ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «РОССИЙСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ХИРУРГИИ
имени АКАДЕМИКА Б.В. ПЕТРОВСКОГО»
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МОРФОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА
имени АКАДЕМИКА А.П. АВЦЫНА»

На правах рукописи

Джалилова Джулия Шавкатовна

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

1.5.22. Клеточная биология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

доктора биологических наук

ТОМ I

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор

Макарова Ольга Васильевна

Москва – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ТОМ I

ТОМ I.....1
СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....9
ВВЕДЕНИЕ.....12
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....25
1.1. Клеточный ответ на гипоксию и устойчивость организмов к недостатку кислорода.....25
1.1.1. Фактор, индуцируемый гипоксией – HIF.....25
1.1.2. Молекулярно-биологические особенности организмов с разной устойчивостью к гипоксии и способы ее определения.....28
1.1.3. Способы повышения устойчивости к гипоксии и гипокситерапия.....33
1.1.4. Разработка способов определения устойчивости к гипоксии без воздействия недостатка кислорода.....37
1.2. Эпидемиология злокачественных опухолей и механизмы их развития.....40
1.2.1. Ключевые характеристики опухолевых клеток.....41
1.2.2. Механизмы развития злокачественных опухолей.....42
1.2.3. Способы моделирования опухолевого процесса у животных.....46
1.3. Роль воспаления и иммунных реакций в развитии опухолей.....52
1.3.1. Воспалительный и иммунный ответ на развитие опухоли.....52
1.3.2. Хроническое воспаление как фактор инициации злокачественных опухолей.....63
1.4. Гипоксия в развитии опухолей.....72
1.4.1. Гипоксия и активация HIF на различных этапах развития опухолей.....72
1.4.2. Роль гипоксии и HIF в прогрессии опухолей разной локализации и степени дифференцировки.....80
1.4.3. Потенциальные возможности терапии опухолей, основанные на коррекции внутриопухолевой гипоксии.....82
1.4.4. Структура заболеваемости злокачественными опухолями у населения, проживающего в высокогорных районах.....85
1.5. Взаимосвязь воспаления и гипоксии при развитии опухолей.....89
Заключение к обзору литературы.....95
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....98
2.1. Объекты исследования.....98
2.2. Методы исследования.....103
2.2.1. Исследование взаимосвязи между устойчивостью к гипоксии, окислительным стрессом и продукцией провоспалительных и противовоспалительных цитокинов у новорожденных, препубертатных и половозрелых самцов крыс Вистар.....103
Выведение животных из эксперимента и забор материала.....103
Выделение РНК из печени.....104
Постановка обратной транскрипции.....105
Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени.....105
Вестерн-блоттинг.....106
Биохимическое исследование.....108
Выделение клеток селезенки и их культивирование.....108
Иммуноферментный анализ.....109

2.2.2. Сравнительная характеристика устойчивости к гипоксии, уровней экспрессии *Hif1a*, *Nfkb* и *Vegf* в печени, содержания белка HIF-1α в сыворотке крови и числа нейтрофилов в легких у ВУ и НУ половозрелых и старых самцов крыс Вистар 109
Выведение животных из эксперимента и забор материала 110
Гистологическое и морфометрическое исследования 110
Выделение РНК, постановка обратной транскрипции и полимеразная цепная реакция в режиме реального времени 111
Иммуноферментный анализ 111
2.2.3. Моделирование острого и хронического язвенного колита у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6 111
Моделирование острого и хронического язвенного колита 111
Полуколичественная оценка клинических проявлений колита 113
Выведение животных из эксперимента и забор материала 113
Гистологическое и морфометрическое исследования 113
Проточная цитофлуориметрия 114
2.2.4. Моделирование колит-ассоциированного КРР у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6 115
Выведение животных из эксперимента и забор материала 116
Гистологическое и морфометрическое исследование 116
Гистохимическое и морфометрическое исследования 117
Иммуногистохимическое и морфометрическое исследования 117
Клинический анализ крови 118
Выведение животных из эксперимента и забор материала 121
Гистологическое и морфометрическое исследования 121
Гистохимическое исследование 121
Иммуногистохимическое исследование 122
Выделение РНК, постановка обратной транскрипции и полимеразная цепная реакция в режиме реального времени 122
Выделение клеток из ободочной кишки и брыжеечных лимфатических узлов 123
Клинический анализ крови 124
Проточная цитофлуориметрия 124
Иммуноферментный анализ 124
2.2.5. Морфологические, иммуногистохимические и молекулярно-биологические особенности прогрессии глиобластомы 101.8 у ВУ и НУ самцов крыс Вистар 125
Оценка гибели, клинических проявлений и динамики массы тела 126
Выведение из эксперимента и забор материала 127
Гистологическое и морфометрическое исследования, 3D реконструкция опухолей 127
Иммуногистохимическое исследование 127
Иммуноферментный анализ 128
2.2.6. Морфологические и молекулярно-биологические особенности прогрессии карциномы легких Льюис у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6 128
Культивирование клеток карциномы легких 130
Трансплантация клеток карциномы легких мышам C57Bl/6 130
Выведение животных из эксперимента, забор материала 131
Гистологическое и морфометрическое исследования 132
Выделение РНК, постановка обратной транскрипции и полимеразная цепная реакция в режиме реального времени 132
Клинический анализ крови 132
Проточная цитофлуориметрия 132

