделяли методом градиентного центрифугирования с Фиколлом плотностью 1.09 («ПанЭко», Россия) при 400g и $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 30 мин (Jaatinen и Laine, 2007; Pösel et al., 2012; Lokhonina et al., 2019).

Для гистологического исследования выделяли головной мозг и правое легкое у крыс, правое и левое легкое у мышей, подкожный опухолевый узел, ободочную кишку, печень, тимус, селезенку и брыжеечные лимфатические узлы (БЛУ) у мышей.

Для ПЦР исследования фрагменты печени, опухолей ободочной кишки и перитуморальной зоны, а также осадок, полученный после центрифугирования суспензии макрофагов, помещали в фиксатор РНК IntactRNA Reagent («Евроген», Россия).

Для Вестерн-блоттинга проводили забор фрагментов печени и осадка, полученного после центрифугирования суспензии макрофагов, материал хранили в жидком азоте при -70°C .

С помощью гомогенизатора Поттера выделяли клетки из БЛУ (Winter et al., 2019) для проточной цитофлуориметрии, клетки селезенки для исследования уровня продукции цитокинов

методом ИФА (Lin et al., 2015). Для проточной цитофлуориметрии клетки из дистального отдела ободочной кишки выделяли с помощью ферментативной обработки (Weigmann et al., 2007).

Полуколичественная оценка клинических проявлений острого и хронического язвенного колита. Выраженность клинических проявлений острого и хронического колита оценивали по наличию диареи и крови в кале полуколичественным методом: 0 баллов – отсутствие проявлений; 1 балл – наличие диареи; 2 балла – наличие диареи с примесью крови.

Гистологические методы. Легкие фиксировали в жидкости Карнуа, ободочную кишку, печень, тимус, селезенку и БЛУ – в жидкости Буэна, ободочную кишку, головной мозг и подкожный опухолевый узел – в 10%-ном нейтральном забуференном формалине. После гистологической проводки по спиртам восходящей концентрации (70°, 80°, 96°, 100°) и хлороформу, фрагменты органов заливали в гистомикс, изготавливали гистологические срезы толщиной 5-8 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином. Для морфологического исследования ободочной кишки, головного мозга и легких готовили ступенчато-серийные гистологические срезы с шагом 200 мкм, окрашивали их гематоксилином и эозином.

3D реконструкция. С помощью программного обеспечения Image-Pro Premiere 3D («Media Cybernetics», США) по сканированным изображениям срезов (от 16 до 65 срезов) получали 3D реконструкцию опухолей головного мозга. Для количественной оценки размеров опухоли вычисляли размер вокселя (V_x) по формуле: $V_x = X \times Y \times Z$, где X и Y – размер пикселя в мкм, а Z – шаг между срезами (толщина среза + расстояние до следующего среза в мкм) (Мхитаров и соавт., 2015).

Морфометрические методы. На гистологических препаратах правого легкого половозрелых и старых крыс (x400) с помощью микроскопа Leica DM2500 («Leica Microsystems», Германия) проводили подсчет количества нейтрофилов в межалвеолярных перегородках в стандартном поле зрения (25 000 мкм²).

Для оценки выраженности язвенно-воспалительного процесса у мышей при остром и хроническом колите на панорамных фотографиях (x100) гистологических препаратов трех отделов ободочной кишки, окрашенных гематоксилином и эозином, в программе ImageScope M («Leica Microsystems», Австрия) измеряли протяженность язв и воспалительного инфильтрата в собственной пластинке слизистой оболочки (СПСО), длину мышечной пластинки. Рассчитывали распространенность язвенных и воспалительных изменений в процентах от длины мышечной пластинки слизистой оболочки.

Для оценки площади опухолей дистального отдела ободочной кишки фотографировали (x50) не менее 4 ступенчато-серийных гистологических срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, на микроскопе AxioPlan 2 Imaging («Carl Zeiss», Германия). В программе Adobe Photoshop CS6 («Adobe», США) обводили границы опухолей. Далее в программе Image-Pro Plus 6.0 («Media Cybernetics», США) определяли площадь выделенных опухолей.

Оценивали объемную плотность структурно-функциональных зон тимуса и селезенки (x200 и x400) методом точечного счета с использованием окулярной сетки Г.Г. Автандилова (1973). В гистологических срезах тимуса в 5 полях зрения (x200) оценивали объемные доли коркового и мозгового вещества, на всем срезе (x400) подсчитывали количество тимических телец. В гистологических срезах селезенки оценивали объемную долю красной и белой пульпы, периартериолярных лимфоидных муфт (ПАЛМ), светлых центров и маргинальных зон лимфоидных узелков.

На гистологических препаратах головного мозга методом точечного счета подсчитывали абсолютное число визуализируемых кровеносных сосудов в опухоли (x200). Площадь некрозов в опухоли оценивали с помощью программы ImageScope M («Leica Microsystems», Австрия). Измерения проводили на всей площади гистологического среза, результаты выражали в мкм².

При иммерсионном увеличении микроскопа (x1000) в препаратах подкожного опухолевого узла проводили подсчет митозов на тысячу опухолевых клеток (%). У животных, в легких которых были выявлены метастазы, проводили подсчет их площади (x50) на ступенчато-серийных гистологических срезах (от 8 до 12 срезов). Определение площадей проводили с использованием программы ImageJ (Research Services Branch of the National Institute of Mental Health, США).

Гистохимические методы. Для выявления бокаловидных клеток проводили окраску срезов ободочной кишки ализановым синим при pH 1.0 по Моури (Гистолайн, ООО «Элемент», Россия). Фотографировали (x200) участки препарата с опухолевыми изменениями и без них на микроскопе Axioplan 2 Imaging («Carl Zeiss», Германия). Выделяли участок с правильно ориентированными криптами от мышечной пластинки до просвета, участок вне опухоли и с опухолью, определяли его площадь и площадь выделенных бокаловидных клеток на нем. Рассчитывали объемную долю бокаловидных клеток как отношение площади бокаловидных клеток к общей выделенной площади.

Для анализа накопления железосодержащего пигмента гемосидерина в тканях опухоли срезы дистального отдела ободочной кишки окрашивали по Перлсу с контрастированием 3,3'-диаминобензидином (DAB) и H₂O₂ (Meguro et al., 2003).

Иммуногистохимическое исследование. Для выявления эндокринных клеток в ободочной кишке использовали антитела к хромогранину A (ab15160, «Abcam», Великобритания) и вторичные антитела с флуоресцентной меткой Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (A11008, «Invitrogen», США). Для оценки числа эндокринных клеток на микроскопе Axioplan 2 Imaging («Carl Zeiss», Германия) фотографировали (x100) участки препаратов ободочной кишки вне опухолей и с опухолями. Рассчитывали число хромогранин A-положительных клеток на мкм² площади слизистой оболочки.

Проводили иммуногистохимическое исследование дистального отдела ободочной кишки с использованием антител к EGFR (A11577, «Abclonal», Китай). В качестве вторичных антител использовали коммерческий раствор синтетического полимера, сцепленного с пероксидазой хрена – N-Histofine Simple Stain Mouse MAX PO (R) («Nichirei Bioscience Inc.», Япония). Связывание антител выявляли с помощью набора N-Histofine DAB-2V («Nichirei Bioscience Inc.», Япония).

На срезах глиобластомы проводили реакцию с первичными антителами к маркеру пролиферации белку Ki-67 (ab15580, «Abcam», Великобритания). Добавляли вторичные антитела с флуоресцентной меткой Goat Anti-Rabbit IgG H&L Alexa Fluor 488 (ab150077, «Abcam», Великобритания). Ядра окрашивали DAPI («Sigma-Aldrich», США). Подсчитывали общее число опухолевых клеток и число клеток, окрашенных Ki-67, рассчитывали процент Ki-67-положительных опухолевых клеток.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени. Выделение тотальной РНК проводили с использованием наборов RNeasy Plus Mini Kit («Qiagen», Германия) и RNA Solo («Евроген», Россия), обратную транскрипцию – MMLV RT Kit («Евроген», Россия), ПЦР в режиме реального времени – qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Россия), в соответствии с инструкциями. Экспрессию искомых генов оценивали на Real-Time амплификаторе DTrprime («ДНК-Технология», Россия) с использованием праймеров, синтезированных «Евроген» (Россия).

Вестерн-блоттинг. Для анализа относительного содержания белков проводили инкубацию с первичными антителами «Abcam» (Великобритания) к HIF-1α (ab179483, 1:1000), PHD2 (ab244389, 1:500), VEGF (ab46154, 1:1000), iNOS (ab15323, 1:1000), CCR7 (C-C Chemokine Receptor type 7, ab32527, 1:1000) и «Santa Cruz» (США) к HGF (Hepatocyte Growth Factor, sc-

13087, 1:500) и GAPDH (sc-25778, 1:1000). Окрашивание антивидовыми антителами (1:5000), конъюгированными с пероксидазой хрена («Bio-Rad», США), проводили в течение 1 ч при комнатной температуре. Проявку мембраны осуществляли с использованием набора Novex ECL («Invitrogen», США) в гель-документирующей станции ChemiDoc XRS+ («Bio-Rad», США). Интенсивность хемилюминесценции анализировали с помощью программного обеспечения ImageLab («BioRad», США).

Культуральные методы. Для индукции синтеза и секреции цитокинов суспензию клеток селезенки в концентрации 1×10^6 /мл культивировали 18 ч в 1 мл полной ростовой среды RPMI (Roswell Park Memorial Institute)-1640 с добавлением Конканавалина А (Кона) («ПанЭко», Россия) в конечной концентрации 5 мкг/мл при +37°C и 5% CO₂.

Клетки карциномы легких Льюис культивировали в 5 мл полной среды RPMI-1640 с 10% фетальной телячьей сыворотки («HiMedia Laboratories Pvt. Limited», Индия).

Моноциты периферической крови культивировали в среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия) с 10% фетальной телячьей сыворотки («РАА Lab», Австрия), 1% пенициллина-стрептомицина («ПанЭко», Россия) и фактором роста макрофагов MCSF (Macrophage Colony Stimulating Factor, «Cloud-Clone Corp.», США) в концентрации 50 нг/мл. Для провоспалительной активации макрофагов (Raza et al., 2014; Mommert et al., 2020; Wang et al., 2023) через 24 ч среду заменяли на аналогичную новую и добавляли в нее ЛПС *E. coli* O26:B6 («Sigma-Aldrich», США) в конечной концентрации 50 нг/мл. Клетки культивировали при +37°C и 5% CO₂ в течение 24 ч.

Биохимическое исследование. Прямую оценку окислительного стресса (тест FORT – Free Oxygen Radicals Testing) и антиоксидантной защиты (тест FORD – Free Oxygen Radicals Defence) в периферической крови у новорожденных, препубертатных и половозрелых крыс Вистар проводили на анализаторе «FORM Plus CR3000» («Callegary», Италия) согласно инструкциям производителя.

Клинический анализ крови. В крови определяли число эритроцитов и лейкоцитов, абсолютное и относительное количество лимфоцитов, гранулоцитов и моноцитов, а также содержание гемоглобина, средний объем эритроцита – MCV, среднее содержание гемоглобина в эритроците – MCH с помощью автоматического гематологического анализатора Mindray BC-2800Vet (Китай). Рассчитывали индексы системного воспалительного ответа – соотношение лимфоцитов к моноцитам LMR (Lymphocyte-to-Monocyte Ratio) и соотношение гранулоцитов к лимфоцитам NLR (Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio), а также SIRI – гранулоциты×моноциты/лимфоциты (Pacheco-Barcia et al., 2020; Nost et al., 2021; Kim et al., 2022).

Проточная цитофлуориметрия. Анализ субпопуляционного состава клеток периферической крови, БЛУ и опухолей ободочной кишки у мышей проводили на проточном цитофлуориметре Cytomics FC 500 («Beckman Coulter», США) с использованием антител («eBioscience», США), конъюгированных с FITC (Fluorescein Isothiocyanate), PE (Phycoerythrin), PE-Cy5 и PE-Cy7 (Phycoerythrin-Сyanine 5 и 7), к CD45+ (общий лейкоцитарный маркер), CD3e-CD19+ (В-лимфоциты), CD3e+CD4+ (Т-хелперы), CD3e+CD8a+ (цитотоксические Т-лимфоциты), CD4+CD25+FOXP3+ (регуляторные Т-лимфоциты), CD3e-NK1.1+ (NK клетки), CD11b+ (моноциты) и F4/80+ (макрофаги).

Для оценки фагоцитарной активности моноцитов периферической крови крыс Вистар применяли набор IngoFlowEx kit («Exbio Diagnostics», Чехия).

Иммунофенотип макрофагов крыс Вистар оценивали с помощью антител «Miltenyi Biotec» (Германия): CD11b-PE, CD68-PEVio770, CD86-VioBrightFITC, а также CD163-PE («Thermo Fisher Scientific», США).

Иммуноферментный анализ. В работе использовали следующие наборы: IFN-γ («eBioscience», США), TNF-α («eBioscience», США и «Cloud-Clone Corp.», Китай), IL-10 («eBioscience» и «Invitrogen», США), HIF-1α («FineTest», Китай), С-реактивный белок, IL-6, TGF-

β («Cloud-Clone Corp.», Китай), IL-1β («Cloud-Clone Corp.», Китай и «Invitrogen», США). Анализ проводили согласно инструкциям производителей. Для определения интенсивности цветовой реакции использовали микропланшетный ИФА-анализатор ANTHOS 2010 («Anthos Labtec Instruments», Австрия) и микропланшетный фотометр AMR-100 («Allsheng», Китай).

Статистические методы. Все полученные в работе данные подвергали статистической обработке. Характер распределения показателей устанавливали с помощью теста Колмогорова-Смирнова. Для установления достоверности различий использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни и критерий множественного сравнения Краскела-Уоллиса, множественное сравнение средних рангов для всех групп (Statistica 8.0, «StatSoft Inc.», США) или критерий Данна для установления различий между группами (GraphPad Prism 8, «Dotmatics», США). Для анализа категориальных данных использовали точный тест Фишера. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Показатели выражали в виде медианы и интерквартильного размаха Me (25%-75%). Данные представляли графически в программах Statistica 8.0, GraphPad Prism 8 и Microsoft Office Excel 2016 («Microsoft Corporation», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимосвязь между устойчивостью к гипоксии, окислительным стрессом и продукцией провоспалительных и противовоспалительных цитокинов у новорожденных, препубертатных и половозрелых самцов крыс Вистар

Один из первых исследователей индивидуальной устойчивости к гипоксии П. Бер (1878) обнаружил, что новорожденные животные по сравнению со взрослыми более устойчивы к недостатку O_2 . Позднее этот факт был подтвержден другими авторами (Домбровская, 1961; Колчинская, 1964; Singer et al., 1999; Dzal и Milsom, 2021). Известно, что устойчивость к гипоксии может меняться с возрастом, при этом данные о возрастных изменениях активности HIF противоречивы (Kang et al., 2005; Ndubizu et al., 2009). Задачей данной части работы было исследование взаимосвязи между «временем жизни» на критической «высоте», окислительным стрессом и продукцией провоспалительных и противовоспалительных цитокинов клетками селезенки у новорожденных, препубертатных и половозрелых крыс Вистар, чтобы установить возраст, оптимальный для оценки зависимости темпов инициации и прогрессии опухолей от устойчивости животных к гипоксии, а также разработки способов определения устойчивости к недостатку кислорода *ex vivo*.

Новорожденных, препубертатных и половозрелых крыс Вистар разделяли на две группы, у животных первой группы ($n=18$) определяли «время жизни» на «высоте» 11 500 м в барокамере, а животных второй группы ($n=18$) не подвергали воздействию гипоксии и у них проводили исследование относительного уровня экспрессии *Hif1a* и содержания белков HIF-1α и PHD2 в печени, продукции клетками селезенки провоспалительных цитокинов IFN-γ и TNF-α, противовоспалительного цитокина IL-10, уровня окислительного стресса и антиоксидантной защиты, а также определяли содержание белка HIF-1α в сыворотке крови.

Новорожденные

Установлено (табл. 1), что новорожденные крысы характеризуются большим «временем жизни» на «высоте» по сравнению с препубертатными животными, высоким уровнем экспрессии *Hif1a* в печени, сочетающимся с низким содержанием белка HIF-1α и высоким — пролилгидроксилазы PHD2 по сравнению с половозрелыми (Dzhalilova et al., 2021). Низкое содержание белка HIF-1α связано с высоким уровнем PHD2, осуществляющей деградацию белка HIF-1α. Гидроксирование пролиновых остатков субъединицы HIF-α является ключевым механизмом негативной регуляции ее активности, поскольку оно способствует протеасомной деградации HIF-α с помощью E3-убиквитин-лигазного комплекса фон Гиппеля-Линдау (Von Hippel-Lindau (pVHL) E3 Ligase Complex) (Koyasu et al., 2018; Stothers et al., 2018).

Нами у новорожденных животных выявлен низкий уровень окислительного стресса, что согласуется с данными I. Millán и соавт. (2018). Продукция клетками селезенки провоспалительных цитокинов IFN- γ и TNF- α была низкой, но высокой – противовоспалительного цитокина IL-10. Полученные результаты по уровню продукции цитокинов крысами Вистар разных возрастных групп согласуются с данными А.М. Косыревой (2018), V. Wiegeling и соавт. (2009), которые показали, что уровень продукции IFN- γ и TNF- α с возрастом увеличивается.

Таблица 1

«Время жизни» на «высоте» 11 500 м в барокамере, относительный уровень экспрессии *Hif1a*, содержание белков HIF-1 α и PHD2 в печени и содержание белка HIF-1 α в сыворотке крови, показатели свободнорадикального окисления и антиоксидантной защиты в крови, продукция цитокинов IL-10, IFN- γ и TNF- α клетками селезенки у новорожденных, препубертатных и половозрелых самцов крыс Вистар, Ме (25%-75%), р – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса и Данна

Параметры	Новорожденные ¹ (n=6)	Препубертатные ² (n=6)	Половозрелые ³ (n=6)	p<0,05
«Время жизни» на «высоте» 11 500 м, с	120,0 (90,0-190,0)	35,0 (25,0-42,5)	67,5 (55,0-242,5)	0,004 ¹⁻² 0,04 ²⁻³
<i>Hif1a</i> в печени, усл. ед., $\times 10^{-3}$	1,9 (0,9-18,4)	5,2 (2,1-8,5)	0,03 (0,01-0,04)	0,005 ¹⁻³ 0,0006 ²⁻³
Белок HIF-1 α в печени, усл. ед.	0,50 (0,38-0,74)	0,41 (0,24-0,74)	1,58 (0,91-2,74)	0,048 ¹⁻³ 0,009 ²⁻³
Белок PHD2 в печени, усл. ед.	0,21 (0,18-0,37)	0,09 (0,05-0,11)	0,08 (0,07-0,09)	0,018 ¹⁻² 0,006 ¹⁻³
Белок HIF-1 α в сыворотке крови, нг/мл	0,08 (0,06-0,09)	0,007 (0,0-0,052)	0,05 (0,04-0,13)	0,03 ¹⁻² 0,04 ²⁻³
Свободнорадикальное окисление, ммоль/л H ₂ O ₂	0,61 (0,58-0,64)	0,53 (0,43-0,61)	2,40 (2,20-3,11)	0,0075 ²⁻³
Антиоксидантная защита, ммоль/л Trolox	1,72 (1,72-1,81)	2,02 (2,0-2,02)	1,66 (1,59-1,85)	—
IL-10 в культуральной жидкости клеток селезенки, пг/мл	110,0 (81,5-175,5)	106,0 (100,5-127,7)	39,9 (31,2-44,2)	0,003 ¹⁻³ 0,006 ²⁻³
IFN- γ в культуральной жидкости клеток селезенки, пг/мл	0,0 (0,0-0,0)	20,5 (5,9-50,4)	1228,0 (205,4-2457,0)	0,01 ¹⁻² 0,000003 ¹⁻³ 0,03 ²⁻³
TNF- α в культуральной жидкости клеток селезенки, пг/мл	10,8 (1,4-13,5)	149,2 (69,9-281,8)	325,3 (254,0-456,0)	0,00004 ¹⁻² 0,0000002 ¹⁻³ 0,004 ²⁻³

Препубертатные

Наименьшее «время жизни» в барокамере на критической «высоте» было обнаружено у препубертатных самцов крыс (табл. 1). При этом уровень экспрессии *Hif1a* в печени у них был выше по сравнению с половозрелыми животными. У препубертатных крыс в печени относительное содержание белка PHD2 было ниже по сравнению с новорожденными, а белка HIF-1 α – по сравнению с половозрелыми животными. В сыворотке крови у препубертатных крыс содержание белка HIF-1 α было ниже по сравнению с новорожденными и половозрелыми. По-видимому, у препубертатных животных в регуляции деградации субъединицы HIF-1 α

доминирующую роль играют дополнительные механизмы, не связанные с активностью пролилгидроксилаз, например, KLF2 – Kruppel-Like Factor 2, RACK1 – Receptor for Activated C-Kinase 1, которые влияют на взаимодействие HIF-1 α с шапероном HSP90 и способствуют независимому от пролилгидроксилаз и pVHL разрушению HIF-1 α в протеасоме (Liu et al., 2007; Kawanami et al., 2009).

Половозрелые

«Время жизни» на критической «высоте» половозрелых самцов крыс Вистар было выше по сравнению с препубертатными животными (табл. 1). Низкий уровень экспрессии гена *Hif1a* у половозрелых крыс по сравнению с новорожденными и препубертатными, при высоком содержании белка HIF-1 α сочетался с низким содержанием PHD2 в печени в этой возрастной группе. Выявленное нами по сравнению с новорожденными и препубертатными (табл. 1) у половозрелых крыс высокое содержание белка HIF-1 α как в печени, так и в сыворотке крови, сочеталось с высокими уровнями продукции клетками селезенки провоспалительных цитокинов IFN- γ и TNF- α , и образования АФК, что подтверждает важную роль HIF в регуляции воспалительных реакций (Corrado и Fontana, 2020). При этом по сравнению с новорожденными и препубертатными крысами продукция противовоспалительного цитокина IL-10 у половозрелых животных была низкой. Для исследования особенностей течения опухолевого процесса в зависимости от устойчивости к гипоксии среди трех возрастных групп выбраны половозрелые животные, поскольку у новорожденных и препубертатных менее выражено влияние окислительного стресса и провоспалительных реакций.

Таким образом, установлены возрастные различия устойчивости к гипоксии, экспрессии гена *Hif1a*, содержания HIF-1 α в печени и сыворотке крови, и пролилгидроксилазы PHD2 в печени (Dzhalilova et al., 2021). По сравнению с новорожденными и половозрелыми крысами Вистар наименее устойчивыми к гипоксии являются препубертатные животные, которые характеризуются высоким уровнем экспрессии гена *Hif1a*, но низким содержанием белка PHD2 в печени и белка HIF-1 α в печени и сыворотке крови. Максимальный уровень окислительного стресса наблюдается у половозрелых животных, и он сопровождается повышенной продукцией провоспалительных цитокинов IFN- γ и TNF- α , но пониженной – противовоспалительного IL-10. В контексте изучения особенностей течения опухолевого процесса в зависимости от устойчивости к гипоксии целесообразно использовать половозрелых животных.

Сравнительная характеристика устойчивости к гипоксии, уровней экспрессии *Hif1a*, *Vegf* и *Nfkb* в печени, содержания белка HIF-1 α в сыворотке крови и числа нейтрофилов в легких у половозрелых и старых самцов крыс Вистар

В многочисленных работах показано, что половозрелые лабораторные животные делятся на ВУ и НУ, их молекулярно-биологические особенности достаточно хорошо изучены – показано, что они характеризуются различным уровнем экспрессии *Hif1a*, окислительного стресса, активностью ферментов антиоксидантной защиты, а также особенностями строения и функционирования митохондрий (Лукьянова, 2019; Jain et al., 2013; Kirova et al., 2013; Dzhalilova et al., 2019a). Тем не менее, в литературе отсутствуют данные об устойчивости к гипоксии старых крыс Вистар. По данным М.М. Середенко (1963) старые животные (крысы, собаки) менее устойчивы к гипоксии по сравнению с половозрелыми. При этом с возрастом увеличивается вероятность возникновения злокачественных опухолей (Montegut et al., 2024; Siegel et al., 2024). С целью выбора оптимального возрастного периода для исследования взаимосвязи устойчивости к гипоксии и опухолевого роста проведено сравнительное исследование половозрелых (10-12 недель) и старых (72 недели) крыс Вистар.

По результатам определения устойчивости к гипоксии оказалось, что старые крысы Вистар, как и половозрелые, на «высоте» 11 500 м делятся на ВУ и НУ: среди половозрелых животных (n=30) 33% оказались ВУ, 30% – НУ, среди старых крыс (n=30) – 27% ВУ и 20% НУ крыс. Через

месяц после определения устойчивости к гипоксии у ВУ и НУ половозрелых и старых животных оценивали уровни экспрессии генов *Hif1a*, *Vegf* и *Nfkb* в печени, определяли содержание белка HIF-1 α в сыворотке крови, а также число нейтрофилов в межалвеолярных перегородках легких.

Уровни экспрессии генов *Hif1a* и *Vegf* в печени были выше у половозрелых НУ крыс Вистар по сравнению с ВУ. Однако у старых животных с разной устойчивостью к гипоксии различий этих показателей не выявлено. При этом только у ВУ старых крыс уровни экспрессии генов *Hif1a* и *Vegf* в печени были выше по сравнению с половозрелыми, а у НУ они не различались. Содержание белка HIF-1 α в сыворотке крови не различалось у ВУ (49,0 (41,5-100,0) пг/мл) и НУ (47,5 (36,0-63,5) пг/мл, $p=0,89$) половозрелых и ВУ (99,2 (14,3-400,3) пг/мл) и НУ (13,8 (9,7-42,6) пг/мл, $p=0,34$) старых крыс. Как у ВУ, так и у НУ старых животных число нейтрофилов в межалвеолярных перегородках легких было выше по сравнению с ВУ и НУ половозрелыми крысами, а уровень экспрессии гена *Nfkb* в печени не различался как у половозрелых, так и у старых животных с разной устойчивостью к гипоксии.

В литературе представлены данные как об увеличении, так и о снижении уровней экспрессии гена и содержания белка HIF-1 α с возрастом (Kang et al., 2005; Ndubizu et al., 2009). О.И. Ndubizu и соавт. (2009) показали, что с возрастом в ответ на гипоксию уменьшался синтез HIF-1 α и зависимых белков (VEGF, GLUT-1, EPO) в коре головного мозга крыс, однако уровень экспрессии гена, кодирующего HIF-1 α , не изменялся. Однако по данным М.Ж. Kang и соавт. (2005) в печени крыс содержание белка HIF-1 α и HIF-зависимых белков, таких как VEGF, EPO и iNOS, а также ДНК-связывающая активность HIF-1 α с возрастом увеличивались. Противоречивость данных может быть связана с различиями в исходной устойчивости организмов к гипоксии, которая не учитывалась в этих исследованиях.

По данным проведенных нами исследований (Джалилова и соавт., 2023) показано, что среди половозрелых и старых животных на «высоте» 11 500 м можно выделить ВУ и НУ. У половозрелых животных устойчивость к недостатку кислорода сопряжена с различиями в экспрессии *Hif1a* и *Vegf* в печени в условиях нормоксии – у НУ крыс их экспрессия выше, в то время как у старых ВУ и НУ крыс различий не выявлено. Поэтому для выявления возможных различий в механизмах опухолевого роста между ВУ и НУ животными исследования целесообразно проводить на половозрелых особях.

Сравнительная морфологическая и молекулярно-биологическая характеристика острого, хронического колита и колит-ассоциированного колоректального рака у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6

Наиболее широко используемой и высоковоспроизводимой моделью злокачественного опухолевого процесса на фоне хронического воспаления является модель колит-ассоциированного КРР у мышей (Li et al., 2022; Dzhililova et al., 2023). Язвенный колит (ЯК) – это воспалительное заболевание кишечника (ВЗК), которое увеличивает риск развития КРР в 2,4 раза (Jess et al., 2012). В 2023 г. распространенность ЯК составила 5 млн случаев во всем мире, и показатели неуклонно растут, а его патогенез и инициация опухолевого процесса на его фоне до конца не изучены (Le Berre et al., 2023; Chen et al., 2024). Модель ЯК, индуцированного заменой питьевой воды на декстрансульфат натрия (ДСН), у мышей широко используется для изучения связанного с колитом канцерогенеза и является релевантной моделью, позволяющей экстраполировать данные на человека (Xu et al., 2021; Yang и Merlin, 2024). Установлено, что клинические проявления и морфологические изменения в ободочной кишке имеют индивидуальную вариабельность, отличаются у мышей разных линий и зависят от пола (Абдулаева и соавт., 2013; Гао и соавт., 2015; Melgar et al., 2005). Одним из возможных механизмов, обуславливающих индивидуальную вариабельность тяжести течения острого и хронического колита, может быть устойчивость к гипоксии, так как воспаление сопровождается кислородной недостаточностью и активацией HIF-1 α и NF- κ B (Dvornikova et al., 2023; Hou et al.,

2024). Однако особенности течения острого и хронического ЯК в зависимости от устойчивости организма к недостатку кислорода не изучены. Поэтому перед моделированием КРР были проведены эксперименты по выявлению различий тяжести течения язвенно-воспалительного процесса при остром и хроническом колите у ВУ и НУ мышей.

Для индукции острого колита по I. Okayasu и соавт. (1990) у ВУ (n=20) и НУ (n=12) мышей опытных групп питьевую воду на 5 сут заменяли 1,5%-ым водным раствором ДСН молекулярной массой 40 кДа («AppliChem», Германия). ВУ (n=6) и НУ (n=6) мыши контрольных групп на протяжении всего эксперимента потребляли питьевую воду. Животных выводили из эксперимента через 7 сут после начала потребления ДСН. Для индукции хронического колита по S. Melgar и соавт. (2005) у ВУ (n=18) и НУ (n=11) мышей опытных групп питьевую воду заменяли на 1%-ый ДСН по следующей схеме: ДСН на 1-4-е сут эксперимента, питьевая вода в течение 7 сут, ДСН на 12-14-е сут, питьевая вода в течение 7 сут, и ДСН на 22-26-е сут, затем питьевая вода в течение 34 сут. ВУ (n=5) и НУ (n=6) мыши контрольных групп на протяжении всего эксперимента потребляли питьевую воду. Животных выводили из эксперимента через 60 сут после начала потребления ДСН. Оценивали клинические проявления острого и хронического колита, гибель мышей, изменение массы тела и длины ободочной кишки, проводили морфологическое и морфометрическое исследование ободочной кишки, а также тимуса и селезенки, определяли субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови.

Острый колит (ОК)

По результатам определения устойчивости к гипоксии в барокамере по «времени жизни» на «высоте» 10 000 м среди половозрелых мышей C57Bl/6 (n=80) 32,5% оказались ВУ, 22,5% – НУ. При ОК гибели ВУ и НУ мышей не наблюдалось. По результатам полуколичественной оценки в баллах выраженности клинических проявлений ОК (наличие диареи и примеси крови в кале) у НУ мышей по сравнению с ВУ показатели были статистически значимо выше ($p=0,03$) на 7-е сут эксперимента. На 7-е сут после начала потребления ДСН наблюдалось уменьшение длины ободочной кишки и снижение массы тела как у ВУ, так и у НУ мышей. Показано, что относительная распространенность язв с фибрином в слизистой оболочке медиального отдела ободочной кишки у НУ животных была статистически значимо выше ($p=0,002$) по сравнению с ВУ. Относительная распространенность язв без эпителизации была ниже в проксимальном отделе ободочной кишки у ВУ животных (0,0 (0,0-1,3)%) по сравнению с НУ (2,3 (0,3-3,5)%, $p=0,01$), а эпителизованных язв в медиальном отделе, напротив, выше (рис. 1), что свидетельствует о более выраженных репаративных процессах у ВУ мышей и согласуется с данными М.А. Диатроптовой и соавт. (2023), которыми показано, что у ВУ животных выше пролиферативная активность клеток грануляционной ткани в полнослойной кожной ране.

По данным проточной цитофлуориметрии в контрольной группе НУ мышей было выше абсолютное число В-лимфоцитов и Т-регуляторных клеток по сравнению с ВУ. При ОК только у НУ животных развивался транзиторный вторичный иммунодефицит: в тимусе выявлено сужение коркового вещества долек и увеличение количества тимических телец, состоящих из 5 и более клеток, объемная доля белой пульпы и лимфоидных узелков селезенки была ниже по сравнению с ВУ мышами. В периферической крови у НУ животных наблюдалось выраженное снижение количества Т-лимфоцитов, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, Т-регуляторных лимфоцитов и В-лимфоцитов (рис. 1). При ОК в зависимости от его тяжести у мышей развиваются иммунодефицитные состояния разной выраженности (Постовалова, 2018), однако индивидуальная устойчивость животных к гипоксии автором не учитывалась. Уменьшение абсолютного количества основных субпопуляций лимфоцитов в крови при ОК у НУ мышей обусловлено нарушениями их дифференцировки, миграцией и гибелью иммунных клеток (Hall et al., 2011), и отражает формирование транзиторного вторичного иммунодефицита (Хаитов и Пинегин, 1999; Tuano et al., 2021). При ОК как у ВУ, так и у НУ животных наблюдалось

расширение светлых центров лимфоидных узелков селезенки, что свидетельствует о повышении антигенной стимуляции из-за нарушения эпителиального барьера кишки (Bronte и Pittet, 2013; Kałużna et al., 2022).

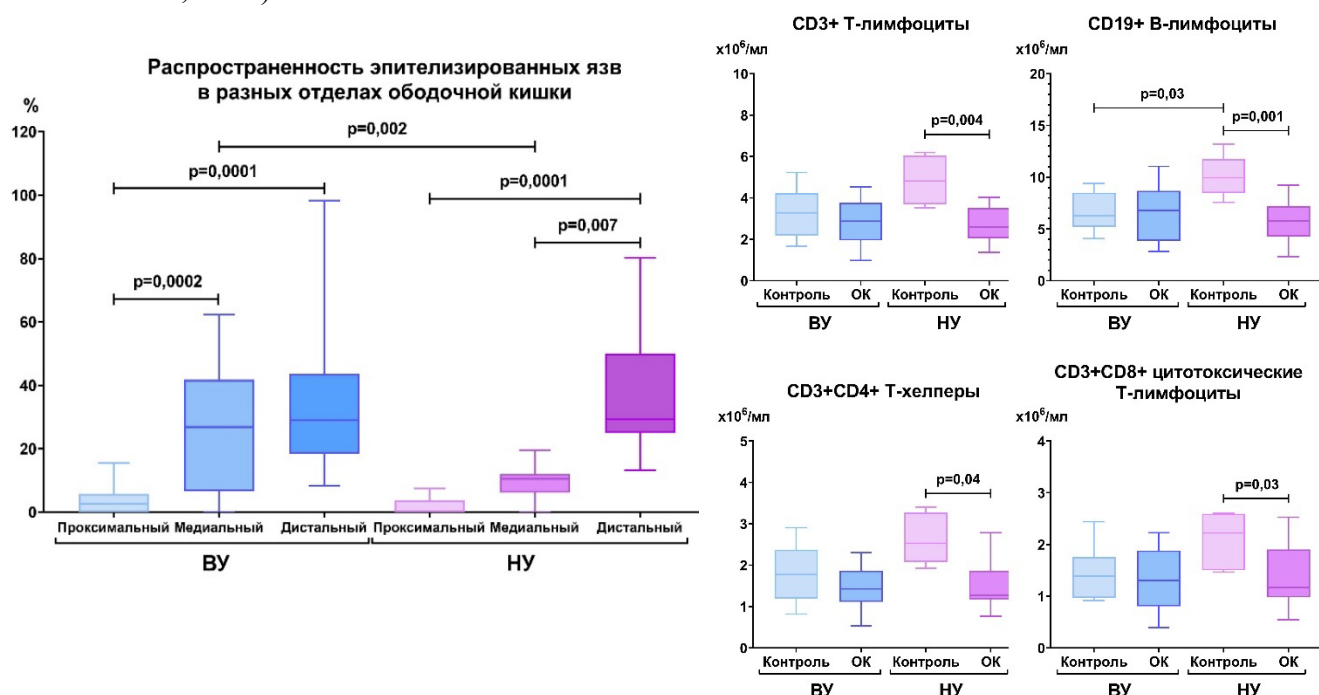


Рис. 1. Относительная распространенность язв (% к длине ободочной кишки) с эпителизацией в проксимальном, медиальном и дистальном отделах ободочной кишки, и субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови при остром колите (ОК) у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

Таким образом, показано (Джалилова и соавт., 2018, 2024), что при ОК по сравнению с ВУ животными НУ характеризовались более выраженными клиническими проявлениями, большей распространенностью язвенно-воспалительного процесса в ободочной кишке. У НУ животных наблюдалось развитие транзиторного вторичного иммунодефицита, в то время как у ВУ мышей выявлено только расширение светлых центров лимфоидных узелков селезенки.

Хронический колит (ХК)

По результатам определения устойчивости к гипоксии в барокамере по «времени жизни» на «высоте» 10 000 м среди половозрелых мышей C57Bl/6 (n=64) 36% оказались ВУ, 26,5% – НУ. При ХК гибель ВУ животных составила 16,7% (3 из 18), в то время как НУ – 54,5% (6 из 11), показатели статистически значимо различались (p=0,043). По результатам полуколичественной оценки на 14-е сут эксперимента по сравнению с ВУ животными клинические проявления ХК у НУ мышей были более выраженными (p=0,0015). Только у НУ животных наблюдалось статистически значимое снижение массы тела на 14-е сут эксперимента по сравнению с контрольной группой, на 14-е (p=0,00003) и 27-е (p=0,04) сут она была ниже по сравнению с ВУ мышами. По данным литературы более выраженные клинические проявления колита – высокая гибель, снижение массы тела, наличие диареи и крови в кале – свидетельствуют о более тяжелом течении заболевания (Karhausen et al., 2004). В слизистой оболочке ободочной кишки у мышей обеих опытных групп выявлены признаки, характерные для ХК (Золотова и Макарова, 2020) – нарушение гистоархитектоники крипт, увеличение расстояния между основанием крипт и мышечной пластинкой за счет воспалительной инфильтрации лимфоцитами, гистиоцитами и плазматическими клетками. Относительная распространенность эпителизированных язв и язв без эпителизации не различалась в разных отделах ободочной кишки у ВУ и НУ мышей. Относительная распространенность воспалительного инфильтрата в СПСО проксимального

отдела ободочной кишки у НУ мышей была в 2,7 раза выше по сравнению с ВУ (рис. 2), что свидетельствует о более тяжелом течении у них ХК.

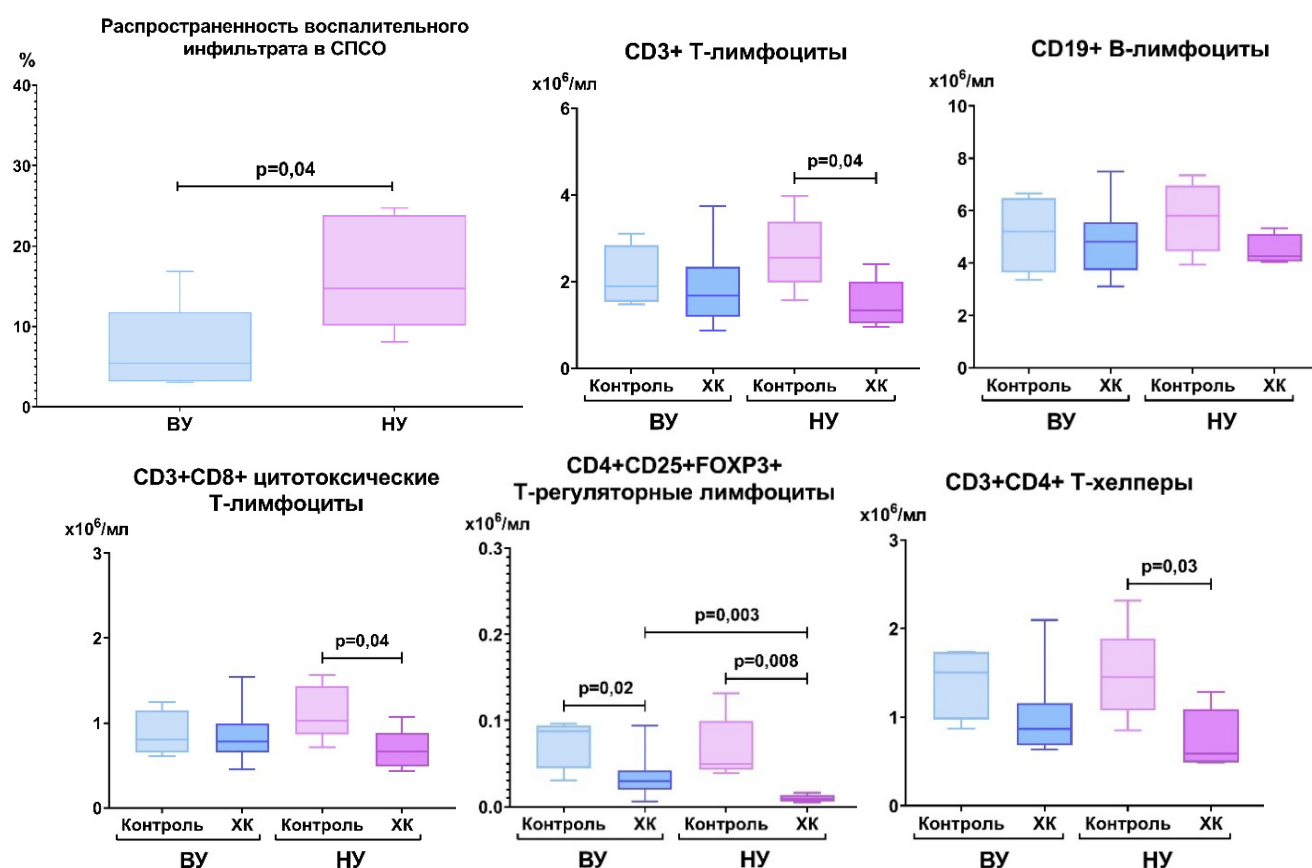


Рис. 2. Относительная распространенность воспалительного инфильтрата в СПСО проксимального отдела ободочной кишки и субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови при хроническом колите (ХК) у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6, Ме (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

По нашим данным при ХК в тимусе только у НУ мышей обнаружена гиперплазия коркового вещества долек и увеличение числа телец с кератогиалином, что характерно для хронического воспалительного процесса (Makarova et al., 2012). При морфометрическом исследовании селезенки показано, что при ХК показатель объемной доли светлых центров лимфоидных узелков у НУ мышей (26,1 (25,3-30,1)%) был выше по сравнению с ВУ животными (19,0 (16,3-21,4)%, $p=0,03$), что сопровождалось увеличением относительного числа В-лимфоцитов в крови. Гиперплазия коркового вещества тимуса и выявленное уменьшение абсолютного и относительного количества основных субпопуляций Т-лимфоцитов (Т-лимфоцитов, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов и Т-регуляторных лимфоцитов) в крови у НУ мышей при ХК (рис. 2) свидетельствует о развитии компенсированного вторичного иммунодефицита. У ВУ мышей при ХК выявлен дисбаланс субпопуляций Т-лимфоцитов – снижение относительного числа Т-лимфоцитов, Т-хелперов и абсолютного количества Т-регуляторных клеток. По сравнению с НУ у ВУ мышей при ХК в крови обнаружено большее абсолютное и относительное число регуляторных Т-лимфоцитов (в 3,3 и 1,7 раз соответственно). По данным литературы регуляторные Т-клетки оказывают иммуносупрессивное действие при ЯК, продуцируя противовоспалительные цитокины IL-10 и TGF- β , их повышение считается благоприятным прогностическим маркером (Guidi et al., 2013; Pedros et al., 2016). При активных формах ВЗК у человека выявлено уменьшение CD4+CD25+FOXP3+ Т-регуляторных лимфоцитов в периферической крови (Jalalvand et al., 2023).