Иммуноферментный анализ 133
2.2.7. Молекулярно-биологические особенности макрофагов и уровень продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов у ВУ и НУ самцов крыс Вистар 133
Выделение моноцитов периферической крови 133
Культивирование макрофагов 134
Активация макрофагов липополисахаридом *in vitro* 134
Проточная цитофлуориметрия 135
Выделение РНК, постановка обратной транскрипции и полимеразная цепная реакция в режиме реального времени 135
Вестерн-блоттинг 135
Иммуноферментный анализ 136
Оценка фагоцитарной активности моноцитов крови 136
Оценка спонтанной и стимулированной продукции цитокинов 137
Оценка продукции цитокинов, стимулированной гипоксией и воспалением, у самцов крыс Вистар до и после сублетальной гипоксической нагрузки в барокамере 139
2.2.8. Разработка способов *ex vivo* оценки устойчивости к недостатку кислорода самцов крыс Вистар без сублетального гипоксического воздействия в барокамере 142
Статистические методы 145
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ 147
Раздел 1. Зависимость устойчивости к гипоксии от возраста 147
3.1. Взаимосвязь между устойчивостью к гипоксии, окислительным стрессом и продукцией провоспалительных и противовоспалительных цитокинов у новорожденных, препубертатных и половозрелых самцов крыс Вистар 147
3.1.1. Сравнительная характеристика «времени жизни» на «высоте» у новорожденных, препубертатных и половозрелых самцов крыс Вистар 148
3.1.2. Сравнительная характеристика уровня экспрессии *Hif1a* в печени, содержания белков HIF-1α и PHD2 в печени и содержания белка HIF-1α в сыворотке крови у новорожденных, препубертатных и половозрелых самцов крыс Вистар 149
3.1.3. Сравнительная характеристика показателей свободнорадикального окисления и антиоксидантной защиты в периферической крови, продукции IL-10, IFN-γ и TNF-α клетками селезенки у новорожденных, препубертатных и половозрелых самцов крыс Вистар 151
Заключение и обсуждение к 3.1 152
3.2. Сравнительная характеристика устойчивости к гипоксии, уровней экспрессии *Hif1a, Vegf* и *Nfkb* в печени, содержания белка HIF-1α в сыворотке крови и числа нейтрофилов в легких у половозрелых и старых самцов крыс Вистар 159
3.2.1. Сравнительная характеристика устойчивости к гипоксии у половозрелых и старых самцов крыс Вистар 159
3.2.2. Сравнительная характеристика уровней экспрессии *Hif1a, Vegf* и *Nfkb* в печени, содержания белка HIF-1α в сыворотке крови у половозрелых и старых ВУ и НУ самцов крыс Вистар 160
3.2.3. Сравнительная характеристика числа нейтрофилов в легких у половозрелых и старых ВУ и НУ самцов крыс Вистар 162
Заключение и обсуждение к 3.2 165
Раздел 2. Взаимосвязь инициации и прогрессии опухолей и устойчивости к гипоксии 170

3.3. Морфологическая характеристика язвенного и воспалительного процессов в ободочной кишке и морфофункциональные особенности иммунной системы при остром колите у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6 170
3.3.1. Клинические проявления острого язвенного колита у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6 171
3.3.2. Показатели длины ободочной кишки при остром язвенном колите у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6 173
3.3.3. Морфологическое и морфометрическое исследование ободочной кишки при остром язвенном колите у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6 174
3.3.4. Морфологическое и морфометрическое исследование тимуса и селезенки при остром язвенном колите у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6 181
3.3.5. Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови при остром язвенном колите у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6 186
Заключение и обсуждение к 3.3 188
3.4. Морфологическая характеристика язвенного и воспалительного процессов в ободочной кишке и морфофункциональные особенности иммунной системы при хроническом колите у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6 196
3.4.1. Клинические проявления хронического язвенного колита у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6 197
3.4.2. Показатели длины ободочной кишки при хроническом язвенном колите у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6 200
3.4.3. Морфологическое и морфометрическое исследование ободочной кишки при хроническом язвенном колите у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6 200
3.4.4. Морфологическое и морфометрическое исследование тимуса и селезенки при хроническом язвенном колите у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6 207
3.4.5. Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови при хроническом язвенном колите у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6 211
Заключение и обсуждение к 3.4 214
ТОМ II 1
3.5. Морфологическая характеристика, молекулярно-биологические и иммунологические особенности колоректального рака у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6 5
3.5.1. Динамика массы тела, морфологическая характеристика дистального отдела ободочной кишки и брыжеечных лимфатических узлов, частота развития и площадь опухолей через 70 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6 6
3.5.2. Клинический анализ крови через 70 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6 16
3.5.3. Динамика массы тела, морфологическая характеристика дистального отдела ободочной кишки, частота развития и площадь опухолей через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6 19
3.5.4. Уровни экспрессии генов и иммуногистохимическое исследование в перитуморальной зоне и в опухолях дистального отдела ободочной кишки через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6 25
3.5.5. Содержание HIF-1α и СРБ в сыворотке крови через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6 34
3.5.6. Субпопуляционный состав лимфоцитов и макрофагов в опухолях через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6 35