Таким образом, по сравнению с ВУ НУ мыши характеризовались более тяжелым течением ХК: высокой гибелью животных, более выраженными клиническими проявлениями, снижением массы тела, большей распространенностью воспалительного инфильтрата в проксимальном отделе ободочной кишки. У НУ мышей наблюдалось развитие компенсированного вторичного иммунодефицита, в то время как у ВУ выявлен дисбаланс субпопуляций Т-лимфоцитов (Джалилова и соавт., 2018, 2024).

Колит-ассоциированный колоректальный рак

Среди всех опухолей КРР занимает третье место по заболеваемости и второе по смертности в мире (Bray et al., 2024). Для изучения особенностей патогенеза КРР используют различные экспериментальные модели, наиболее распространенной и высоковоспроизводимой является химически индуцируемая модель опухолей толстой кишки. Использование канцерогена азоксиметана (АОМ) в сочетании с провоспалительным агентом ДСН вызывает развитие опухолей толстой кишки, сходных с таковыми у человека по их локализации и морфологической характеристике (Tanimura et al., 2021; Deng et al., 2022; Dzhililova et al., 2023).

Через месяц после определения устойчивости к гипоксии у ВУ (n=20) и НУ (n=13) мышей опытных групп моделировали КРР путем внутрибрюшинного введения АОМ (A5486-25MG, «Sigma-Aldrich», США) в дозе 10 мг/кг (Suzuki et al., 2015; Tanimura et al., 2021; Deng et al., 2022). Через 7 сут после инъекции АОМ животным опытных групп питьевую воду заменяли на 1%-ый ДСН на 7 сут. Затем на 14 сут ДСН заменяли на питьевую воду, после чего – на 0,5%-ый ДСН на 7 сут. После этого мыши снова потребляли питьевую воду 14 сут, затем – 0,5%-ый ДСН 5 сут. Животных выводили из эксперимента через 16 сут после последней замены ДСН на питьевую воду, то есть через 70 сут после введения АОМ (Martínez-Gregorio et al., 2022). ВУ (n=5) и НУ (n=5) мышам контрольных групп внутрибрюшинно вводили физиологический раствор, затем на протяжении 70 сут они потребляли питьевую воду.

Через 70 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН при микроскопическом исследовании в ободочной кишке опухоли были выявлены у 65% ВУ (13 из 20) и 69% НУ (9 из 13) мышей. Опухоли были представлены железистой интраэпителиальной неоплазией, а также аденокарциномами, частота их развития и площадь не различались между ВУ и НУ мышами. По сравнению с контрольными группами как у ВУ, так и у НУ мышей количество эритроцитов и содержание гемоглобина снижались, при этом только у ВУ животных – повышалось относительное количество моноцитов, а у НУ – уменьшалось абсолютное число лимфоцитов и моноцитов.

Поскольку через 70 сут после введения АОМ частота развития, площадь опухолей и их морфологические варианты не различались между ВУ и НУ мышами (Джалилова и соавт., 2024), с целью оценки прогрессии опухолей в сравниваемых группах было проведено исследование через 140 сут. Через месяц после определения устойчивости к гипоксии у ВУ (n=17) и НУ (n=10) мышей моделировали КРР по охарактеризованной выше схеме, животных выводили из эксперимента через 86 сут после последней замены ДСН на питьевую воду у мышей опытных групп, то есть через 140 сут после введения АОМ (Tanimura et al., 2021). ВУ (n=5) и НУ (n=5) мышам контрольных групп внутрибрюшинно вводили физиологический раствор, затем на протяжении 140 сут они потребляли питьевую воду. Оценивали динамику массы тела, частоту развития и площадь опухолей, проводили морфологическое исследование дистального отдела ободочной кишки, печени, легких и БЛУ, а также морфологическое и морфометрическое исследование тимуса и селезенки. Проводили ПЦР в режиме реального времени, проточную цитофлуориметрию, ИФА, клинический анализ крови, гистохимическое и иммуногистохимическое исследование дистального отдела ободочной кишки.

Через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН при микроскопическом исследовании в дистальном отделе ободочной кишки опухоли были

выявлены у 41% ВУ (7 из 17) и у 80% НУ (8 из 10) мышей, в медиальном – у 12% ВУ (2 из 17) и у 10% НУ (1 из 10), в проксимальном отделе как у ВУ, так и у НУ животных опухоли не выявлены. Макроскопически при бинокулярном увеличении (x7) опухоли были представлены четко визуализируемыми полиповидными новообразованиями, которые значительно возвышались над поверхностью слизистой оболочки, и незначительно выступающими образованиями – слегка приподнятыми над поверхностью слизистой оболочки участками розового цвета с зернистой поверхностью.

Оценка морфологических изменений ободочной кишки

При морфологическом исследовании ободочной кишки у ВУ и НУ мышей контрольных групп патологических изменений не выявлено. Эпителиальная выстилка слизистой оболочки сохранена на всем протяжении, крипты глубокие, просветы их узкие (рис. 3, А, Б), различий между ВУ и НУ животными контрольных групп не обнаружено.

В дистальном отделе ободочной кишки опухоли у ВУ мышей опытной группы были представлены железистой интраэпителиальной неоплазией – 86% (6 из 7), а также аденокарциномами – 14% (1 из 7). При этом у НУ животных 100% опухолей (8 из 8) были представлены аденокарциномами. Железистая интраэпителиальная неоплазия характеризовалась небольшими очагами укрупненных крипт, выстланных полиморфными атипичными клетками с гиперхромными ядрами (рис. 3, В). Все очаги железистой интраэпителиальной неоплазии располагались в пределах эпителиальной выстилки крипт. Аденокарциномы имели экзофитный рост и микроскопически были представлены множеством желез, выстланных пролиферирующими атипичными клетками, определялись крипт-абсцессы – просветы крипт заполнены слизью с большим количеством нейтрофилов (рис. 3, Г-Е). Строма опухолей была представлена соединительной тканью с частично упорядоченно расположенными тонкими волокнами, отмечалась диффузная инфильтрация соединительной ткани нейтрофилами, лимфоцитами и гистиоцитами. Ни в одном из наблюдений не выявлено прорастания опухоли в подслизистую основу.

По данным морфометрического исследования ступенчато-серийных гистологических срезов ободочной кишки площадь опухолей была статистически значимо ($p=0,02$) выше у НУ животных ($3,92 (2,86-11,59) \text{ мм}^2$) по сравнению с ВУ ($0,27 (0,05-2,29) \text{ мм}^2$).

Молекулярно-биологическое исследование слизистой оболочки ободочной кишки, тканей опухолей и перитуморальной зоны

В тканях дистального отдела ободочной кишки мышей контрольных групп, а также в тканях опухоли и перитуморальной зоны у ВУ и НУ мышей опытных групп оценивали изменения экспрессии ряда генов: регулирующих ответ на гипоксию – *Hif1a*, *Epas1* (*Hif2a*), *Hif3a* и *Vegf*, и воспаление – *Nfkb*, *Tnfa*, *Il1b*, *Il6*, *Il10* и *Tgfb*, клеточный цикл и апоптоз – *Trp53*, *Pten*, *Egf*, *Egfr*, *Pcna*, *Mki67*, *Cmet*, *Bax* и *Bcl2*, генов, кодирующих компоненты эпителиального барьера – *Muc1*, *Muc13*, *Cldn2* и *Cldn7* (рис. 4-6).

Гены, регулирующие ответ на гипоксию. Уровни экспрессии генов *Hif1a* и *Hif3a* в контрольной группе были выше у НУ животных по сравнению с ВУ, а генов *Epas1* и *Vegf* статистически значимо не различались (рис. 4). Только у НУ мышей в опухолях относительно контрольной группы повышалась экспрессия *Vegf* и снижалась – *Hif3a*, а изменений экспрессии *Hif1a* и *Epas1* у этих животных не выявлено ни в тканях опухолей, ни в перитуморальной зоне. Уровни экспрессии *Hif3a* и *Vegf* в опухолях были выше у НУ животных по сравнению с ВУ. Более высокая экспрессия *Hif3a* и *Vegf* в опухолях у НУ особей по сравнению с ВУ отражает активацию ангиогенеза, что характеризует более позднюю стадию опухолевой прогрессии (Jaskiewicz et al., 2022).

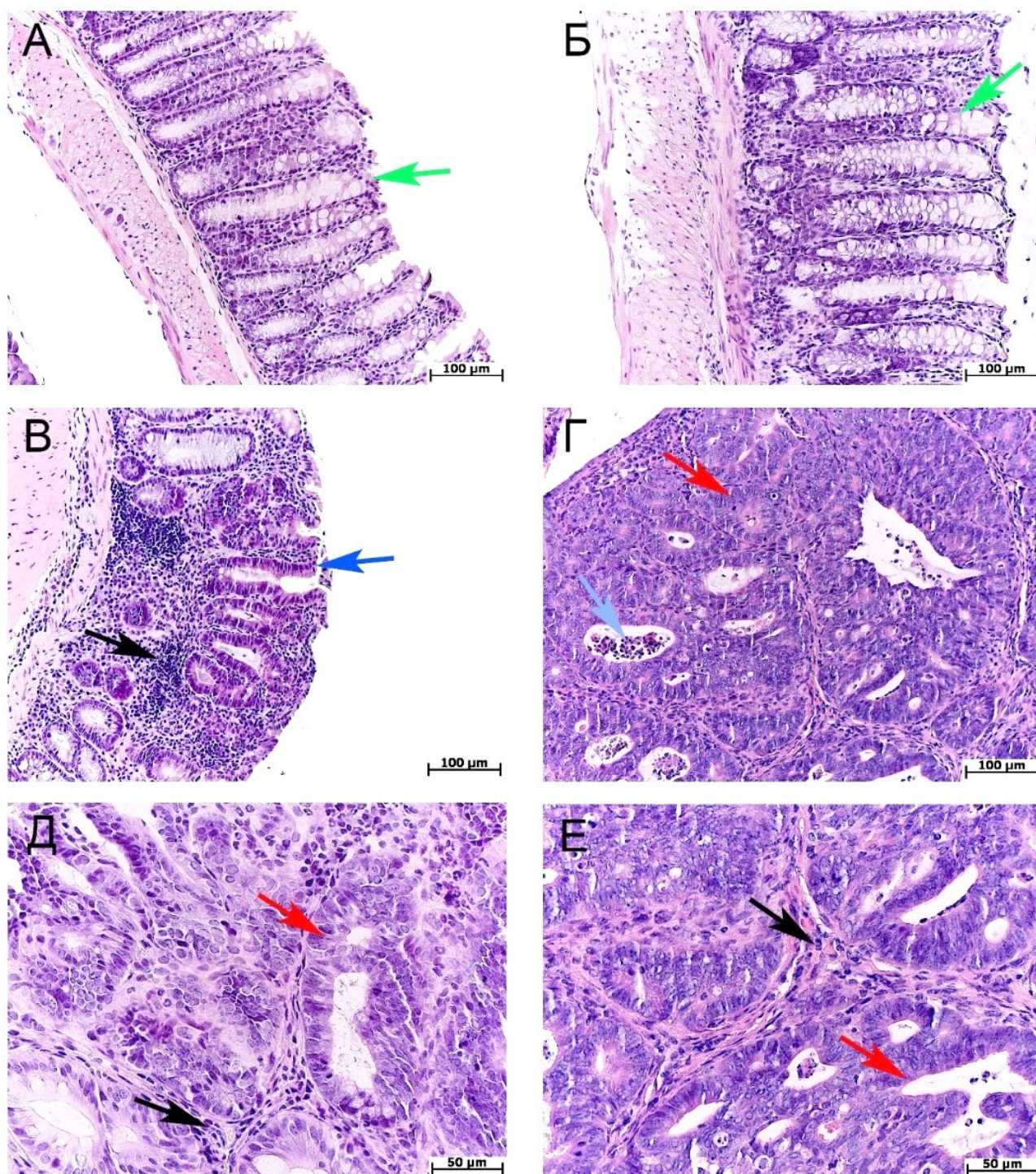


Рис. 3. Морфологическая характеристика дистального отдела ободочной кишки у ВУ и НУ мышей контрольных (А, Б) и опытных групп через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН (В-Е). А, В, Д – ВУ; Б, Г, Е – НУ. А, Б – эпителиальная выстилка сохранена, крипты глубокие и узкие (зеленые стрелки), много бокаловидных клеток, лимфатические сосуды щелевидные, подслизистая основа узкая, в ней небольшое количество клеток; В – железистая интраэпителиальная неоплазия, скопления нескольких крипт с расширенными и деформированными просветами, выстланные гиперхромными полиморфными клетками эпителия (синяя стрелка), воспалительная инфильтрация в СПСО (черная стрелка); Г-Е – аденокарцинома, выраженная атипия клеток (красные стрелки), нарушение архитектоники крипт, единичные митозы, крипт-абсцессы (голубая стрелка), воспалительная инфильтрация в соединительной ткани опухоли (черные стрелки). Окраска гематоксилином и эозином

Гены, регулирующие воспалительный ответ. В контрольной группе у НУ мышей по сравнению с ВУ наблюдалась более высокая экспрессия генов *Nfkb* и *Il10*. По сравнению с контрольной группой у ВУ мышей были выше уровни экспрессии генов *Nfkb* и *Il1b* в опухолях,

Il1b и *Il10* – в перитуморальной зоне, а у НУ животных – уровни экспрессии *Tnfa* и *Il6* в ткани опухолей и *Il1b* как в опухолях, так и в перитуморальной зоне. При этом в ткани опухолей у НУ мышей уровни экспрессии противовоспалительных цитокинов *Il10* и *Tgfb* были статистически значимо выше, чем у ВУ (рис. 4). Более высокий уровень противовоспалительных цитокинов *Il10* и *Tgfb* у НУ животных по сравнению с ВУ может быть обусловлен компенсаторной реакцией в ответ на повышение уровня провоспалительных цитокинов, а также индуцированной опухолью иммуносупрессией (Saraiva и O’Garra, 2010; Yun et al., 2019; de Streel и Lucas, 2021).

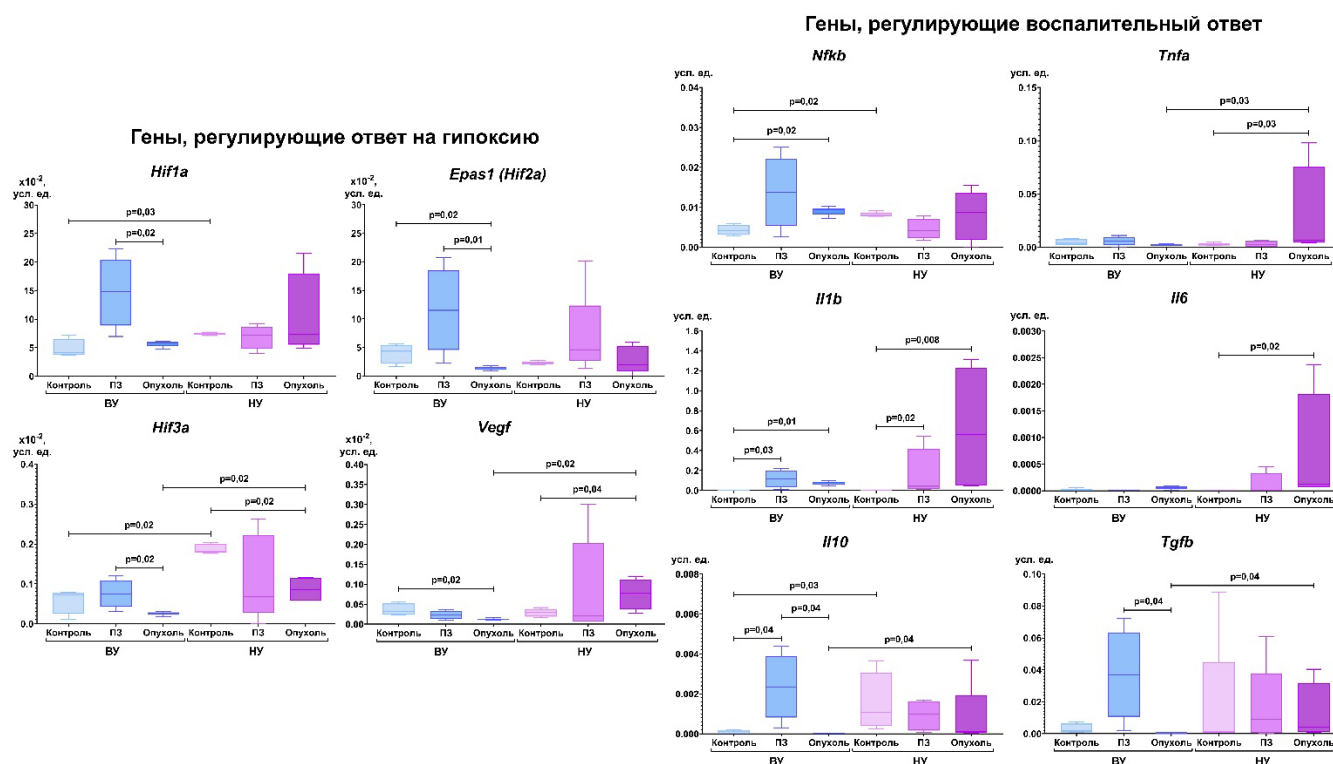


Рис. 4. Уровни экспрессии генов *Hif1a*, *Epas1* (*Hif2a*), *Hif3a*, *Vegf*, *Nfkb*, *Tnfa*, *Il1b*, *Il6*, *Il10* и *Tgfb* в дистальном отделе ободочной кишки у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6 контрольных групп и через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН, Ме (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни. ПЗ – ткань перитуморальной зоны у мышей опытных групп

Гены, регулирующие клеточный цикл и апоптоз. Рост опухоли сопровождается активной пролиферацией клеток, ингибированием апоптоза и нарушением процессов дифференцировки (Sobti et al., 2024). По сравнению с ВУ особями в контрольной группе у НУ мышей была выше экспрессия гена *Trp53* и снижена – *Pten*, *Egfr* и *Cmet*. В тканях опухоли и перитуморальной зоны у НУ животных по сравнению с контрольной группой выявлено увеличение уровней экспрессии генов, регулирующих клеточный цикл – *Egfr*, *Egfr* и *Pcna*, экспрессия *Pten* и *Cmet* возрастала только в опухоли, а *Mki67* – в перитуморальной зоне. Уровни экспрессии *Egfr*, *Egfr* и *Cmet* в ткани опухоли и *Egfr* в перитуморальной зоне были статистически значимо ниже у ВУ мышей по сравнению с НУ (рис. 5). EGFR является рецептором для EGF, при связывании с которым в клетках запускаются сигнальные каскады, приводящие к пролиферации и миграции, такие как PI3K/AKT/mTOR (Ghosh et al., 2010). Повышенное содержание EGFR взаимосвязано с неблагоприятным прогнозом у пациентов с КРП (Pabla et al., 2015).

В контрольной группе у НУ мышей по сравнению с ВУ соотношение *Bax/Bcl2* было выше, а при КРП снижалось только у НУ животных. Показано, что снижение соотношения *Bax/Bcl2* является негативным прогностическим маркером и может свидетельствовать о быстро прогрессирующем характере роста опухоли (Hemminki et al., 2010; Khodapasand et al., 2015).

Гены, регулирующие клеточный цикл и апоптоз

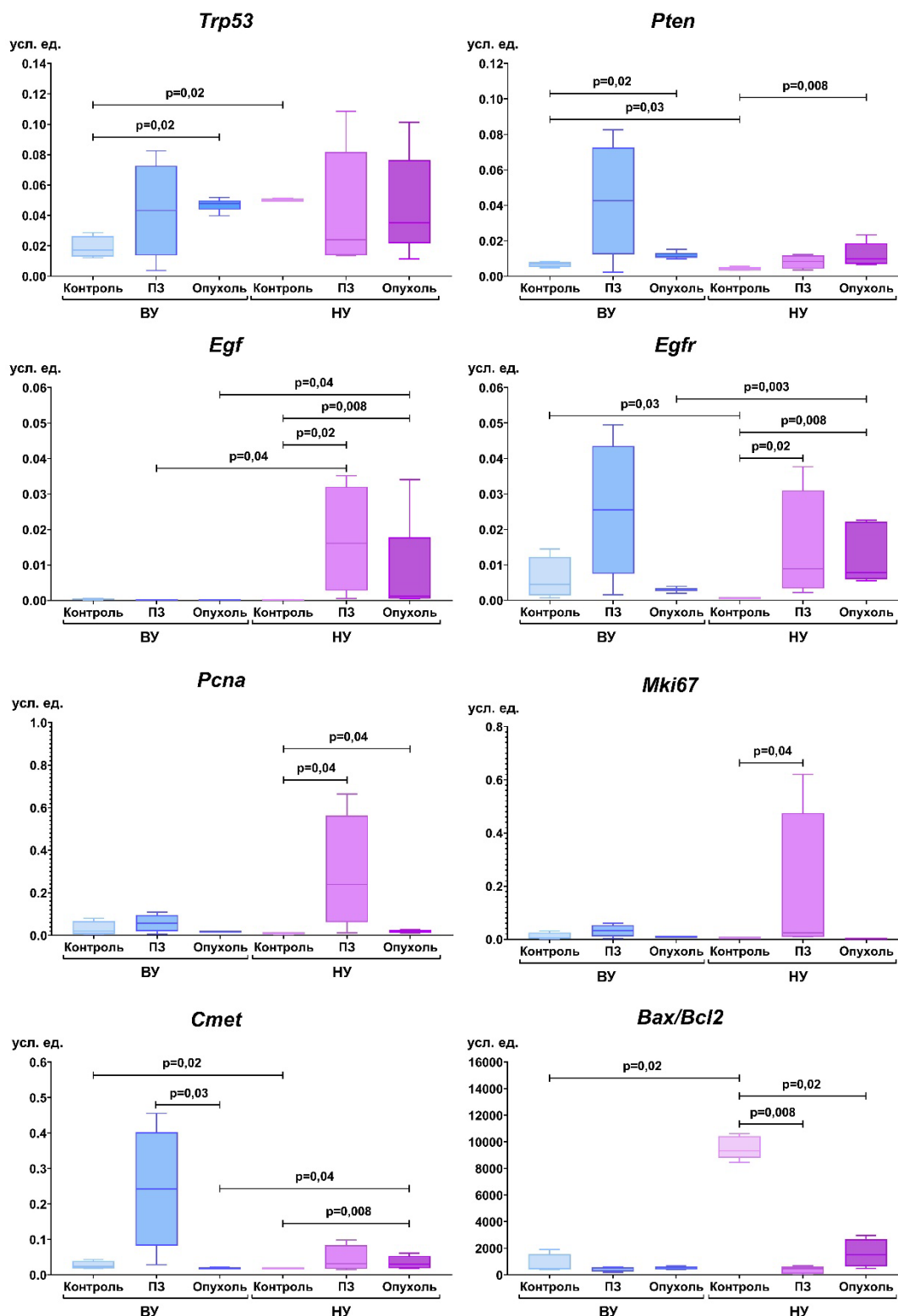


Рис. 5. Уровни экспрессии генов *Trp53*, *Pten*, *Egf*, *Egfr*, *Pcnα*, *Mki67*, *Cmet* и соотношение *Bax/Bcl2* в дистальном отделе ободочной кишки у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6 контрольных групп и через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН, Ме (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни. ПЗ – ткань перитуморальной зоны у мышей опытных групп

Гены, кодирующие компоненты эпителиального барьера. В развитии ВЗК и колит-ассоциированного КРР важную роль играет нарушение барьерной функции эпителия (Antoni et al., 2014). При исследовании уровней экспрессии генов, кодирующих муцины и белки плотных

контактов клаудины, у НУ мышей контрольной группы была выше экспрессия *Cldn2*, но ниже *Muc1*, *Muc13* и *Cldn7* по сравнению с ВУ. При КРР у ВУ мышей выявлено снижение экспрессии *Muc13* и увеличение экспрессии *Cldn2* в тканях опухолей по сравнению с контрольной группой (рис. 6).

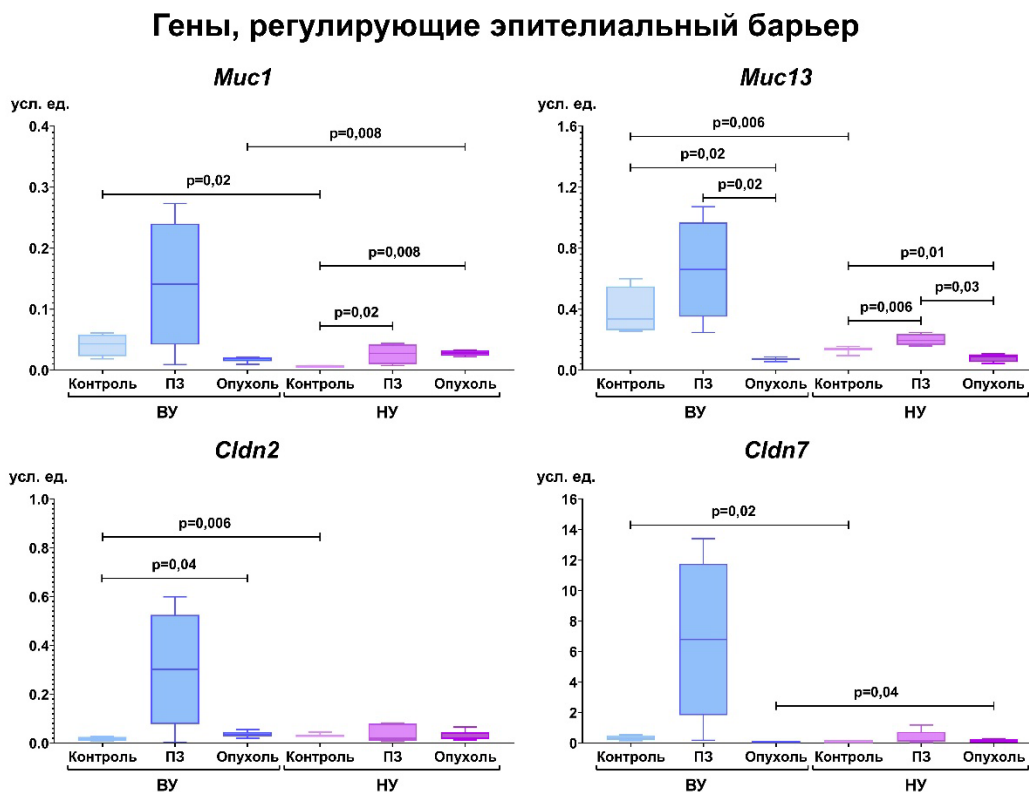


Рис. 6. Уровни экспрессии генов *Muc1*, *Muc13*, *Cldn2* и *Cldn7* в дистальном отделе ободочной кишки у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6 контрольных групп и через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН, Ме (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни. ПЗ – ткань перитуморальной зоны у мышей опытных групп

В свою очередь, по сравнению с контрольной группой в опухолях и перитуморальной зоне у НУ мышей обнаружено статистически значимое увеличение экспрессии *Muc1*, в перитуморальной зоне – увеличение экспрессии *Muc13*, но снижение его экспрессии в опухолях. Более высокая экспрессия *Muc1* и *Cldn7* выявлена в опухолях у НУ мышей по сравнению с ВУ (рис. 6). Высокая экспрессия *Muc1* в процессе развития опухоли связана с увеличением экспрессии *Egfr*, усилением пролиферации клеток и неблагоприятным прогнозом (Engel et al., 2016; Pinzón Martín et al., 2019; Szlendak et al., 2020).

Таким образом, в слизистой оболочке дистального отдела ободочной кишки у НУ мышей **контрольной группы** выявлены более высокие уровни экспрессии генов, регулирующих ответ на гипоксию – *Hif1a*, *Hif3a*, воспаление – *Nfkb*, *Il10*, клеточный цикл и апоптоз – *Trp53*, *Bax*, компоненты эпителиального барьера – *Cldn2*, в то время как у ВУ была выше экспрессия генов, регулирующих клеточный цикл и апоптоз – *Pten*, *Cmet*, *Egfr*, *Bcl2*, и кодирующих компоненты эпителиального барьера – *Muc1*, *Muc13* и *Cldn7*.

В тканях опухолей у НУ мышей по сравнению с ВУ выше экспрессия генов, регулирующих ответ на гипоксию *Hif3a*, *Vegf*, воспаление – *Tnfa*, *Il10*, *Tgfb*, клеточный цикл и апоптоз – *Cmet*, *Egf*, *Egfr*, *Bax*, и кодирующих компоненты эпителиального барьера – *Muc1* и *Cldn7*, а в перитуморальной зоне – только *Egf*. Таким образом, у НУ животных изменения экспрессии изученных групп генов в опухолях и перитуморальной зоне при КРР более выражены, что отражает высокий злокачественный потенциал, быстрые темпы прогрессии и менее благоприятный прогноз по сравнению с ВУ.

Воспалительный и иммунный ответ при колит-ассоциированном колоректальном раке у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6

В опухолях развиваются локальные воспалительные и иммунные реакции, сопровождающиеся системными проявлениями, которые могут быть выражены в разной степени. При значительной выраженности системного воспалительного ответа он во многом определяет прогноз заболевания (Diakos et al., 2014; Xie et al., 2025; Yang et al., 2025). В развитии опухолей ключевую роль играют реакции иммунной системы и активация противоопухолевого иммунитета. По нашим данным, содержание F4/80+ макрофагов, CD3-CD19+, CD3+CD4+ лимфоцитов и NK клеток **в опухолях** у животных с разной устойчивостью к гипоксии не различалось, однако число CD3+CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов у НУ мышей было статистически значимо выше ($0,03 (0,009-0,111) \times 10^6/\text{мл}$, $p=0,03$) по сравнению с ВУ ($0,001 (0,0001-0,006) \times 10^6/\text{мл}$), что отражает активацию противоопухолевого иммунитета и более позднюю стадию прогрессии опухолей. Показано, что инфильтрация опухоли цитотоксическими Т-лимфоцитами может определять прогноз выживаемости пациентов и ответ на иммунотерапию (Prokhnevskaya et al., 2023). Например, массивная инфильтрация CD8+ Т-лимфоцитами при почечно-клеточном раке считается неблагоприятным прогностическим фактором (Dai et al., 2021).

В **тимусе** через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у ВУ мышей по сравнению с контрольной группой (54,1 (51,0-56,0)%) наблюдалась гиперплазия коркового вещества долек (65,0 (59,5-69,8)%, $p=0,001$), а у НУ животных опытной группы (54,8 (50,6-58,1)%) по сравнению с контрольной (60,1 (55,2-64,9)%) различий не выявлено ($p=0,23$). Только у ВУ животных в опытной группе по сравнению с контрольной увеличивалось содержание тимических телец в виде кистоподобных полостей. Выявленные изменения в тимусе у ВУ мышей характерны для хронического воспалительного процесса (Постовалова, 2018).

При морфометрическом исследовании **селезенки** через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН как у ВУ, так и у НУ мышей опытных групп выявлено увеличение объемной доли лимфоидных узелков и уменьшение ПАЛМ-зон, при этом расширение светлых центров лимфоидных узелков обнаружено только у НУ животных.

По данным проточной цитофлуориметрии при КРР только у НУ мышей в БЛУ по сравнению с контрольной группой повышалось абсолютное число CD3+CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов и было выше по сравнению с ВУ относительное и абсолютное количество NK клеток и В-лимфоцитов (рис. 7), что свидетельствует об активации реакций как врожденного, так и гуморального звена адаптивного иммунитета (Graham et al., 2024). У ВУ животных изменений субпопуляционного состава клеток БЛУ не выявлено.

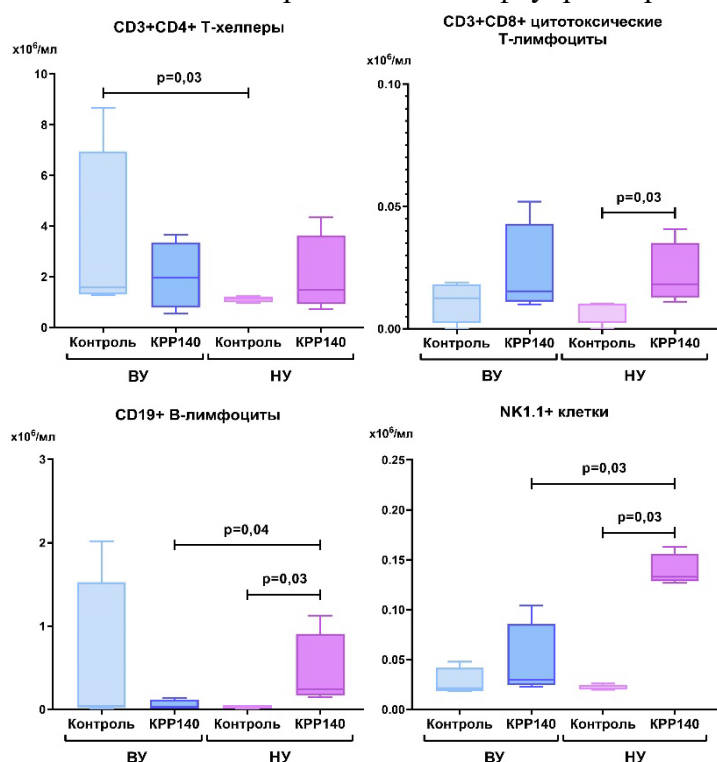


Рис. 7. Абсолютное количество Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и NK клеток в БЛУ у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6 контрольных групп и через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН (КРР140), Ме (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

По данным **лабораторного анализа крови** через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН как у ВУ, так и у НУ мышей выявлено снижение количества эритроцитов и концентрации гемоглобина. По нашим данным как у ВУ, так и у НУ мышей развивалась нормоцитарная гипохромная анемия, которая только у НУ животных сочеталась с накоплением железосодержащего пигмента гемосидерина в тканях опухоли, что может стимулировать активацию макрофагов и окислительный стресс, и усиливать рост опухоли (Хуе и Shah, 2013).

Только у НУ мышей при колит-ассоциированном КРР наблюдалось статистически значимое снижение в крови относительного содержания лимфоцитов по сравнению с контрольной группой. У ВУ мышей опытной группы по сравнению с контрольной выявлено увеличение относительного количества моноцитов в крови, которое было выше по сравнению с НУ животными. Вероятно, снижение количества лимфоцитов только у НУ животных опытной группы связано с их активной миграцией в периферические лимфоидные органы и зону опухолевого роста. При экспериментальном КРР только у НУ мышей выявлено увеличение нейтрофильно-лимфоцитарного индекса NLR (0,49 (0,36-0,55) усл. ед.) по сравнению с контрольной группой (0,28 (0,24-0,33) усл. ед., $p=0,04$). Согласно данным литературы, возрастание NLR свидетельствует о выраженных системных проявлениях воспаления (Nost et al., 2021). Показана высокая прогностическая значимость повышения NLR для выявления пациентов с прогрессией опухолей желудочно-кишечного тракта (Nora et al., 2018).

В крови по данным **проточной цитофлуориметрии** в опытных группах как у ВУ, так и у НУ мышей по сравнению с контрольными снижалось абсолютное число NK клеток и Т-регуляторных лимфоцитов (рис. 8) и относительное количество CD3+CD4+ Т-хелперов, при этом повышалось относительное число CD11b+ моноцитов.

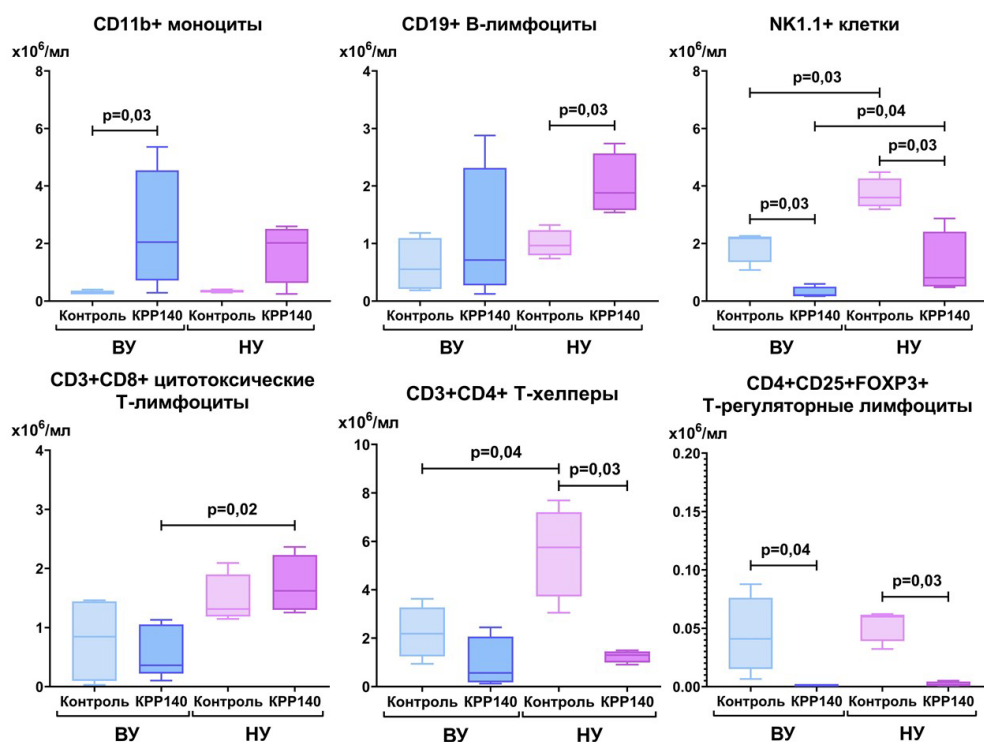


Рис. 8. Абсолютное число моноцитов, В-лимфоцитов, NK клеток, цитотоксических Т-лимфоцитов, Т-хелперов и Т-регуляторных лимфоцитов в периферической крови у ВУ и НУ самцов мышей С57В1/6 контрольных групп и через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН (KPP140), Ме (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Однако только у НУ животных в крови повышалось относительное и абсолютное количество CD19+ В-лимфоцитов и относительное – CD3+CD8+ цитотоксических Т-

лимфоцитов. Относительное число CD3+CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов и NK клеток в периферической крови при KPP было выше у НУ мышей по сравнению с ВУ. Повышение числа CD19+ В-лимфоцитов в периферической крови у НУ животных свидетельствует о более выраженной антигенной стимуляции (Bronte и Pittet, 2013). Ранее нами показано, что при системном воспалительном ответе, индуцированном ЛПС, только у НУ животных наблюдается активация преимущественно гуморального звена адаптивного иммунитета (Dzhalilova et al., 2019), что также сопровождается увеличением числа В-лимфоцитов в крови.