3.5.7. Морфологическое и морфометрическое исследование тимуса и селезенки через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у ВУ и НУ самцов мышей С57Bl/6 36
3.5.8. Морфологическое исследование брыжеечных лимфатических узлов, печени и легких через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у ВУ и НУ самцов мышей С57Bl/6 41
3.5.9. Субпопуляционный состав клеток брыжеечных лимфатических узлов через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у ВУ и НУ самцов мышей С57Bl/6 45
3.5.10. Клинический анализ и субпопуляционный состав клеток периферической крови через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у ВУ и НУ самцов мышей С57Bl/6 48
3.5.11. Выявление железосодержащего пигмента гемосидерина в аденокарциномах дистального отдела ободочной кишки через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у ВУ и НУ самцов мышей С57Bl/6..... 54
Заключение и обсуждение к 3.5 55
3.6. Морфологические, иммуногистохимические и молекулярно-биологические особенности прогрессии глиобластомы 101.8 у ВУ и НУ самцов крыс Вистар.....80
3.6.1. Гибель животных и динамика массы тела на 11-е и 15-е сут после трансплантации глиобластомы у ВУ и НУ самцов крыс Вистар..... 81
3.6.2. Морфологическое исследование глиобластомы 101.8 на 11-е и 15-е сут после трансплантации у ВУ и НУ самцов крыс Вистар 83
3.6.3. Волюмометрическая оценка опухолей с помощью 3D реконструирования на 11-е и 15-е сут после трансплантации глиобластомы у ВУ и НУ самцов крыс Вистар..... 85
3.6.4. Оценка абсолютного числа кровеносных сосудов и площади некрозов в опухолях на 11-е и 15-е сут после трансплантации глиобластомы у ВУ и НУ самцов крыс Вистар..... 86
3.6.5. Оценка пролиферативной активности опухолевых клеток на 11-е и 15-е сут после трансплантации глиобластомы у ВУ и НУ самцов крыс Вистар 87
3.6.6. Содержание TNF-α, IL-1β и HIF-1α в сыворотке крови на 11-е и 15-е сут после трансплантации глиобластомы у ВУ и НУ самцов крыс Вистар 89
Заключение и обсуждение к 3.6 90
3.7. Морфологические и молекулярно-биологические особенности прогрессии карциномы легких у ВУ и НУ самцов мышей С57Bl/6.....100
3.7.1. Гибель животных, частота развития опухолей и метастазирования, динамика массы тела на 21-е и 28-е сут после подкожного введения клеток карциномы легких у ВУ и НУ самцов мышей С57Bl/6 101
3.7.2. Оценка массы и объема подкожных опухолей, морфологическое исследование опухолей и анализ пролиферативной активности опухолевых клеток на 21-е и 28-е сут после подкожного введения клеток карциномы легких у ВУ и НУ самцов мышей С57Bl/6 105
3.7.3. Морфологическое и морфометрическое исследование легких на 21-е и 28-е сут после подкожного введения клеток карциномы легких у ВУ и НУ самцов мышей С57Bl/6 107
3.7.4. Морфологическое и морфометрическое исследование тимуса и морфологическое исследование селезенки на 21-е и 28-е сут после подкожного введения клеток карциномы легких у ВУ и НУ самцов мышей С57Bl/6 111
3.7.5. Клинический анализ и субпопуляционный состав клеток периферической крови на 21-е и 28-е сут после подкожного введения клеток карциномы легких у ВУ и НУ самцов мышей С57Bl/6 117