Таким образом, через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН площадь опухолей в дистальном отделе ободочной кишки, распространенность среди них аденокарцином у НУ мышей были выше по сравнению с ВУ. В опухолях у НУ животных по сравнению с ВУ выше экспрессия генов, регулирующих ответ на гипоксию – *Hif3a*, *Vegf*, воспаление – *Tnfa*, *Il10*, *Tgfb*, клеточный цикл и апоптоз – *Cmet*, *Egf*, *Egfr*, *Bax*, компоненты эпителиального барьера – *Muc1* и *Cldn7*, а в перитуморальной зоне – эпидермального фактора роста *Egf*, что свидетельствует о более тяжелом течении KPP и менее благоприятном прогнозе. При KPP у НУ мышей наблюдается активация как врожденного иммунитета, так и гуморального звена адаптивного иммунитета – по сравнению с ВУ в опухолях у них выше число цитотоксических Т-лимфоцитов, в периферической крови – относительное число цитотоксических Т-лимфоцитов и NK клеток, в БЛУ – относительное и абсолютное количество NK клеток и В-лимфоцитов. При KPP у НУ животных наряду с высокой экспрессией *Tnfa*, *Il6*, *Il10* и *Tgfb* в опухолях выявлено увеличение индекса NLR по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует о более поздней стадии прогрессии опухолей и системных проявлениях индуцированного опухолью воспаления. Таким образом, по сравнению с ВУ животными колит-ассоциированный KPP у НУ мышей характеризуется высокими темпами инициации и прогрессии, активацией врожденного иммунитета и гуморального звена адаптивного иммунитета, а также системного воспалительного ответа (Dzhalilova et al., 2024, 2025).

Морфологические и молекулярно-биологические особенности прогрессии глиобластомы 101.8 и карциномы легких Льюис у ВУ и НУ животных

Глиобластома 101.8

При прогрессии опухолей развивается системный воспалительный ответ, индуцируемый окислительным стрессом и некротической гибелью опухолевых клеток вследствие недостаточного кровоснабжения. Воспаление, вызванное опухолью, является ключевым фактором быстрой прогрессии при большинстве злокачественных опухолей (Grivennikov et al., 2010; de Visser и Joyce, 2023). Связанное с опухолью локальное воспаление имеет последствия не только для ближайшего микроокружения, но также способствует высвобождению в кровотоке медиаторов воспаления – цитокинов, хемокинов, эйкозаноидов, активных форм кислорода и азота, белков острой фазы воспаления и факторов роста, DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns), внеклеточных везикул и других компонентов, которые иницируют и поддерживают воспалительный ответ (Dolan et al., 2017; Aguilar-Cazares et al., 2022). Тяжесть течения и прогноз опухолевых заболеваний во многом зависит от выраженности системного воспалительного ответа (Diakos et al., 2014; Xie et al., 2025; Yang et al., 2025). Тем не менее, в литературе отсутствуют данные о взаимосвязи прогрессии опухолей с выраженностью системного воспалительного ответа у ВУ и НУ животных.

Глиобластома является самой агрессивной первичной опухолью головного мозга астроцитарного происхождения, она характеризуется быстрым ростом, выраженным ангиогенезом и устойчивостью к терапии (Huang et al., 2018; Alpuim Costa et al., 2022). В работе использована ранее детально охарактеризованная на экспериментальных животных модель

глиобластомы 101.8 – злокачественной диффузной глиомы головного мозга, полученной в УНУ «Коллекция экспериментальных опухолей нервной системы и нейральных опухолевых клеточных линий» в НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына путем интракраниального введения крысам 7,12-диметил-5,6-бенз[а]антрацена (ДМБА) (Яблоновская и Спрышкова, 1967). По морфологической картине и степени злокачественности глиобластома 101.8 крыс сходна с глиобластомой человека (Авцын и соавт., 1988).

Через месяц после определения устойчивости к гипоксии ВУ (n=13) и НУ (n=24) крысам Вистар проводили трансплантацию тканей глиобластомы 101.8 (1×10^6 опухолевых клеток) на глубину 4 мм от поверхности теменной кости, что соответствует области полосатого тела (Steiniger et al., 2004). По данным Т. Некматара и соавт. (2009) через 8, 10, 12 и 14 сут после трансплантации глиобластомы 101.8 у всех животных выявляются опухоли, на 11-е сут животные начинают терять массу тела, что свидетельствует об опухолевой прогрессии, а на 14-15 сут после трансплантации глиобластомы 101.8 у максимального числа животных развиваются опухоли достаточно больших размеров, объем которых можно сравнивать (Gelperina et al., 2010; Wohlfart et al., 2011; Alekseeva et al., 2022). Поэтому для определения темпов прогрессии опухолей 7 ВУ и 13 НУ животных выводили из эксперимента на 11-е сут после трансплантации глиобластомы, а 6 ВУ и 11 НУ крыс – на 15-е сут. Оценивали гибель животных, изменения массы тела, проводили морфологическое и морфометрическое исследование опухолей, числа сосудов и площади некрозов в них, иммуногистохимическое исследование пролиферативной активности опухолевых клеток. В сыворотке крови определяли содержание HIF-1 α , а также провоспалительных цитокинов IL-1 β и TNF- α .

Гибель животных, являющаяся ключевым показателем опухолевой прогрессии, у ВУ крыс в оба срока эксперимента составила 0% (табл. 2), в то время как на 11-е сут после трансплантации глиобластомы гибель НУ животных была 15% (2 животных из 13), а на 15-е сут – 45% (5 животных из 11). По данным 3D реконструкции и морфометрического исследования на 11-е сут после трансплантации **объем опухолей** у ВУ и выживших НУ крыс не различался, а на 15-е сут был статистически значимо выше у ВУ животных. По данным морфометрического исследования у ВУ крыс относительное количество **Ki-67+ опухолевых клеток** было статистически значимо выше по сравнению с НУ как на 11-е, так и на 15-е сут эксперимента (табл. 2). Высокая пролиферативная активность опухолевых клеток обуславливает рост и увеличение размеров опухоли, однако не существует прямой взаимосвязи между ее размерами и продолжительностью жизни животных (Zhang et al., 2022).

Площадь некрозов у ВУ крыс Вистар по сравнению с НУ на 15-е сут после трансплантации глиобластомы была выше. **Содержание HIF-1 α** в сыворотке крови статистически значимо не различалось у ВУ и НУ животных как на 11-е, так и на 15-е сут эксперимента (табл. 2). Однако у ВУ крыс на 15-е сут после трансплантации глиобластомы содержание HIF-1 α в сыворотке крови повышалось по сравнению с 11-ми сут, а у НУ – не изменялось, что согласуется с предыдущими данными о том, что в ответ на острое гипоксическое воздействие у ВУ крыс происходит более выраженная активация HIF-1 α (Jain et al., 2013; Dzhililova et al., 2018). По данным литературы при прогрессии глиобластомы из-за гипоксии наблюдается активация HIF-1 α , который регулирует VEGF, EGFR, PI3K/Akt и MAPK/ERK, и приводит к увеличению пролиферативной активности клеток глиобластомы и ангиогенезу, а также подавляет апоптоз, способствуя активации синтеза антиапоптотического белка BCL2 (Wang et al., 2017; Huang et al., 2018). Однако возможно, что повышенное содержание HIF-1 α в сыворотке крови на 15-е сут после трансплантации глиобластомы у ВУ животных не отражает его активацию, а вызвано более обширными некрозами, что способствует высвобождению субъединицы HIF-1 α из клеток в кровотоки. По данным литературы не выявлено прямой связи между размерами некрозов и объемом опухоли, кроме того, даже в небольших глиобластомах также развиваются некрозы

(Raza et al., 2002; Yee et al., 2020). В наших экспериментах ни одна из ВУ крыс не погибла за 15 сут наблюдений, несмотря на значительно больший объем опухолей (в 1,9 раза) и площадь некрозов (в 2,3 раза) по сравнению с выжившими НУ животными, 45% из которых погибли к этому моменту.

Таблица 2

Гибель крыс Вистар, объем опухолей, число кровеносных сосудов, площадь некрозов в опухолях, пролиферативная активность опухолевых клеток, содержание HIF-1 α , TNF- α и IL-1 β у ВУ и НУ самцов крыс Вистар на 11-е и 15-е сут после трансплантации глиобластомы, Ме (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Параметры	11-е сут эксперимента		15-е сут эксперимента		p
	ВУ ¹ (n=7)	НУ ² (n=11)	ВУ ³ (n=6)	НУ ⁴ (n=6)	
Гибель животных	0% (0 из 7)	15% (2 из 13)	0% (0 из 6)	45% (5 из 11)	0,184 ¹⁻² ; 0,012 ³⁻⁴
Объем опухолей, мм ³	3,4 (0,1-16,6)	6,4 (3,9-10,9)	41,1 (28,0-47,7)	21,5 (10,2-27,4)	0,51 ¹⁻² ; 0,02 ¹⁻³ 0,02 ²⁻⁴ ; 0,04 ³⁻⁴
Абсолютное число кровеносных сосудов (при x200)	14,0 (12,0-15,5)	12,8 (9,3-15,5)	8,3 (6,5-11,5)	8,5 (7,0-11,0)	0,54 ¹⁻² ; 0,08 ¹⁻³ 0,10 ²⁻⁴ ; 0,57 ³⁻⁴
Площадь некрозов, мкм ² ×10 ³	328,0 (157,7-479,8)	90,7 (61,6-245,7)	406,2 (360,4-511,2)	180,0 (136,5-192,0)	0,17 ¹⁻² ; 0,56 ¹⁻³ 0,36 ²⁻⁴ ; 0,01 ³⁻⁴
Ki-67+ клетки, %	58,6 (57,2-60,9)	45,8 (40,2-55,9)	48,3 (43,2-54,5)	36,8 (32,4-45,1)	0,02 ¹⁻² ; 0,06 ¹⁻³ 0,10 ²⁻⁴ ; 0,03 ³⁻⁴
HIF-1 α в сыворотке крови, пг/мл	158,6 (76,8-240,8)	173,2 (78,5-324,0)	366,1 (329,1-445,7)	250,0 (138,6-411,4)	0,69 ¹⁻² ; 0,008 ¹⁻³ 0,42 ²⁻⁴ ; 0,15 ³⁻⁴
TNF- α в сыворотке крови, пг/мл	0,2 (0,1-15,7)	0,1 (0,0-13,7)	0,7 (0,0-10,7)	7,3 (4,6-50,2)	0,84 ¹⁻² ; 0,65 ¹⁻³ 0,09 ²⁻⁴ ; 0,04 ³⁻⁴
IL-1 β в сыворотке крови, пг/мл	0,0 (0,0-0,5)	0,0 (0,0-1,2)	0,2 (0,0-1,4)	3,9 (2,4-8,8)	0,83 ¹⁻² ; 0,63 ¹⁻³ 0,006 ²⁻⁴ ; 0,03 ³⁻⁴

Системный воспалительный ответ при прогрессии глиобластомы характеризовался высокой продукцией провоспалительных цитокинов – **IL-1 β** и **TNF- α** на 15-е сут эксперимента только у НУ крыс (табл. 2). Известно, что увеличение продукции этих цитокинов при прогрессии глиобластомы коррелирует с ее агрессивностью (Yeung et al., 2013; Hwang et al., 2016). Повышенные уровни TNF- α и IL-1 β в сыворотке крови у пациентов с опухолями головного мозга являются неблагоприятным прогностическим фактором (Shamsdin et al., 2019).

Очевидно, что высокая гибель НУ животных во многом обусловлена системным воспалительным ответом при развитии опухолей. Течение многих видов злокачественных новообразований сопряжено с развитием системного воспалительного ответа, который обуславливает метастазирование и гибель организма (Diakos et al., 2014; Roxburgh и McMillan, 2014; Aguilar-Cazares et al., 2022). Установлено, что в физиологических условиях продолжительность жизни ВУ крыс на 15% выше, чем НУ, что авторы объясняют большей выносливостью ВУ животных к физическим нагрузкам, интоксикации, большей активностью в поведенческих реакциях по сравнению с НУ (Безруков и соавт., 2012). ВУ животные характеризуются высокой активностью ферментов антиоксидантной защиты, а также белков теплового шока HSP70 и HSP90 в ответ на гипоксическое воздействие, в то время как у НУ наблюдается окислительный стресс, что может определять различия в выживаемости и выраженности системного воспалительного ответа при развитии опухолей (Jain et al., 2013; Dzhililova и Makarova, 2020).

Карцинома легких Льюис

Поскольку глиобластома практически не метастазирует во внутренние органы (частота 0,2-2%) (Wu et al., 2021), для оценки морфологических и молекулярно-биологических особенностей метастазирования у ВУ и НУ животных была использована модель трансплантации под кожу карциномы легких Льюис (Lewis Lung Carcinoma, LLC). Карцинома легких Льюис является высоковоспроизводимой и релевантной моделью немелкоклеточного рака легких, а именно аденокарциномы (He et al., 2024), широко используется в исследованиях процессов ангиогенеза в опухоли, метастазирования, устойчивости к химиотерапии, для тестирования противоопухолевых препаратов, а также в исследованиях опухолевого микроокружения (Skurikhin et al., 2024). Задачей этой части работы было исследование выраженности метастазирования, воспалительного и иммунного ответа на модели карциномы легких Льюис у животных в зависимости от исходной устойчивости к гипоксии.

ВУ (n=30) и НУ (n=27) самцам мышей C57Bl/6 опытных групп подкожно в область правой подмышечной впадины вводили суспензию клеток карциномы легких Льюис (LLC1, из коллекции CLS – «Cell Line Service», Эппельхайм, Германия), в количестве 5×10^6 клеток в 100 мкл PBS (Skurikhin et al., 2024). ВУ (n=8) и НУ (n=5) мышам контрольных групп подкожно вводили физиологический раствор. Для оценки площади метастазов 12 ВУ и 12 НУ мышей выводили из эксперимента на 21-е сут после введения опухолевых клеток, а 14 ВУ и 12 НУ – на 28-е сут (Chou et al., 2012; Suzuki et al., 2014; Wu et al., 2020). ВУ (n=8) и НУ (n=5) животных контрольных групп выводили из эксперимента на 28-е сут. Оценивали объем опухолей, пролиферативную активность опухолевых клеток, площадь метастазов в легких, морфологические особенности тимуса и селезенки, содержание С-реактивного белка в сыворотке крови, экспрессию генов *Hif1a*, *Nfkb*, *Tnfa*, *Il1b* и *Tgfb* в печени, субпопуляционный состав клеток периферической крови, проводили клинический анализ крови.

Гибель ВУ и НУ мышей не различалась (табл. 3), на 28-е сут после подкожного введения клеток карциномы легких Льюис опухоли сформировались у 84,6% (22 животных из 26) ВУ и 91,7% (22 из 24) НУ мышей ($p=0,67$), а метастазы обнаружены у 64,3% (9 из 14) ВУ и 50% (6 из 12) НУ животных ($p=0,58$).

Таблица 3

Гибель животных, масса и объем опухолей, митотический индекс клеток первичного опухолевого узла и площадь метастазов в легких на 21-е и 28-е сут после подкожного введения клеток карциномы легких Льюис у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6, Ме (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Параметры	21-е сут эксперимента		28-е сут эксперимента		p
	ВУ ¹	НУ ²	ВУ ³	НУ ⁴	
Гибель мышей	0% (0 из 30)	3,7% (1 из 27)	13,3% (4 из 30)	11,1% (3 из 27)	0,47 ¹⁻² ; 0,99 ³⁻⁴
Масса опухолей, г	2,6 (1,9-4,2)	2,3 (1,7-2,8)	5,4 (3,6-6,3)	5,3 (3,8-6,5)	0,25 ¹⁻² ; 0,008 ¹⁻³ 0,006 ²⁻⁴ ; 0,97 ³⁻⁴
Объем опухолей, см ³	4,1 (2,4-6,3)	3,7 (3,2-5,7)	10,6 (5,9-13,7)	10,8 (7,5-14,4)	0,86 ¹⁻² ; 0,006 ¹⁻³ 0,02 ²⁻⁴ ; 0,74 ³⁻⁴
Митотический индекс, %	55,8 (49,0-61,6)	48,7 (44,4-51,1)	55,5 (48,1-72,1)	48,3 (43,9-52,8)	0,02 ¹⁻² ; 0,91 ¹⁻³ 0,92 ²⁻⁴ ; 0,04 ³⁻⁴
Площадь метастазов в легких, мкм ²	5527 (1779-32096)	7547 (5869-36498)	7529 (2239-46254)	13542 (3897-43843)	0,11 ¹⁻² ; 0,94 ¹⁻³ 0,26 ²⁻⁴ ; 0,95 ³⁻⁴

Масса и объем опухолей на 28-е сут увеличивались по сравнению с 21-ми сут как у ВУ, так и у НУ животных, при этом **митотический индекс опухолевых клеток** в подкожных опухолевых узлах у ВУ мышей в оба срока эксперимента был статистически значимо выше по

сравнению с НУ (табл. 3). Учитывая отсутствие различий в показателях массы и объема опухолей между ВУ и НУ животными, можно предположить, что более высокая пролиферативная активность в опухолях у ВУ мышей сочетается с более активной гибелью опухолевых клеток – возникает баланс апоптоза и пролиферации, определяющий темпы роста опухолей (Moreno-Celis et al., 2022).

При микроскопическом исследовании **легких** у ВУ и НУ мышей в оба срока эксперимента выявлены метастазы, которые были представлены группами полиморфных опухолевых клеток, вокруг метастатических очагов определялась лимфоидно-гистиоцитарная инфильтрация. Статистически значимых различий по показателю **площади метастазов** в легких между ВУ и НУ мышами как на 21-е сут, так и на 28-е сут эксперимента не обнаружено (табл. 3). Метастазирование является причиной более 90% всех смертей, связанных с развитием злокачественной опухоли, и его механизмы на клеточном и молекулярном уровнях остаются недостаточно изученными (Lambert et al., 2017; Deyell et al., 2021). Существующие данные свидетельствуют о том, что помимо собственных самим метастазирующим опухолевым клеткам характеристик, для эффективного метастазирования необходимо участие стромальных клеток и компонентов внеклеточного матрикса, а также системные метаболические и иммунные изменения (Doglioni et al., 2019; Cusanic et al., 2022).

При морфометрическом исследовании **тимуса** ВУ и НУ мышей опытных групп не обнаружено различий по объемной доле коркового и мозгового вещества, а также по показателю отношения коркового вещества к мозговому. По сравнению с ВУ животными на 21-е сут эксперимента количество тимических телец в виде кистоподобных полостей было выше у НУ мышей ($p=0,03$). По сравнению с контрольной группой у НУ животных на 21-е сут эксперимента обнаружено увеличение количества тимических телец с кератогиалином, а у ВУ изменений не наблюдалось. В **селезенке** у ВУ и НУ мышей на 21-е и 28-е сут эксперимента изменения были однотипными – выявлена редукция белой пульпы, которая была представлена небольшими лимфоидными узелками со светлыми центрами и без них.

У животных обеих групп на 28-е сут после подкожного введения клеток карциномы легких в периферической **крови** выявлено повышение абсолютного числа лейкоцитов, моноцитов и гранулоцитов, снижение показателей содержания гемоглобина и эритроцитов. Только у НУ животных обнаружено повышение абсолютного числа CD11b⁺ моноцитов на 28-е сут эксперимента по сравнению с контрольной группой ($p=0,02$). Кроме того, только у НУ мышей выявлено увеличение индекса системного воспалительного ответа SIRI по сравнению с контрольной группой (0,07 (0,02-0,12) усл. ед.) на 28-е сут эксперимента (1,5 (0,99-5,77) усл. ед., $p=0,04$). Индекс LMR снижался, а NLR, напротив, повышался на 21-е и 28-е сут эксперимента у НУ животных, а у ВУ мышей – на 28-е сут. Снижение LMR, а также повышение NLR и SIRI свидетельствуют о более выраженных системных проявлениях воспаления и являются неблагоприятными прогностическими факторами у пациентов со злокачественными опухолями (Pacheco-Barcia et al., 2020; Nost et al., 2021; Kim et al., 2022).

По нашим данным экспрессия генов *Hif1a* и *Nfkb* в **печени** на 28-е сут эксперимента была статистически значимо выше у НУ животных по сравнению с ВУ (рис. 9). Кроме того, только у НУ мышей обнаружено повышение экспрессии гена *Nfkb* на 28-е сут эксперимента по сравнению с 21-ми сут, что свидетельствует о прогрессии системного воспалительного ответа. У НУ животных уровни экспрессии провоспалительного цитокина *Tnfa* на 21-е сут эксперимента и противовоспалительного *Tgfb* на 28-е были выше по сравнению с ВУ. Только у НУ мышей обнаружено статистически значимое повышение экспрессии *Tnfa* на 21-е и 28-е сут эксперимента и снижение экспрессии *Tgfb* на 21-е сут по сравнению с контрольной группой.

В условиях опухолевого роста в печени в ответ на воздействие различных факторов, продуцируемых клетками опухоли, повышается продукция белков острой фазы воспаления и

цитокинов. Показано, что повышение маркеров воспаления в печени у пациентов является признаком неблагоприятного прогноза при прогрессии злокачественных опухолей (Stone et al., 2024). Транскрипционный фактор *Nfkb* контролирует развитие воспалительных реакций через стимуляцию экспрессии как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов (Liu et al., 2017). НУ животные по сравнению с ВУ отличаются более выраженным системным воспалительным ответом, сопровождающимся повышением экспрессии *Nfkb* и *Tnfa*, и снижением *Tgfb* в печени.

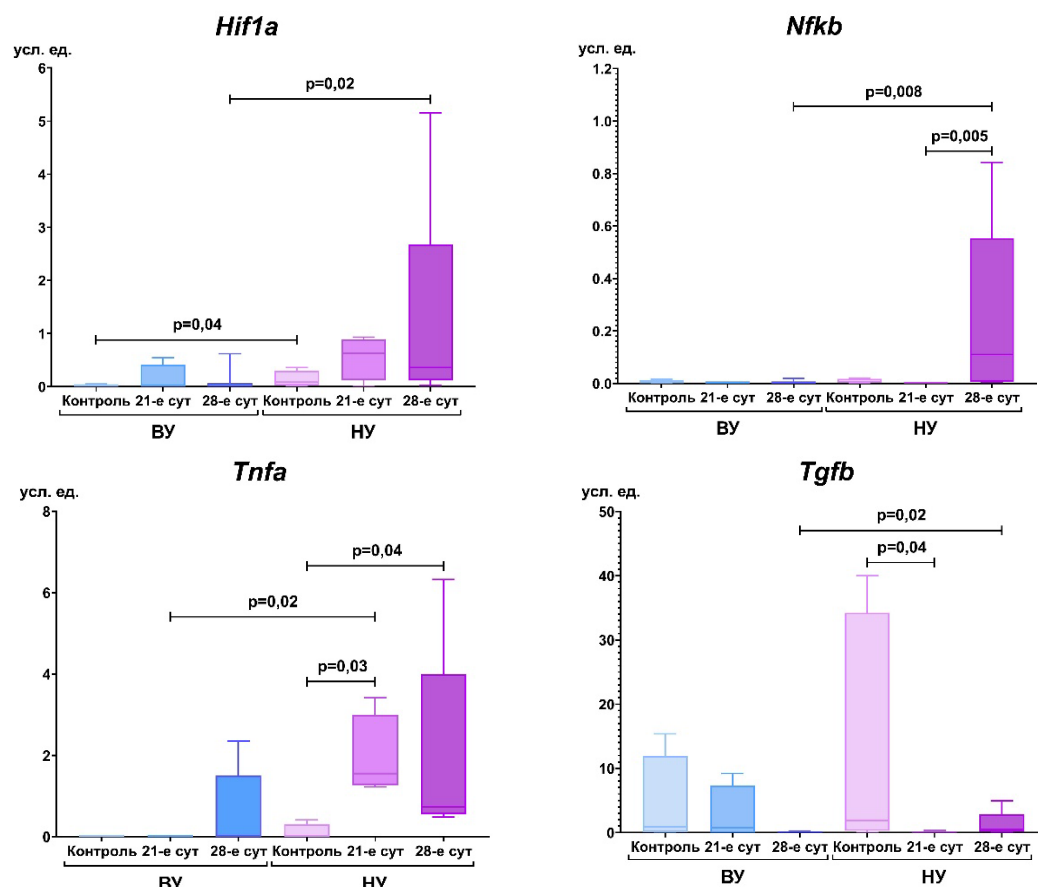


Рис. 9. Уровни экспрессии генов *Hif1a*, *Nfkb*, *Tnfa* и *Tgfb* в печени на 21-е и 28-е сут после подкожного введения клеток карциномы легких Льюис у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

Таким образом, при трансплантации глиобластомы 101.8 объем опухолей и пролиферативная активность опухолевых клеток выше у ВУ крыс, при этом у НУ животных выше их гибель (Dzhalilova et al., 2023). При введении клеток карциномы легких Льюис объемы подкожных опухолей и темпы метастазирования в легкие не различаются у ВУ и НУ мышей (Джалилова и соавт., 2024). Однако у НУ животных прогрессия как глиобластомы 101.8, так и карциномы легких сопровождается системным воспалительным ответом, характеризующимся высокими уровнями провоспалительных цитокинов, повышением индексов NLR и SIRI и снижением индекса LMR.

Молекулярно-биологические особенности макрофагов и уровень продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов у ВУ и НУ самцов крыс Вистар

Поскольку у ВУ и НУ животных были выявлены различия тяжести течения системного воспалительного ответа при прогрессии опухолей – КРР, глиобластомы и карциномы легких, задачей следующей части работы было оценить у животных с разной устойчивостью к гипоксии

в норме баланс провоспалительных и противовоспалительных реакций на модели клеток врожденного иммунитета – макрофагов.

Молекулярно-биологическая и функциональная характеристика макрофагов у ВУ и НУ крыс Вистар

Макрофаги – клетки врожденного иммунитета, играют ключевую роль в реализации как воспалительных, так опухолевых процессов, они выполняют иммунорегуляторную и фагоцитарную функции (Ельчанинов и Фатхудинов, 2023). У ВУ и НУ крыс Вистар выделяли моноциты периферической крови, получали неактивированные и активированные ЛПС макрофаги. Оценивали иммунофенотип макрофагов с помощью проточной цитофлуориметрии по ряду маркеров: интегрину CD11b, который является специфическим для макрофагов костномозгового происхождения (Kinoshita et al., 2010; Ikarashi et al., 2013; Nishiyama et al., 2015), общему маркеру макрофагов CD68, а также маркерам функционального состояния макрофагов: CD86 – провоспалительный фенотип и CD163 – противовоспалительный фенотип (Ельчанинов и Фатхудинов, 2023). Методом ПЦР в режиме реального времени и методом Вестерн-блоттинга оценивали экспрессию генов и содержание белков, регулирующих воспалительные реакции – *Tnfa*, *Il1b*, *Il6*, *Il10*, *Tgfb*, *Mmp9*, *Nos2*, iNOS, CCR7, HGF, и ответ на гипоксию – *Hif1a*, *Epas1* (*Hif2a*), *Vegf* и VEGF. Содержание HIF-1α в культуральной жидкости определяли методом ИФА.

Иммунофенотип и функциональные свойства **неактивированных макрофагов** крыс Вистар различались в зависимости от исходной устойчивости к гипоксии. Число CD11b+ макрофагов у ВУ (71,3 (63,7-72,4)%) крыс Вистар по сравнению с НУ (30,1 (24,9-39,0)%) было выше ($p=0,008$). Интегрин CD11b регулирует миграцию макрофагов в очаг воспаления и его фармакологическая активация подавляет рост опухолей, что было показано на моделях злокачественных опухолей у мышей (Schmid et al., 2018).

По сравнению с ВУ в **неактивированных макрофагах** у НУ крыс была статистически значимо выше экспрессия генов провоспалительных цитокинов *Tnfa* и *Il1b* (рис. 10). По данным литературы высокий уровень продукции TNF-α, iNOS и IL-6 свидетельствует о дифференцировке моноцитов по провоспалительному фенотипу (Askenase et al., 2015; Nakanishi et al., 2018).

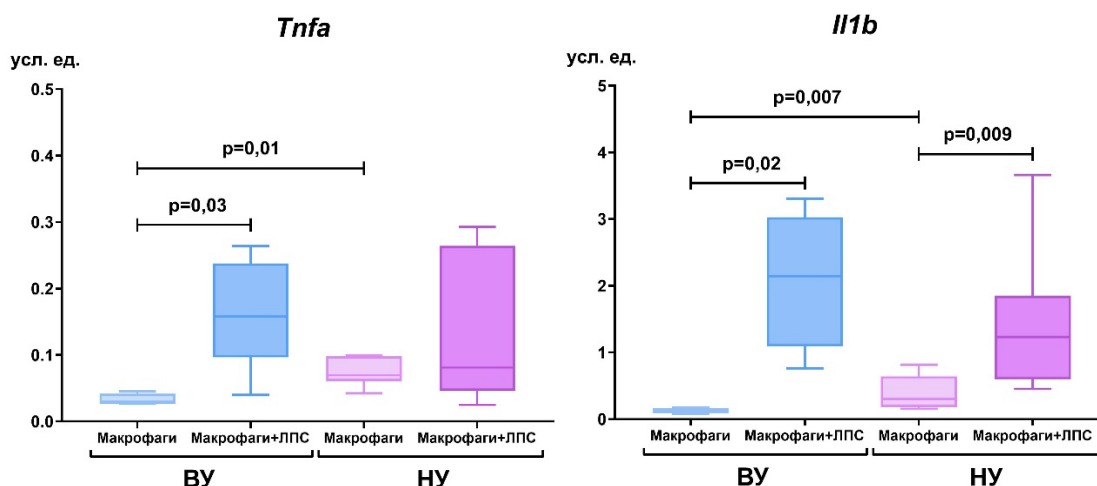


Рис. 10. Относительный уровень экспрессии генов *Tnfa* и *Il1b* в неактивированных и активированных ЛПС макрофагах у ВУ и НУ самцов крыс Вистар, Ме (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Экспрессия гена *Hif1a* в **неактивированных макрофагах** у ВУ и НУ крыс не различалась (рис. 11), а экспрессия *Epas1* (*Hif2a*) была выше в неактивированных макрофагах у НУ животных по сравнению с ВУ. При этом в неактивированных макрофагах у ВУ крыс экспрессия как гена, так и содержание белка VEGF были статистически значимо выше по сравнению с НУ (табл. 4).

У ВУ крыс высокий уровень экспрессии гена и содержание белка VEGF по сравнению с НУ животными могут быть обусловлены высокой фагоцитарной активностью, так как при фагоцитозе может активироваться синтез VEGF в макрофагах (Riazy et al., 2009).

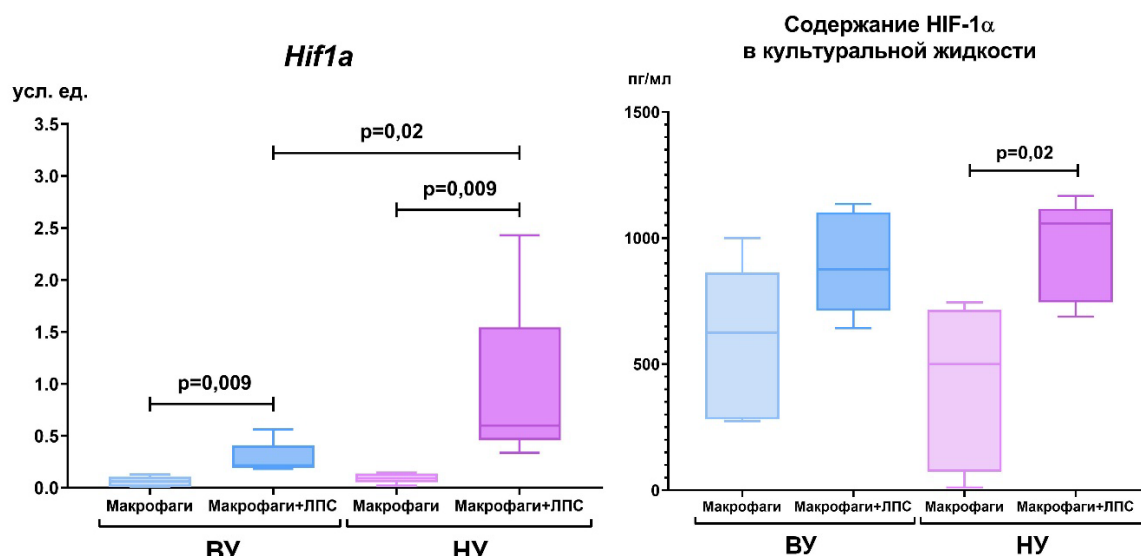


Рис. 11. Относительный уровень экспрессии гена *Hif1a* в неактивированных и активированных ЛПС макрофагах и содержание HIF-1α в культуральной жидкости неактивированных и активированных ЛПС макрофагов у ВУ и НУ самцов крыс Вистар, Ме (25%-75%), *p* – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

На воздействие ЛПС макрофаги животных с разной устойчивостью к гипоксии реагировали увеличением экспрессии мРНК молекул, регулирующих воспалительные реакции – *Il1b*, *Il6*, *Il10*, *Tgfb*, *Nos2*, а также ответ на гипоксию – *Hif1a*. В активированных макрофагах ВУ крыс по сравнению с неактивированными увеличивалась экспрессия гена *Tnfa* (рис. 10) и матричной металлопротеиназы *Mmp9* (*p*=0,009).

Таблица 4

Относительный уровень экспрессии гена *Vegf* и белка VEGF в неактивированных и активированных ЛПС макрофагах у ВУ и НУ самцов крыс Вистар, Ме (25%-75%), *p* – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Параметры	Неактивированные макрофаги		Активированные макрофаги		<i>p</i> <0,05
	ВУ ¹ (<i>n</i> =6)	НУ ² (<i>n</i> =6)	ВУ ³ (<i>n</i> =6)	НУ ⁴ (<i>n</i> =7)	
Уровень экспрессии гена <i>Vegf</i> , усл. ед.	0,04 (0,03-0,05)	0,02 (0,01-0,02)	0,16 (0,05-0,20)	0,16 (0,08-0,58)	0,004 ¹⁻² 0,01 ²⁻⁴
Белок VEGF, усл. ед.	265,5 (178,3-315,9)	83,2 (62,5-117,1)	164,6 (118,0-208,5)	222,7 (146,1-439,8)	0,009 ¹⁻²

В активированных макрофагах у НУ крыс увеличивалось содержание фактора роста гепатоцитов HGF по сравнению с неактивированными, а у ВУ – не изменялось (рис. 12). По данным F. Galimi и соавт. (2001) и N. Nishikoba и соавт. (2020) HGF индуцирует направленную миграцию и дифференцировку моноцитов, а содержание его рецептора с-MET в неактивированных макрофагах низкое, и увеличивается после стимуляции ЛПС и IFN-γ. Активация HGF-MET играет важную роль при прогрессии опухолей – способствует ангиогенезу, подвижности клеток и инвазии (Yao et al., 2024).

Активированные ЛПС макрофаги ВУ и НУ крыс также различались между собой. По результатам Вестерн-блоттинга относительное содержание хемокинового рецептора CCR7, являющегося маркером провоспалительного фенотипа макрофагов (Van Raemdonck et al., 2019), повышалось и по сравнению с ВУ у НУ крыс Вистар в активированных ЛПС макрофагах было выше (рис. 12).

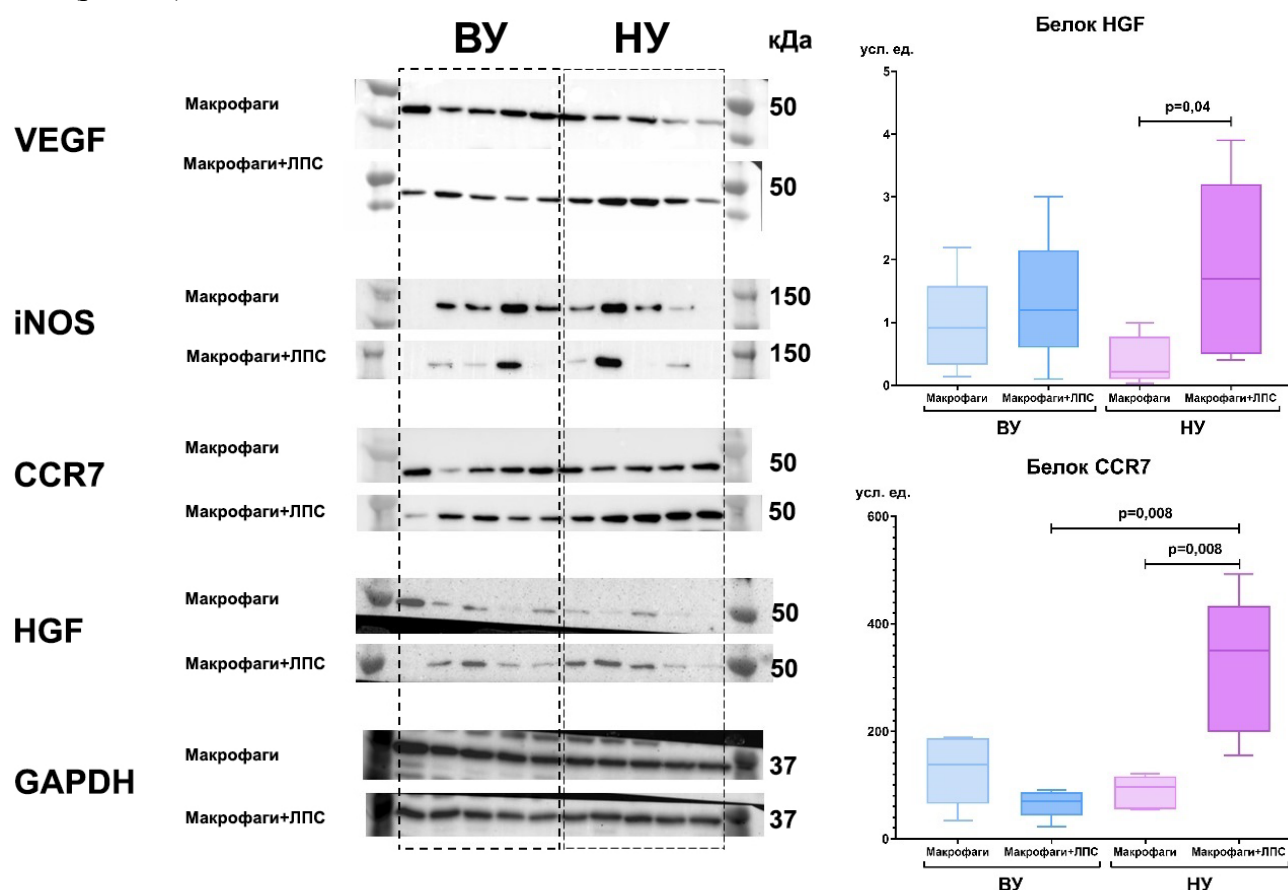


Рис. 12. Репрезентативные мембраны с антителами к VEGF, iNOS, CCR7, HGF и GAPDH. Относительное содержание белков HGF и CCR7 в неактивированных и активированных ЛПС макрофагах у ВУ и НУ самцов крыс Вистар, Ме (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

В активированных ЛПС макрофагах по сравнению с ВУ у НУ крыс экспрессия гена *Hif1a* была статистически значимо выше, а также у них увеличивалось содержание белка HIF-1 α в культуральной жидкости по сравнению с неактивированными макрофагами (рис. 11). Значительное увеличение содержания белка HIF-1 α в культуральной жидкости активированных ЛПС макрофагов у НУ крыс, вероятно, обуславливает повышение экспрессии зависимого гена ангиогенеза *Vegf* (табл. 4). Кроме того, увеличение содержания белка HIF-1 α свидетельствует об их более высокой провоспалительной активности, так как HIF-1 α способствует переключению с окислительного фосфорилирования на гликолиз, и обуславливает повышение экспрессии генов провоспалительных цитокинов (Tannahill et al., 2013; Wang et al., 2017).

Определение фагоцитарной активности моноцитов в условиях *in vivo* и *ex vivo* гипоксического воздействия у ВУ и НУ самцов крыс Вистар

Фагоцитарная активность моноцитов является важным показателем их функционального состояния (Kolenchukova et al., 2020). Повышение фагоцитарной активности моноцитов в условиях гипоксии показано многими авторами (Anand et al., 2007; Martins et al., 2020). Для исследования воспалительных и иммунных реакций перспективным подходом является активация клеток крови *ex vivo*, которая воспроизводит условия, наиболее близкие к условиям *in*

vivo (Müller et al., 2024). Поэтому мы исследовали различия фагоцитарной активности моноцитов у крыс Вистар (n=60) через один месяц после определения устойчивости к гипоксии в условиях *in vivo* и *ex vivo* недостатка кислорода.

Для оценки фагоцитарной активности моноцитов *in vivo* ВУ (n=6) и НУ (n=10) крыс Вистар помещали в барокамеру на 1 ч в условия физиологической гипоксической нагрузки – на «высоту» 5000 м, проводили забор крови. Для моделирования гипоксического состояния *ex vivo* у интактных ВУ (n=6) и НУ (n=10) животных получали кровь и инкубировали в течение 1 ч при 1% O₂. В качестве контроля использовали кровь этих крыс, которую инкубировали в условиях нормоксии в течение 1 ч. Фагоцитарная активность моноцитов периферической крови, которая является интегративным показателем их функционального состояния, в условиях нормоксии у ВУ (4,3 (4,1-5,4)%) и НУ крыс (4,5 (2,9-8,6)%) не различалась (p=0,71), а после *in vivo* гипоксического воздействия была статистически значимо выше у ВУ (7,0 (5,4-13,2)%) животных по сравнению с НУ (2,7 (1,6-3,6)%, p=0,02). После *ex vivo* гипоксического воздействия фагоцитарная активность моноцитов также была выше у ВУ (17,7 (9,2-19,4)%) крыс по сравнению с НУ (3,5 (1,6-9,5)%, p=0,01). Показано, что воздействие гипоксии может модифицировать функциональные свойства макрофагов и снижать их иммуносупрессивное действие на цитотоксические Т-лимфоциты, что ассоциировано с благоприятным прогнозом при злокачественных опухолях (de la Calle-Fabregat et al., 2024).