3.7.6. Уровни экспрессии генов *Hif1a, Nfkb, Tnfa, Il1b* и *Tgfb* в печени на 21-е и 28-е сут после подкожного введения клеток карциномы легких у ВУ и НУ самцов мышей С57Bl/6 119
3.7.7. Содержание СРБ в сыворотке крови на 21-е и 28-е сут после подкожного введения клеток карциномы легких у ВУ и НУ самцов мышей С57Bl/6 121
Заключение и обсуждение к 3.7 121
Раздел 3. Молекулярно-биологические особенности макрофагов, уровень продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в зависимости от устойчивости к гипоксии и определение лабораторных способов оценки устойчивости к недостатку кислорода 130
3.8. Молекулярно-биологические особенности макрофагов и уровень продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов у ВУ и НУ самцов крыс Вистар 131
3.8.1. Молекулярно-биологическая и функциональная характеристика макрофагов у ВУ и НУ самцов крыс Вистар..... 132
3.8.2. Спонтанная и стимулированная продукция цитокинов клетками крови у ВУ и НУ самцов крыс Вистар 141
3.8.3. Продукция цитокинов, стимулированная гипоксией и воспалением, у самцов крыс Вистар до и после сублетальной гипоксической нагрузки в барокамере..... 143
Заключение и обсуждение к 3.8 147
3.9. Разработка способов *ex vivo* оценки устойчивости к недостатку кислорода самцов крыс Вистар без сублетального гипоксического воздействия в барокамере 167
3.9.1. Фагоцитарная активность моноцитов периферической крови до определения устойчивости самцов крыс Вистар к гипоксии..... 168
3.9.2. Спонтанная и стимулированная гипоксией продукция цитокинов клетками крови до определения устойчивости животных к гипоксии..... 169
3.9.3. Спонтанная и стимулированная провоспалительными стимулами продукция цитокинов клетками крови до определения устойчивости животных к гипоксии..... 170
Заключение и обсуждение к 3.9 171
Глава 4. ОБЩЕЕ ОБСУЖДЕНИЕ 177
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 195
ВЫВОДЫ.....199
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....200
ПРИЛОЖЕНИЯ.....250
Приложение 1. Взаимосвязь между устойчивостью к гипоксии, окислительным стрессом и содержанием провоспалительных и противовоспалительных цитокинов у новорожденных, препубертатных и половозрелых самцов крыс Вистар.....250
Приложение 2. Сравнительная характеристика устойчивости к гипоксии, уровней экспрессии *Hif1a, Vegf* и *Nfkb* в печени, содержания белка HIF-1α в сыворотке крови и числа нейтрофилов в легких у ВУ и НУ половозрелых и старых самцов крыс Вистар.....251
Приложение 3. Морфологическая характеристика язвенного и воспалительного процессов в ободочной кишке и морфофункциональные особенности иммунной системы при остром колите у ВУ и НУ самцов мышей С57Bl/6.....252
Приложение 4. Морфологическая характеристика язвенного и воспалительного процессов в ободочной кишке и морфофункциональные особенности иммунной системы при хроническом колите у ВУ и НУ самцов мышей С57Bl/6 257

Приложение 5. Морфологическая характеристика, молекулярно-биологические и иммунологические особенности колоректального рака у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6 261
Приложение 6. Морфологические, иммуногистохимические и молекулярно-биологические особенности прогрессии глиобластомы 101.8 у ВУ и НУ самцов крыс Вистар 279
Приложение 7. Морфологические и молекулярно-биологические особенности прогрессии карциномы легких у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6 281
Приложение 8. Молекулярно-биологические особенности макрофагов и уровень продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов у ВУ и НУ самцов крыс Вистар 288
Приложение 9. Разработка способов *ex vivo* оценки устойчивости к недостатку кислорода самцов крыс Вистар без сублетального гипоксического воздействия в барокамере.....295

СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

O_2 – кислород

CO_2 – углекислый газ

pO_2 – парциальное давление кислорода

АД – артериальное давление

АОМ – азоксиметан

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

БЛУ – брыжеечные лимфатические узлы

ВЗК – воспалительные заболевания кишечника

ВКМ – внеклеточный матрикс

ВУ – высокоустойчивые к гипоксии

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДСН – декстрансульфат натрия

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ИГХ – иммуногистохимическое исследование

ИФА – иммуноферментный анализ

кДНК – комплементарная ДНК

КонА – Конканавалин А

КРР – колоректальный рак

ЛПС – липополисахарид

НУ – низкоустойчивые к гипоксии

ПАЛМ – периартериолярные лимфоидные муфты

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

СВО – системный воспалительный ответ

СПСО – собственная пластинка слизистой оболочки

СРБ – С-реактивный белок

СУ – среднеустойчивые к гипоксии

ФГА – фитогемагглютинин

ЦНС – центральная нервная система

ЧСС – частота сердечных сокращений

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход

ЭТЦ – электрон-транспортная цепь

ЭЭГ – электроэнцефалограмма

ЯК – язвенный колит

AKT – Protein Kinase B – протеинкиназа B

ARNT – Aryl Hydrocarbon Nuclear Receptor Translocator – ядерный транслокатор арильного углеводородного рецептора