Функциональная активность моноцитов во многом определяется активацией HIF-1 α , который способствует переключению метаболизма с окислительного фосфорилирования на гликолиз и обуславливает повышение фагоцитарной активности (Anand et al., 2007; McGettrick и O'Neill, 2020). Ранее нами было показано, что после острого гипоксического воздействия содержание HIF-1 α в сыворотке крови и экспрессия его гена в печени выше у ВУ крыс по сравнению с НУ, что обеспечивает адаптацию к гипоксии (Dzhalilova et al., 2018). Различия фагоцитарной активности моноцитов периферической крови после гипоксического воздействия могут определять тяжесть течения системного воспалительного ответа, а также опухолевых процессов, в которых ключевую роль играют макрофаги (Han et al., 2016; Zhou et al., 2021).

Следует отметить, что статистически значимое (p=0,006) увеличение фагоцитарной активности моноцитов по сравнению с условиями нормоксии наблюдалось только у ВУ крыс в условиях *ex vivo* гипоксического воздействия. Таким образом, гипоксическое воздействие *ex vivo*, при котором, в отличие от *in vivo*, использованы более низкие концентрации кислорода, оказывает более выраженный эффект на клетки крови по сравнению с физиологической гипоксической нагрузкой *in vivo* и позволяет избежать острого гипоксического воздействия на организм. Использование *ex vivo* воздействия на клетки крови может быть перспективным способом определения устойчивости организма к недостатку кислорода. Следовательно, при разработке способов определения устойчивости к гипоксии целесообразно использовать *ex vivo* воздействие на клетки крови.

Спонтанная и стимулированная комплексным митогеном (ЛПС, ФГА и КонА) *ex vivo* продукция цитокинов клетками крови у ВУ и НУ самцов крыс Вистар

Поскольку с использованием неактивированных и активированных ЛПС макрофагов установлены различия баланса провоспалительных и противовоспалительных реакций у ВУ и НУ животных, было проведено исследование спонтанной и стимулированной комплексным митогеном – ЛПС *E. coli*, фитогемагглютинином (ФГА) и Конканавалином А (КонА) продукции цитокинов клетками крови *ex vivo* через месяц после определения устойчивости к гипоксии в барокамере. Этот комплексный митоген стимулирует продукцию цитокинов всеми лейкоцитами крови (Дружинина и соавт., 2009; Kosyreva et al., 2023).

Через один месяц после гипоксического воздействия в барокамере у ВУ (n=6) и НУ (n=10) крыс Вистар проводили забор крови и инкубировали ее в течение 24 ч в полной ростовой среде

DMEM без и с добавлением ЛПС *E. coli*, ФГА и КонА в конечных концентрациях в 1 мл 2 мкг, 4 мкг и 4 мкг соответственно. В культуральной жидкости определяли содержание провоспалительного цитокина IL-1 β и противовоспалительного IL-10.

Показано, что содержание IL-1 β в культуральной жидкости клеток крови статистически значимо повышалось ($p=0,002$) только у НУ крыс при стимуляции (35,9 (33,9-41,5) пг/мл) по сравнению с показателями без нее (10,8 (5,6-19,5) пг/мл). Продукция IL-10 повышалась как у ВУ (без стимуляции 16,0 (9,8-24,7) пг/мл, со стимуляцией – 89,5 (64,5-95,5) пг/мл, $p=0,03$), так и у НУ крыс (без стимуляции 9,3 (6,7-24,0) пг/мл, со стимуляцией – 74,4 (71,1-78,9) пг/мл, $p=0,002$).

Продукция IL-1 β и IL-10 клетками крови крыс Вистар до и через месяц после сублетальной гипоксической нагрузки в барокамере

Так как у НУ животных выявлен провоспалительный фенотип макрофагов и повышенная продукция IL-1 β клетками крови в ответ на стимуляцию комплексным митогеном, задачей следующего этапа работы было определить, является ли эта особенность предсуществующей или это следствие гипоксического воздействия в барокамере на критической «высоте» при определении устойчивости к недостатку кислорода. У интактных половозрелых крыс Вистар ($n=60$) из хвостовой вены получали кровь, отбирали четыре пробы по 100 мкл, первую инкубировали в течение 1 ч при 21% O $_2$, вторую – в течение 1 ч при 1% O $_2$, третью – в течение 24 ч при 21% O $_2$, в четвертую пробу добавляли ЛПС, ФГА и КонА в конечных концентрациях в 1 мл 2 мкг, 4 мкг и 4 мкг соответственно, и инкубировали в течение 24 ч при 21% O $_2$. В культуральной жидкости оценивали содержание провоспалительного цитокина IL-1 β и противовоспалительного IL-10. Через две недели после взятия крови определяли устойчивость этих животных к гипоксии в барокамере по «времени жизни» на «высоте» и разделяли на ВУ ($n=10$) и НУ ($n=12$). Через месяц после воздействия повторяли *ex vivo* эксперимент с клетками крови ВУ и НУ крыс, и анализировали показатели продукции цитокинов, полученные у этих животных за две недели до и через один месяц после определения устойчивости к гипоксии в барокамере.

Как у ВУ, так и у НУ животных спонтанная продукция IL-1 β и IL-10 клетками крови после инкубации их в условиях нормоксии в течение 1 ч была выше через один месяц после сублетального гипоксического воздействия. В условиях воздействия гипоксии (1% O $_2$) продукция клетками крови IL-1 β и IL-10 у ВУ и НУ крыс повышалась по сравнению с нормоксией как до определения устойчивости животных к недостатку кислорода в барокамере, так и после. Однако через один месяц после сублетальной гипоксической нагрузки и инкубации клеток крови при 1% O $_2$ у НУ животных по сравнению с исходными значениями (47,7 (33,7-69,1) пг/мл) продукция IL-10 не увеличивалась, как IL-1 β , а, напротив, снижалась (33,6 (30,4-37,3) пг/мл, $p=0,02$), а у ВУ – не изменялась.

При инкубации клеток крови в течение 24 ч у ВУ и НУ животных спонтанная продукция IL-1 β не различалась, и она была выше через один месяц после сублетального гипоксического воздействия в барокамере по сравнению с показателями до него. После стимуляции клеток крови ЛПС, ФГА и КонА продукция IL-1 β клетками крови по сравнению со спонтанной продукцией увеличивалась только у НУ крыс как до воздействия в барокамере, так и после. После сублетального гипоксического воздействия в барокамере показатели стимулированной продукции IL-1 β увеличивались как у ВУ, так и у НУ животных по сравнению с исходными значениями. По сравнению с исходными значениями (19,7 (18,1-21,0) пг/мл) спонтанная продукция IL-10 при инкубации клеток крови в течение 24 ч через один месяц после сублетальной гипоксической нагрузки повышалась только у ВУ животных (28,0 (27,2-32,9) пг/мл, $p=0,0001$). По сравнению с исходными значениями (52,6 (35,4-57,2) пг/мл) стимулированная ЛПС, ФГА и КонА продукция IL-10 снижалась через один месяц после сублетальной гипоксической нагрузки только у НУ крыс (36,3 (33,1-41,0) пг/мл, $p=0,02$).

Выявленные изменения продукции цитокинов клетками крови в условиях гипоксии и при стимуляции комплексным митогеном после определения устойчивости животных к недостатку кислорода в барокамере могут быть связаны с активацией тренированного иммунитета. Тренированный иммунитет – это вызванные PAMPs и/или DAMPs изменения функционального состояния клеток врожденного иммунитета при повторном взаимодействии с широким спектром патогенов и факторов (Netea et al., 2011). Механизмы тренированного иммунитета недостаточно изучены, однако установлено, что ключевую роль в его формировании играют эпигенетические модификации, такие как метилирование и ацетилирование гистонов, влияющие на доступность ДНК для транскрипционных факторов, а также изменения метаболизма (Netea et al., 2020; Murphy et al., 2021). Концепция тренированного иммунитета предполагает долгосрочное функциональное репрограммирование клеток врожденного иммунитета, которое приводит к изменению ответа на повторный стимул (Netea et al., 2020; Jenthó и Weis, 2021). Вероятно, при гипоксическом воздействии в барокамере на критической «высоте» в результате повреждения клеток образуются DAMPs, что приводит к реализации реакций тренированного иммунитета, которые могут сохраняться длительное время, более чем один месяц (Netea et al., 2020). При этом у НУ животных наблюдается дисбаланс продукции провоспалительного цитокина IL-1 β , уровень которого повышается и противовоспалительного IL-10, продукция которого снижается. Следует отметить, что до определения устойчивости к гипоксии в барокамере по сравнению с ВУ у НУ животных спонтанная продукция IL-10 была выше, а в ответ на стимуляцию комплексным митогеном только у них продукция IL-1 β повышалась. Эти данные послужили теоретической основой для разработки способов определения устойчивости к гипоксии у лабораторных животных без воздействия *in vivo* гипоксии (Джалилова и соавт., 2024).

Разработка способов *ex vivo* оценки устойчивости к недостатку кислорода самцов крыс Вистар без сублетального гипоксического воздействия в барокамере

Основным способом оценки устойчивости людей к недостатку кислорода является пребывание в условиях, соответствующих высоте в несколько тысяч метров (например, для профессиональных спортсменов – 6400 м), и определение чувствительности к острой горной болезни и высокогорному отеку легких (Малеев, 2015; Kammerer et al., 2018; Lu et al., 2018; Guo et al., 2023). Для определения устойчивости к недостатку кислорода лабораторных животных используют сублетальное гипоксическое воздействие, повреждающие эффекты которого могут сохраняться длительное время, поэтому необходима разработка лабораторных способов определения устойчивости к гипоксии без помещения животных в барокамеру. Подходом для выявления биомаркеров устойчивости к гипоксии может быть индукция провоспалительными стимулами продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в условиях *ex vivo*, так как ранее нами показано (Dzhalilova et al., 2019), что в ответ на введение ЛПС у НУ крыс наблюдается более выраженная системная воспалительная реакция, которая сопровождается повышением содержания IL-1 β в сыворотке крови.

Для разработки способов определения устойчивости организма к гипоксии у интактных крыс Вистар (n=50) исследовали спонтанную и стимулированную продукцию цитокинов клетками крови *ex vivo*. Для оценки спонтанной продукции цитокинов клетки крови инкубировали в течение 24 ч в условиях нормоксии при +37°C в CO₂-инкубаторе и определяли содержание в культуральной жидкости IL-6, IL-10 и TNF- α методом ИФА с использованием наборов фирм «Invitrogen» (США) – IL-10, и «Cloud-Clone Corp.» (Китай) – IL-6 и TNF- α , на приборе Anthos 2010 (Австрия). Для оценки стимулированной продукции цитокинов клетки крови инкубировали в течение 24 ч в полной ростовой среде DMEM без и с добавлением ЛПС *E. coli*, ФГА и КонА в конечных концентрациях в 1 мл 2 мкг, 4 мкг и 4 мкг соответственно. В культуральной жидкости определяли содержание провоспалительного цитокина IL-1 β

(«Invitrogen», США). Через две недели после забора крови определяли устойчивость этих животных к гипоксии в барокамере.

Показано, что спонтанная продукция провоспалительных цитокинов IL-6 и TNF- α , а также противовоспалительного цитокина IL-10 была выше у НУ животных до определения устойчивости к гипоксии в барокамере (рис. 13). Кроме того, продукция IL-1 β (86,9 (63,5-133,6) пг/мл) клетками крови после стимуляции ЛПС, ФГА и Кона статистически значимо увеличивалась ($p=0,003$) только у НУ крыс по сравнению с показателями без нее (31,3 (14,3-45,7) пг/мл).

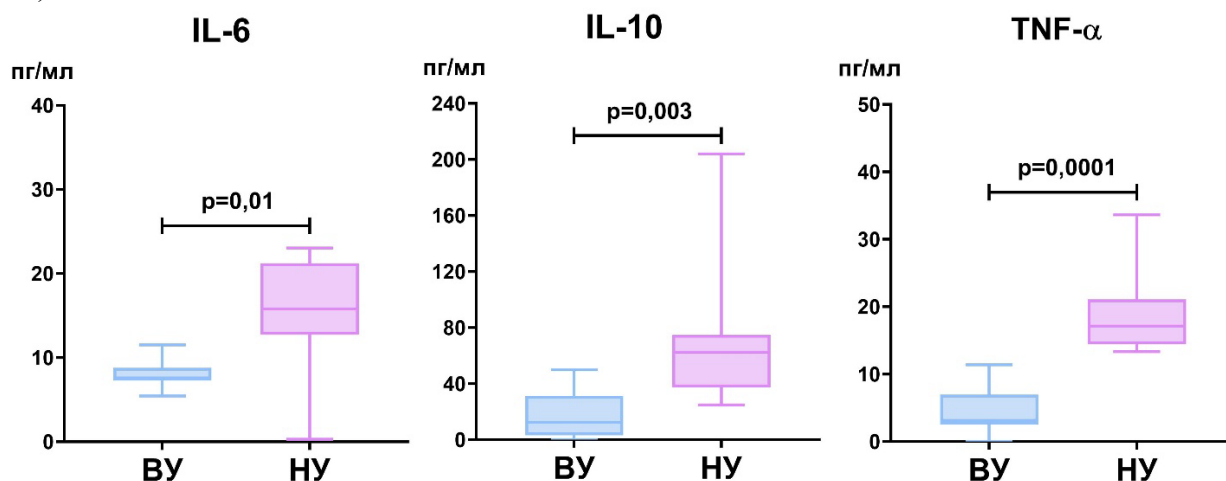


Рис. 13. Спонтанная продукция цитокинов клетками периферической крови при инкубации в течение 24 ч *ex vivo* у ВУ ($n=7$) и НУ ($n=11$) самцов крыс Вистар до определения устойчивости к гипоксии в барокамере, Ме (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Заключение

Организмы лабораторных животных и человека отличаются по устойчивости к недостатку кислорода, а также содержанию фактора, индуцируемого гипоксией – HIF-1 α , который играет ключевую роль в механизмах воспаления и развития опухолей. Целью работы было установить клеточные и молекулярно-биологические механизмы взаимосвязи исходной устойчивости организма к гипоксии, воспаления, инициации и прогрессии опухолей.

В работе выполнен комплекс экспериментальных исследований, позволивший установить зависимость темпов прогрессии опухолей и выраженность связанного с ней системного воспалительного ответа от индивидуальной устойчивости организма к гипоксии (рис. 14). На экспериментальных моделях колит-ассоциированного KPP, глиобластомы 101.8 и карциномы легких Льюис установлены морфологические, клинические и молекулярно-биологические различия инициации и прогрессии опухолей у ВУ и НУ животных. Темпы инициации и прогрессии колит-ассоциированного KPP по сравнению с ВУ животными у НУ выше. Все опухоли у НУ животных представлены аденокарциномами, в то время как у ВУ преимущественно железистой интраэпителиальной неоплазией, что свидетельствует о более поздней стадии опухолевой прогрессии у НУ мышей. Наряду с высокой экспрессией *Tnfa*, *Il6*, *Il10* и *Tgfb* в опухолях у НУ животных, в крови наблюдался дисбаланс субпопуляций лимфоцитов, выявлено увеличение нейтрофильно-лимфоцитарного индекса NLR по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует о развитии системного воспалительного ответа. Таким образом, процессы инициации и прогрессии опухолей на фоне хронического воспаления при KPP у НУ животных происходят быстрее и сопровождаются более выраженными ассоциированными с опухолью системным воспалительным ответом и иммунными реакциями.

Впервые показано, что ВУ и НУ животные в норме характеризуются молекулярно-биологическими особенностями эпителиального барьера ободочной кишки, которые могут

определять темпы инициации и прогрессии КРР на фоне хронического колита. В дистальном отделе ободочной кишки у НУ мышей выявлены более высокие уровни экспрессии генов *Hif1a*, *Hif3a*, *Nfkb*, *Il10*, *Trp53*, *Bax*, *Cldn2*, в то время как у ВУ была выше экспрессия *Pten*, *Cmet*, *Egfr*, *Bcl2*, *Muc1*, *Muc13* и *Cldn7*, что определяет провоспалительный фенотип НУ животных. На локальном уровне молекулярно-биологические особенности эпителия кишки могут определять его проницаемость, а также темпы инициации КРР. На системном уровне нарушение проницаемости эпителиального барьера может определять уровень ЛПС, поступающего в кровоток, и способствовать формированию провоспалительного фенотипа иммунных клеток у НУ организмов, который, в свою очередь, определяет тяжесть течения системного воспалительного ответа при прогрессии опухолей, в том числе глиобластомы и карциномы легких (рис. 14).

Таким образом, на трех экспериментальных моделях злокачественных опухолей показано, что НУ организмы являются группой риска, у которых выше темпы инициации и прогрессии опухолей на фоне хронического воспаления и более выражен ассоциированный с развитием опухолей системный воспалительный ответ. Исследованные нами опухоли имели разный гистогенетический тип, следовательно, не локализация опухоли является определяющим фактором, а исходная устойчивость всего организма к гипоксии. В настоящее время для терапии опухолей активно разрабатываются новые лекарственные препараты – ингибиторы HIF, которые, как правило, оказывают системное действие на организм, кроме того, при доклинической и клинической оценке их эффективности не учитывается исходная устойчивость организма к гипоксии, а также исходный уровень активности HIF и других генов, регулирующих ответ на гипоксическое воздействие. Полученные в работе данные вносят значительный вклад в понимание роли индивидуальной устойчивости организма к гипоксии в развитии опухолей и связанного с ними воспаления, и свидетельствуют о необходимости определения групп риска перед применением ингибиторов HIF. В перспективе комбинированное применение ингибиторов HIF с хирургическими и медикаментозными подходами у пациентов с учетом их индивидуальной устойчивости к гипоксии позволит улучшить прогноз опухолевых заболеваний.

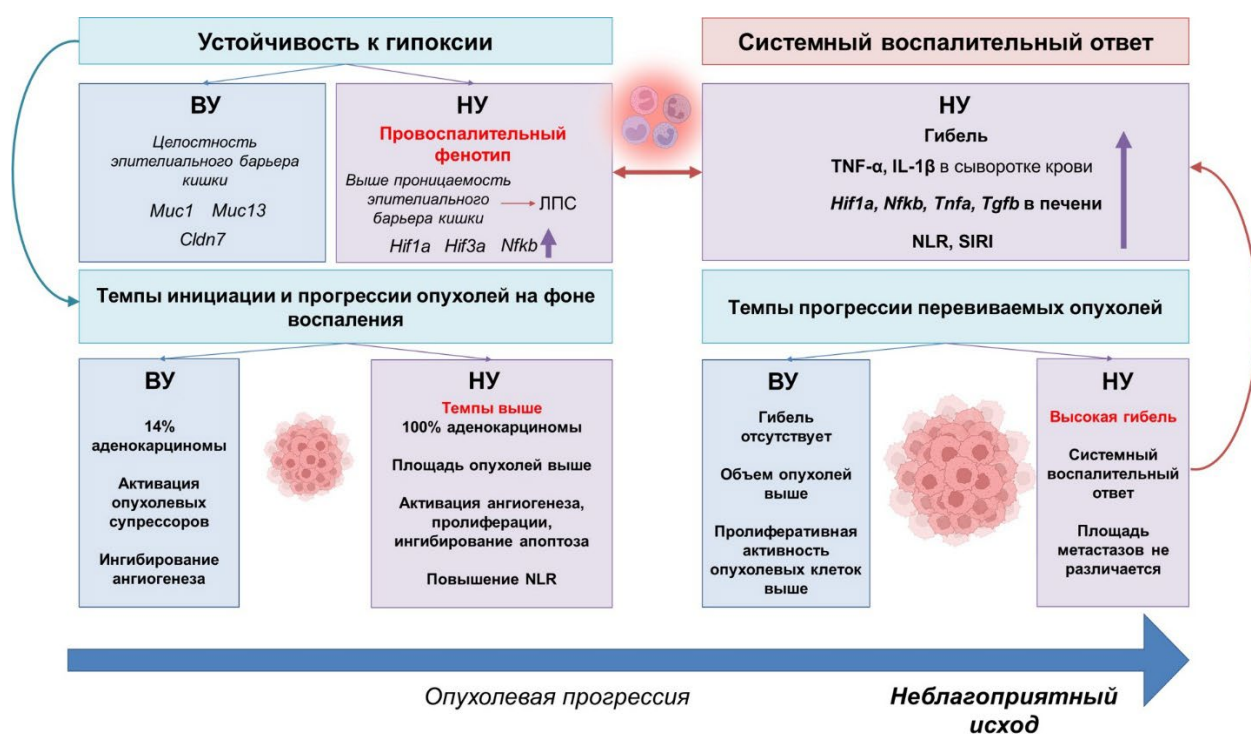


Рис. 14. Схема механизмов взаимосвязи устойчивости к гипоксии, опухолевого процесса и воспаления

Выявленные в зависимости от индивидуальной устойчивости к гипоксии особенности течения острого и хронического колита, а также инициации и прогрессии опухолей во многом обусловлены различиями в функционировании клеток врожденного иммунитета – макрофагов. По сравнению с НУ у ВУ животных выше экспрессия гена и содержание белка VEGF в неактивированных макрофагах, а у НУ крыс статистически значимо выше экспрессия генов провоспалительных цитокинов *Il1b* и *Tnfa*, и гена *Epas1 (Hif2a)*. У НУ животных выявлена провоспалительная активность как неактивированных, так и активированных ЛПС макрофагов. Полученные данные послужат основой для разработки новых подходов к терапии опухолей с учетом индивидуальной устойчивости организма к гипоксии, в том числе основанных на клеточной терапии с использованием репрограммированных макрофагов.