CAFs – Cancer-Associated Fibroblasts – опухоль-ассоциированные фибробласты

CBP/p300 – CREB (cAMP-Response Element-Binding Protein)-Binding Protein/E1A Binding Protein p300

CCR7 – C-C Chemokine Receptor type 7

CD – Cluster of Differentiation – кластер дифференцировки

CREB – cAMP-Response Element-Binding Protein

DAMPs – Damage-Associated Molecular Patterns – молекулы, связанные с повреждением

EGF – Epidermal Growth Factor – эпидермальный фактор роста

EGFR – Epidermal Growth Factor Receptor – рецептор эпидермального фактора роста

EPAS – Endothelial PAS

EPO – Erythropoietin – эритропоэтин

FGF – Fibroblast Growth Factor – фактор роста фибробластов

FIH – Factor-Inhibiting HIF – фактор, ингибирующий HIF

FITC – Fluorescein Isothiocyanate – флуоресцеин изотиоцианат

FORD – Free Oxygen Radicals Defence

FORT – Free Oxygen Radicals Testing

FOXP3 – Forkhead Box P3

GLUT – Glucose Transporter – глюкозный переносчик

HGF – Hepatocyte Growth Factor – фактор роста гепатоцитов

HIF – Hypoxia-Inducible Factor – индуцируемый гипоксией фактор

HREs – Hypoxia Response Elements – отвечающие на гипоксию элементы

HSP – Heat Shock Proteins – белки теплового шока

IFN-γ – Interferon-γ – интерферон-γ

Ig – Immunoglobulin – иммуноглобулин

IκB – Inhibitor of NF-κB – ингибитор NF-κB

IKK – IκB Kinase – киназа ингибитора NF-κB – IκB

IL – InterLeukin – интерлейкин

iNOS – inducible Nitric Oxide Synthase – индуцибельная синтаза оксида азота

LMR – Lymphocyte-to-Monocyte Ratio – соотношение лимфоцитов к моноцитам

LLC – Lewis Lung Carcinoma – карцинома легких Льюис

MAPK – Mitogen-Activated Protein Kinase – митоген-активируемая протеинкиназа

MDSCs – Myeloid-Derived Suppressor Cells – супрессорные клетки миелоидного происхождения

MHC – Major Histocompatibility Complex – главный комплекс гистосовместимости

MMPs – Matrix MetalloProteinases – матриксные металлопротеиназы

mTOR – Mammalian Target Of Rapamycin – мишень рапамицина у млекопитающих

NF-κB – Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells – ядерный фактор «каппа-би»

NK – Natural Killer – естественные киллеры

NLR – Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio – нейтрофильно-лимфоцитарный индекс

NO – Nitric Oxide – оксид азота

PAMPs – Pathogen-Associated Molecular Patterns – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны

PBS – Phosphate Buffered Saline – Фосфатно-Солевой Буфер

PCNA – Proliferating Cell Nuclear Antigen – ядерный антиген пролиферирующих клеток

PDGF – Platelet-Derived Growth Factor – фактор роста тромбоцитов

PE – Phycoerythrin – фикоэритрин

PE-Cy7 – Phycoerythrin-Cyanine 7 – фикоэритрин-цианин 7

PHD – Prolyl Hydroxylase Domain protein – пролилгидроксилаза

PI3K – PhosphatidylInositol 3-Kinase – фосфатидилинозитол 3-киназа

pVHL – Von Hippel-Lindau (VHL) E3 ligase complex – Е3-убиквитинлигазный комплекс фон Гиппеля-Линдау

SIRI – Systemic Inflammatory Response Index – индекс системного воспалительного ответа

TAMs – Tumor-Associated Macrophages – макрофаги, ассоциированные с опухолью

TGF – Transforming Growth Factor – трансформирующий фактор роста

Th – T-helper – Т-хелпер

TLRs – Toll-Like Receptors – Толл-подобные рецепторы

TME – Tumor Microenvironment – опухолевое микроокружение

TNF-α – Tumor Necrosis Factor-α – фактор некроза опухоли α

VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor – фактор роста сосудистого эндотелия

ВВЕДЕНИЕ

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; Dzhalilova 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; Dzhalilova 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; Dzhalilova 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-1α, 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-1α 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-1α, 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., 2024б). 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 Tugasworo, 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 КРР (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 (Virhow, 1858). В настоящее время установлено, что хроническое воспаление является определяющим фактором развития многих опухолей, включая колит-ассоциированный КРР (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 инициируют 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-κB и HIF-1α при развитии опухоли способствует экспрессии одних и тех же генов-мишеней, регулирующих воспаление, метаболизм, аутофагию, клеточный цикл, апоптоз, ангиогенез, миграцию, инвазию и метастазирование. HIF-1α 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-1α, 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-1α в сыворотке крови. Высокое

содержание белка HIF-1α 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-1β 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-1β 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-1α, 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-1β 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-1β 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-1β 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-1β 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 результатам диссертации опубликовано 26 печатных работ общим объемом 23 п.л. в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ им. М.В. Ломоносова по специальности 1.5.22. Клеточная биология: статьи в журналах, индексируемых в международных системах цитирования Web of Science, Scopus, RSCI – 24; патенты РФ – 2; тезисы докладов, опубликованных в журналах/материалах конференций – 43. Сделано устных и стендовых докладов – 50. В статьях, опубликованных в соавторстве, основополагающий вклад принадлежит соискателю.