На основе проведенного исследования можно сделать важное практическое заключение о том, что применение в экспериментальных исследованиях воздействия в барокамере на критической «высоте» может существенно влиять на полученные результаты. В связи с тем, что воздействие на организм гипоксической нагрузки приводит к активации провоспалительных реакций при низкой устойчивости к недостатку кислорода, необходима разработка способов определения устойчивости к гипоксии без гипоксического воздействия. На основании выявленного провоспалительного фенотипа у НУ организмов разработан способ *ex vivo* определения устойчивости к гипоксии с помощью оценки спонтанной и стимулированной продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов.

Таким образом, в работе впервые установлены клеточные и молекулярно-биологические механизмы взаимосвязи исходной устойчивости организма к гипоксии, воспаления, инициации и прогрессии опухолей. Показано, что темпы инициации и прогрессии опухолей, а также выраженность ассоциированного с опухолевым процессом системного воспалительного ответа зависят от исходной устойчивости организма к гипоксии, что необходимо учитывать при разработке новых подходов к персонализированной терапии опухолей у человека.

ВЫВОДЫ

1. Исходная устойчивость к гипоксии самцов крыс Вистар зависит от возраста, и она взаимосвязана с уровнем экспрессии гена *Hif1a*, активностью пролилгидроксилазы PND2, продукцией АФК и провоспалительных цитокинов. Половозрелые высокоустойчивые и низкоустойчивые к гипоксии крысы Вистар различаются по экспрессии генов, регулирующих ответ на гипоксию – *Hif1a* и ангиогенез – *Vegf*.
2. При остром и хроническом язвенном колите по сравнению с высокоустойчивыми у низкоустойчивых к гипоксии мышей выраженность воспалительного процесса и иммунных нарушений выше. Низкая экспрессия генов, кодирующих компоненты эпителиального барьера ободочной кишки, у низкоустойчивых к гипоксии мышей характеризует его высокую проницаемость, что определяет тяжесть течения колита и темпы инициации и прогрессии колит-ассоциированного колоректального рака.
3. Уровни экспрессии генов, регулирующих воспаление и ответ на гипоксию, в тканях ободочной кишки по сравнению с высокоустойчивыми у низкоустойчивых к гипоксии животных в норме выше, что свидетельствует об их провоспалительном фенотипе.
4. На модели колит-ассоциированного колоректального рака показано, что темпы инициации и прогрессии опухолевого процесса по сравнению с высокоустойчивыми к гипоксии животными у низкоустойчивых выше. У низкоустойчивых к гипоксии животных прогрессия опухолевого процесса сопровождается выраженными иммунными нарушениями и системным воспалительным ответом.
5. Прогрессия глиобластомы 101.8 по сравнению с низкоустойчивыми крысами Вистар у высокоустойчивых характеризуется большим объемом опухолей и высокой пролиферативной

активностью клеток. При этом развитие опухоли у низкоустойчивых к гипоксии крыс сопровождается системным воспалительным ответом, который определяет их высокую гибель.

6. Темпы прогрессии и метастазирования при экспериментальной карциноме легких Льюис у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии животных не различаются, а выраженность системного воспалительного ответа выше у низкоустойчивых мышей.

7. Провоспалительный фенотип неактивированных и активированных липополисахаридом макрофагов выявлен у низкоустойчивых к гипоксии крыс. Уровни спонтанной и стимулированной комплексным митогеном продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов клетками крови *ex vivo* взаимосвязаны с исходной устойчивостью животных к гипоксии.

8. При злокачественных опухолях исходная устойчивость организма к гипоксии определяет темпы развития опухолевого процесса и тяжесть сопряженного с ним системного воспалительного ответа.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах Russian Science Citation Index (RSCI), Scopus, Web of Science (WoS), и в изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ им. М.В. Ломоносова по специальности 1.5.22. Клеточная биология:

1. Джалилова Д.Ш., Полякова М.А., Диатроптов М.Е., Золотова Н.А., Макарова О.В. Морфологические изменения толстой кишки и состав лимфоцитов периферической крови при остром колите у мышей с разной устойчивостью к гипоксии // Молекулярная медицина. 2018. № 6. С. 46-50. EDN: YQHRED. ИФ 0,472 (РИНЦ), RSCI (0,35/0,25)*
2. Джалилова Д.Ш., Золотова Н.А., Полякова М.А., Диатроптов М.Е., Добрынина М.Т., Макарова О.В. Морфологические особенности воспалительного процесса и субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови при хроническом колите у мышей с разной устойчивостью к гипоксии // Клиническая и экспериментальная морфология. 2018. № 4. С. 13-20. DOI: 10.31088/2226-5988-2018-28-4-13-20. IF 0,178 (SJР), Scopus, Q4 (0,50/0,40)
3. Косырева А.М., Джалилова Д.Ш., Цветков И.С., Диатроптов М.Е., Макарова О.В. Возрастные особенности устойчивости к гипоксии и выраженности индуцированной липополисахаридом системной воспалительной реакции у крыс Вистар // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2018. Т. 166. № 11. С. 652-657. EDN: YMXPZ. ИФ РИНЦ 0,880, RSCI (0,35/0,20) [Kosyрева A.M., Dzhalilova D.Sh., Tsvetkov I.S., Diatroptov M.E., Makarova O.V. Age-specific features of hypoxia tolerance and intensity of lipopolysaccharide-induced systemic inflammatory response in Wistar rats // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2019. Т. 166. № 5. С. 699-703. DOI: 10.1007/s10517-019-04421-3. IF 0,6 (JIF), WoS, Q4 (0,35/0,20)]
4. Dzhalilova D.Sh., Kosyрева A.M., Vishnyakova P.A., Zolotova N.A., Tsvetkov I.S., Mkhitarov V.A., Mikhailova L.P., Kakturskiy L.V., Makarova O.V. Age-related differences in hypoxia-associated genes and cytokine profile in male Wistar rats // Heliyon. 2021. Т. 7. № 9. С. e08085. DOI: 10.1016/j.heliyon.2021.e08085. IF 3,6 (JIF), WoS, Q1 (0,65/0,50)
5. Джалилова Д.Ш., Силина М.В., Косырева А.М., Цветков И.С., Макарова О.В. Морфологические и молекулярно-биологические особенности системного воспалительного ответа у старых крыс Вистар с высокой и низкой устойчивостью к гипоксии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2023. Т. 175. № 5. С. 650-656. EDN: IOSBJD. ИФ 0,880 (РИНЦ), RSCI (0,50/0,35) [Dzhalilova D.Sh., Silina M.V., Kosyрева A.M., Tsvetkov I.S., Makarova O.V. Morphological and molecular biological features of the systemic inflammatory response in old Wistar rats with high and low resistance to hypoxia // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2023. Т. 175. № 5. С. 704-710. DOI: 10.1007/s10517-023-05930-y. IF 0,6 (JIF), WoS, Q4 (0,50/0,35)]
6. Dzhalilova D.Sh., Zolotova N.A., Mkhitarov V.A., Kosyрева A.M., Tsvetkov I.S., Khalansky A.S., Alekseeva A.I., Fatkhudinov T.H., Makarova O.V. Morphological and molecular-biological features of glioblastoma progression in tolerant and susceptible to hypoxia Wistar rats // Scientific Reports. 2023. № 13. С. 12694. DOI: 10.1038/s41598-023-39914-9. IF 3,9 (JIF), WoS, Q1 (0,90/0,70)

7. **Dzhalilova D.Sh.**, Kosyрева А.М., Lokhonina A.V., Tsvetkov I.S., Vishnyakova P.A., Makarova O.V., Fatkhudinov T.H. Molecular and phenotypic distinctions of macrophages in tolerant and susceptible to hypoxia rats // PeerJ. 2023. № 11. С. e16052. DOI: 10.7717/peerj.16052. IF 2,4 (JIF), WoS, Q2 (1,90/1,50)
8. **Dzhalilova D.Sh.**, Kosyрева А.М., Tsvetkov I.S., Makarova O.V. Phagocytic activity of peripheral blood monocytes under *in vivo* and *in vitro* hypoxia conditions in tolerant and susceptible to oxygen deficiency rats // Medical Immunology (Russia). 2023. Т. 25. № 3. С. 551-556. DOI: 10.15789/1563-0625-PAO-2779. IF 0,143 (SJR), Scopus, Q4 (0,40/0,25)
9. Косырева А.М., **Джалилова Д.Ш.**, Цветков И.С., Макарова М.А., Макарова О.В. *Ex vivo* продукция ИЛ-1 β и ИЛ-10 активированными клетками крови крыс Вистар с разной устойчивостью к гипоксии с системным воспалительным ответом // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2023. № 3. С. 208-214. EDN: ASWFQB. ИФ 0,988 (РИНЦ), RSCI (0,50/0,25) [**Dzhalilova D.Sh.**, Tsvetkov I.S., Makarova M.A., Makarova O.V. *Ex vivo* production of IL-1 β and IL-10 by activated blood cells of Wistar rats with different resistance to hypoxia after systemic inflammatory response syndrome // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2023. № 3. С. 290-296. DOI: 10.1007/s10517-024-06010-5. IF 0,6 (JIF), WoS, Q4 (0,50/0,25)]
10. **Джалилова Д.Ш.**, Силина М.В., Косырева А.М., Цветков И.С., Макарова О.В. Сравнительная молекулярно-биологическая характеристика системного воспалительного ответа у половозрелых и старых самцов крыс Вистар с разной устойчивостью к гипоксии // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2023. № 4. С. 257-264. EDN: JEKEUB. ИФ 0,988 (РИНЦ), RSCI (0,50/0,35) [**Dzhalilova D.Sh.**, Silina M.V., Kosyрева A.M., Tsvetkov I.S., Makarova O.V. Comparative molecular and biological characteristic of the systemic inflammatory response in adult and old male Wistar rats with different resistance to hypoxia // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2024. № 4. С. 680-686. DOI: 10.1007/s10517-024-06090-3. IF 0,6 (JIF), WoS, Q4 (0,50/0,35)]
11. **Джалилова Д.Ш.**, Силина М.В., Золотова Н.А., Портнова Т.С., Вагабов М.Д., Цветков И.С., Макарова О.В. Морфологическая характеристика опухолей толстой кишки у мышей с разной устойчивостью к гипоксии // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2024. № 1. С. 53-60. EDN: KZOCYZ. ИФ 0,988 (РИНЦ), RSCI (0,50/0,40) [**Dzhalilova D.Sh.**, Silina M.V., Zolotova N.A., Portnova T.S., Vagabov M.D., Tsvetkov I.S., Makarova O.V. Morphological characteristics of colon tumors in mice with different tolerance to hypoxia // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2024. № 1. С. 162-168. DOI: 10.1007/s10517-024-06149-1. IF 0,6 (JIF), WoS, Q4 (0,50/0,40)]
12. **Джалилова Д.Ш.**, Косырева А.М., Макарова О.В. Спонтанная и стимулированная продукция цитокинов клетками крови *ex vivo* как биомаркер исходно высокой или низкой устойчивости к гипоксии у крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2024. Т. 177. № 4. С. 419-423. EDN: ONOEBM. ИФ 0,880 (РИНЦ), RSCI (0,35/0,25) [**Dzhalilova D.Sh.**, Kosyрева A.M., Makarova O.V. Spontaneous and stimulated production of cytokines by blood cells *ex vivo* as a biomarker of initially high or low hypoxia resistance in rats // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2024. Т. 177. № 4. С. 418-422. DOI: 10.1007/s10517-024-06200-1. IF 0,6 (JIF), WoS, Q4 (0,35/0,25)]
13. **Джалилова Д.Ш.**, Цветков И.С., Макарова О.В. Морфологическая характеристика тимуса при остром и хроническом колите у животных с разной устойчивостью к гипоксии // Российский иммунологический журнал. 2024. Т. 27. № 3. С. 413-420. DOI: 10.46235/1028-7221-16818-TMC. IF 0,127 (SJR), Scopus, Q4 (0,60/0,50)
14. **Dzhalilova D.Sh.**, Silina M.V., Tsvetkov I.S., Kosyрева A.M., Zolotova N.A., Gantsova E.A., Kirillov V.M., Fokichev N.S., Makarova O.V. Changes in the expression of genes regulating the response to hypoxia, inflammation, cell cycle, apoptosis, and epithelial barrier functioning during colitis-associated colorectal cancer depend on individual hypoxia tolerance // International Journal of Molecular Sciences. 2024. Т. 25. С. 7801. DOI: 10.3390/ijms25147801. IF 4,9 (JIF), WoS, Q1 (2,0/1,5)
15. **Джалилова Д.Ш.**, Маяк М.А., Косырева А.М., Силина М.В., Цветков И.С., Макарова О.В. Морфологические и молекулярно-биологические особенности прогрессии карциномы легкого Льюис у мышей с разной устойчивостью к гипоксии // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2024. № 3. С. 200-207. EDN: LNDDVP. ИФ 0,988 (РИНЦ), RSCI (0,50/0,35) [**Dzhalilova D.Sh.**, Maiak M.A., Kosyрева A.M., Silina M.V., Tsvetkov I.S., Makarova O.V. Morphological and molecular-biological features of Lewis lung carcinoma progression in mice with different resistance to hypoxia // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2024. Т. 178. С. 169-175. DOI: 10.1007/s10517-024-06301-x. IF 0,6 (JIF), WoS, Q4 (0,50/0,35)]
16. **Джалилова Д.Ш.**, Косырева А.М., Силина М.В., Маяк М.А., Цветков И.С., Макарова О.В. Продукция ИЛ-1 β и ИЛ-10 клетками крови крыс до и через месяц после сублетальной гипоксической нагрузки в барокамере // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2024. Т. 178. № 11. С. 637-642. EDN: JDQEFF. ИФ 0,880 (РИНЦ), RSCI (0,35/0,20) [**Dzhalilova D.Sh.**, Kosyрева A.M., Silina M.V.,

- Mayak M.A., Tsvetkov I.S., Makarova O.V. Production of IL-1 β and IL-10 by blood cells of rats before and one month after sublethal hypoxic exposure in a decompression chamber // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2025. Т. 178. № 5. С. 670-674. DOI: 10.1007/s10517-025-06395-x. IF 0,6 (JIF), WoS, Q4 (0,35/0,20)]
17. **Dzhalilova D.Sh.**, Silina M.V., Kosyreva A.M., Fokichev N.S., Makarova O.V. Morphofunctional changes in the immune system in colitis-associated colorectal cancer in tolerant and susceptible to hypoxia mice // PeerJ. 2025. № 13. С. e19024. DOI: 10.7717/peerj.19024. IF 2,4 (JIF), WoS, Scopus, Q2 (2,1/1,7)
18. **Джалилова Д.Ш.**, Силина М.В., Цветков И.С., Макарова О.В. Гематологические показатели при колит-ассоциированном колоректальном раке у животных с разной устойчивостью к гипоксии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2025. Т. 179. № 3. С. 358-363. EDN: LNXRWJ. ИФ 0,880 (РИНЦ), RSCI (0,40/0,30)
19. **Джалилова Д.Ш.**, Макарова О.В. Молекулярно-биологические механизмы взаимосвязи гипоксии, воспалительных и иммунных реакций // Иммунология. 2019. Т. 40. № 5. С. 97-105. DOI: 10.24411/0206-4952-2019-15010. IF 0,159 (SJR), Scopus, Q4 (0,65/0,55)
20. **Dzhalilova D.Sh.**, Makarova O.V. Differences in tolerance to hypoxia: physiological, biochemical, and molecular-biological characteristics // Biomedicine. 2020. Т. 8. № 10. С. 428. DOI: 10.3390/biomedicine8100428. IF 3,9 (JIF), WoS, Q1 (2,1/1,9)
21. Postovalova E.A., Makarova O.V., Kosyreva A.M., **Dzhalilova D.Sh.** Hypoxia – is a key mechanism for regulating inflammation in ulcerative colitis // Russian Open Medical Journal. 2020. Т. 9. № 1. С. e0101. DOI: 10.15275/rusomj.2020.0101. IF 0,2 (JIF), WoS, Q4 (0,35/0,15)
22. **Джалилова Д.Ш.**, Макарова О.В. HIF-опосредованные механизмы взаимосвязи устойчивости к гипоксии и опухолевого роста // Биохимия. 2021. Т. 86. № 10. С. 1403-1422. EDN: ХСΥАСК. ИФ 1,696 (РИНЦ), RSCI (1,4/1,2) [**Dzhalilova D.Sh.**, Makarova O.V. HIF-Dependent mechanisms of relationship between hypoxia tolerance and tumor development // Biochemistry (Moscow). 2021. Т. 86. № 10. С. 1403-1422. DOI: 10.1134/S0006297921100011. IF 0,659 (SJR), WoS, Scopus, Q2 (1,4/1,2)]
23. **Джалилова Д.Ш.**, Макарова О.В. Роль HIF – фактора, индуцируемого гипоксией, в механизмах старения // Биохимия. 2022. Т. 87. № 9. С. 1277-1300. EDN: BAXJHI. ИФ 1,696 (РИНЦ), RSCI (1,4/1,2) [**Dzhalilova D.Sh.**, Makarova O.V. The role of hypoxia-inducible factor in the mechanisms of aging // Biochemistry (Moscow). 2022. Т. 87. № 9. С. 995-1014. DOI: 10.1134/S0006297922090115. IF 0,659 (SJR), WoS, Scopus, Q2 (1,4/1,2)]
24. **Dzhalilova D.Sh.**, Zolotova N.A., Fokichev N.S., Makarova O.V. Murine models of colorectal cancer: the azoxymethane (AOM)/dextran sulfate sodium (DSS) model of colitis-associated cancer // PeerJ. 2023. № 11. С. e16159. DOI: 10.7717/peerj.16159. IF 2,4 (JIF), WoS, Q2 (2,2/1,9)

Патенты РФ

1. **Джалилова Д.Ш.**, Косырева А.М., Фокичев Н.С., Макарова О.В. Способ определения низкой устойчивости к гипоксии лабораторных животных *in vitro* по уровню спонтанной и стимулированной продукции IL-1 β клетками крови // Патент РФ 2821643 от 25.06.2024 Оpubл. 25.06.2024 Бюл. № 18 (Заявл. №2023126238 от 13.10.2023) (0,75/0,5)
2. **Джалилова Д.Ш.**, Косырева А.М., Фокичев Н.С., Макарова О.В. Способ определения устойчивости к гипоксии лабораторных животных по уровню продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов клетками крови // Патент РФ 2821545 от 25.06.2024 Оpubл. 25.06.2024 Бюл. № 18 (Заявл. №2023126237 от 13.10.2023) (0,75/0,5)

* – Объем в условных печатных листах/вклад автора в условных печатных листах

Список сокращений

АОМ – азоксиметан; АФК – активные формы кислорода; БЛУ – брыжеечные лимфатические узлы; ВУ – высокоустойчивые к гипоксии; ВЗК – воспалительные заболевания кишечника; ДСН – декстрансульфат натрия; ИФА – иммуноферментный анализ; КонА – Конканавалин А; КРР – колоректальный рак; ЛПС – липополисахарид; НУ – низкоустойчивые к гипоксии; ОК – острый колит; ПЦР – полимеразная цепная реакция; СПСО – собственная пластинка слизистой оболочки; СУ – среднеустойчивые к гипоксии; ФГА – фитогемагглютинин; ХК – хронический колит; HIF – Hypoxia-Inducible Factor – индуцируемый гипоксией фактор; HGF – Hepatocyte Growth Factor – фактор роста гепатоцитов; LMR – Lymphocyte-to-Monocyte Ratio – соотношение лимфоцитов к моноцитам; NF- κ B – Nuclear Factor- κ B – ядерный фактор κ B; NLR – Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio – нейтрофильно-лимфоцитарный индекс; SIRS – Systemic Inflammatory Response Index – индекс системного воспалительного ответа; VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor – фактор роста эндотелия сосудов