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 «Агаджаняновские 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.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Клеточный ответ на гипоксию и устойчивость организмов к недостатку кислорода

1.1.1. Фактор, индуцируемый гипоксией – HIF

Гипоксия, или недостаток кислорода, – фундаментальный фактор, возникающий как в физиологических, так и в патологических условиях. Гипоксии принадлежит решающая роль как в возникновении, так и в течении многих заболеваний, так как любое патологическое состояние прямо или косвенно связано с нарушением кислородного «бюджета» организма (Меерсон, 1989; Гаркави и соавт., 1990; Горанчук и соавт., 2003). Физиологические уровни O_2 значительно варьируют в зависимости от типа ткани и влияют на функционирование клеток (Keeley и Mann, 2019; Ortmann et al., 2024).

За последние 10 лет термин «гипоксия» дважды широко упоминался в научной литературе – при вручении Нобелевской премии в 2019 г. и во время пандемии COVID-19 (Richalet, 2021; Richalet et al., 2024). Кроме того, после открытия в 1992 г. фактора, индуцируемого гипоксией – HIF (Hypoxia-Inducible Factor) (Semenza и Wang, 1992), с каждым годом увеличивается число исследований, посвященных взаимосвязи кислородной недостаточности с развитием злокачественных опухолей (рис. 1.1) (Millet et al., 2022).

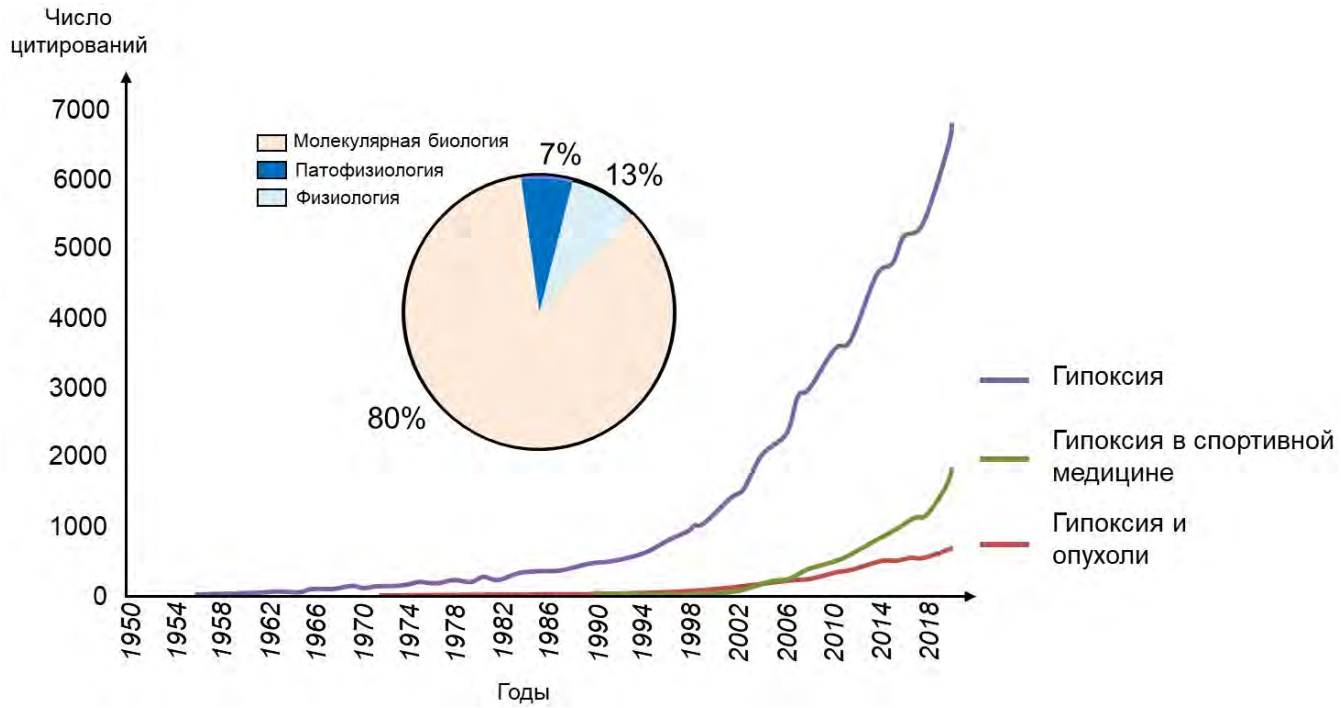


Рис. 1.1. Распространенность молекулярно-биологических, физиологических и патофизиологических исследований, посвященных гипоксии, взаимосвязи гипоксии с развитием опухолей, гипоксии в спортивной медицине с течением времени (по G.P. Millet и соавт., 2022, в модификации)

Клеточный ответ на гипоксию реализуется через сигнальный путь транскрипционного фактора HIF (Semenza и Wang, 1992; Ratcliffe et al., 2017; Wicks и Semenza, 2022; Semenza, 2023). По данным ряда авторов, в ответ на двухчасовое гипоксическое воздействие (10% O_2) уровень экспрессии гена *Hif1a* в легких мышей повышался в течение 30 мин, достигал пика через 1 ч после воздействия и возвращался к исходному уровню через 4 ч. При этом содержание белка HIF-1α возрастало через 30 мин в ответ на недостаток кислорода и оставалось повышенным в течение 8 ч после гипоксического воздействия (Blouin et al., 2004; Belaiba et al., 2007). HIF регулирует баланс между окислительным и гликолитическим метаболизмом как в нормальных, так и в опухолевых клетках (Semenza, 2013; Kierans и Taylor, 2021) и стимулирует повышенную доставку O_2 путем активации транскрипции генов, контролирующих эритропоэз (Semenza, 2010; Watts et al., 2020) и ангиогенез (Rey и Semenza, 2010; Rodriguez et al., 2021) для увеличения системного и локального снабжения кислородом, соответственно.

При гипоксии внутри любой клетки повышается или снижается экспрессия нескольких тысяч генов (Wicks и Semenza, 2022). Экспрессия мРНК, индуцированная недостатком кислорода, реализуется за счет прямого связывания HIF с элементами ответа на гипоксию (Hypoxia Response Elements, HREs) в генах-мишенях, которые содержат последовательность 5'-(A/G)CGTG-3' (Semenza et al., 1996). Напротив, снижение экспрессии мРНК при гипоксии косвенно опосредовано HIF-зависимой активацией генов, кодирующих микроРНК, репрессоры транскрипции, белки, модифицирующие хроматин, и белки, которые модифицируют РНК или связываются с ней (Schödel et al., 2011; Cavadas et al., 2017).

Установлено, что HIF является гетеродимером, состоящим из одной регулируемой кислородом изоформы α-субъединицы (HIF-1α, HIF-2α или HIF-3α) и конститутивно экспрессирующейся субъединицы HIF-β (ARNT, Aryl Hydrocarbon Nuclear Receptor Translocator – ядерный транслокатор (переносчик) ароматических углеводородов) (Semenza и Wang, 1992; Ratcliffe et al., 2017; Semenza, 2023; Bishop и Ratcliffe, 2025). При достаточной концентрации O_2 синтезирующаяся *de novo* цитоплазматическая субъединица HIF-α регулируется гидроксилированием пролиновых остатков с помощью пролилгидроксилаз (Prolyl Hydroxylase Domain proteins – PHD1, PHD2 и PHD3), что способствует протеасомной деградации HIF-α с помощью E3-убиквитинлигазного комплекса фон Гиппеля-Линдау (Von Hippel-Lindau, pVHL) (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001). Активность гидроксилаз зависит от содержания кислорода в тканях: при низком парциальном давлении или отсутствии O_2 она подавляется, что приводит к уменьшению гидроксилирования HIF-α. В результате субъединица HIF-α накапливается в цитоплазме клеток и затем транслоцируется в ядро, где димеризуется с HIF-β-субъединицей. В ядре димер HIF-α/β взаимодействует с отвечающими на гипоксию элементами HREs, которые расположены в промотерах кислород-зависимых генов, кодирующих белки, вовлеченные в

системную и клеточную адаптацию к гипоксии, такие как эритропоэтин, фактор роста эндотелия сосудов (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) и др. (Semenza, 2010; Schödel et al., 2011; Dudley и Griffioen, 2023). При этом транскрипционная активность HIF регулируется фактором, ингибирующим HIF – FIH-1 (Factor Inhibiting HIF-1), который гидроксилирует аспарагиновые остатки в домене трансактивации HIF-α субъединиц, за счет чего блокирует связывание с коактиваторами транскрипции CBP/p300 [CREB (cAMP-Response Element-Binding Protein)-Binding Protein/E1A Binding Protein p300] (Lando et al., 2002; García-Del Río et al., 2023). Таким образом, в зависимости от содержания кислорода гидроксилирование пролина и аспарагина в субъединицах HIF-α отрицательно регулирует их стабильность и транскрипционную активность HIF в отношении зависимых генов.

Охарактеризовано множество независимых от гипоксии механизмов стабилизации субъединиц HIF-α в условиях нормоксии. Это состояние называется псевдогипоксией и возникает из-за чувствительности пролилгидроксилаз не только к изменениям содержания O_2, но и АФК, железа, аскорбата и промежуточных продуктов цикла Кребса (Schönenberger и Kovacs, 2015; Ratcliffe et al., 2017; Hayashi et al., 2018). При мутациях в генах, кодирующих белки, вовлеченные в цикл Кребса, происходит стабилизация субъединиц HIF-α путем ингибирования их гидроксилирования (Schönenberger и Kovacs, 2015). Например, при мутациях в генах изоцитратдегидрогеназ-1/2 (Isocitrate DeHydrogenase, *IDH1/2*), которые обнаружены более чем в 80% глиобластом, наблюдается активация HIF-1α (Zhao et al., 2009; Liu et al., 2020). Лактат путем подавления PHD-опосредованного гидроксилирования пролина способен вызывать активацию HIF-1α (Sonveaux et al., 2012). Повышение уровней сукцината и фумарата из-за мутаций в генах, кодирующих соответствующие ферменты, приводит к ингибированию пролилгидроксилаз и стабилизации HIF-α (Schönenberger и Kovacs, 2015). Показано, что повышение концентрации пирувата также вызывает псевдогипоксические состояния (Kim, 2011). Активация HIF-1α, опосредованная псевдогипоксией, является ключевым механизмом развития ряда миелодиспластических синдромов (Hayashi et al., 2018).

Кроме того, активация субъединицы HIF-α происходит при изменении содержания цитокинов и ростовых факторов, таких как провоспалительный цитокин IL-1β (InterLeukin-1β), трансформирующий фактор роста-β TGF-β (Transforming Growth Factor-β), белок теплового шока HSP90 (Heat Shock Protein-90), активации транскрипционного фактора NF-κB (Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells – ядерный фактор «каппа-би»), сигнальных путей фосфатидилинозитол-3-киназы PI3K/AKT/mTOR (PhosphatidylInositol 3-Kinase/Protein Kinase B/ Mammalian Target Of Rapamycin), MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) и др. (Hellwig-Bürgel et al., 1999; Rius et al., 2008; Semenza, 2010). Активация PI3K/AKT/mTOR зависит от рецептора эпидермального фактора роста EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), который играет важную

роль в регуляции пролиферации опухолевых клеток (Zhong et al., 2000; Laughner et al., 2001). Таким образом, при опухолевой прогрессии активация HIF может происходить в результате воздействия множества факторов даже при достаточном содержании кислорода.

Установлено, что активность HIF увеличена во многих опухолях, при этом повышенное содержание HIF-1α в образцах их первичных диагностических биоптатов обычно связано с неблагоприятным прогнозом (Semenza, 2010). По разным оценкам, HIF-1α регулирует транскрипцию более 1000 генов или 1-2% всех генов. Количество установленных генов-мишеней, активируемых HIF-1α, продолжает увеличиваться и включает в себя гены, регулирующие многие клеточные и молекулярно-биологические механизмы развития опухолей (Schito и Semenza, 2016; Kindrick и Mole 2020; Ma et al., 2022б), что будет обсуждаться ниже.

1.1.2. Молекулярно-биологические особенности организмов с разной устойчивостью к гипоксии и способы ее определения

Термин «устойчивость к гипоксии» впервые упоминался в той же работе, в которой предложен сам термин «гипоксия» (Pace et al., 1945). Вариабельность устойчивости к гипоксии возникла параллельно с эволюцией аэробного метаболизма, поскольку у различных организмов развились механизмы адаптации к снижению доступности кислорода. Разные виды по-разному адаптированы к уменьшению доступности O_2, у людей существуют индивидуальные особенности физиологических реакций на гипоксию (Yu et al., 2022; Huang et al., 2025).

Устойчивость к гипоксии определяется генетическими, эпигенетическими и фенотипическими свойствами организма: характером его энергетического обмена, степенью совершенства его регуляторных механизмов, их способностью перестраиваться и приспосабливаться к гипоксическим условиям, сохраняя жизнедеятельность (Меерсон, 1989; Лукьянова, 2019; Kirova et al., 2013; Post et al., 2024; Kurhaluk и Tkaczenko, 2025).

Исследования индивидуальной устойчивости к недостатку кислорода активно продолжаются в настоящее время, одним из наиболее распространенных методов ее определения является модель, воспроизводящая условия гипобарической гипоксии в декомпрессионных камерах, в которые помещают добровольцев, пилотов, космонавтов, а также экспериментальных животных (Julian et al., 2011; Ghosh et al., 2012; Jain et al., 2013; Padhy et al., 2013; Tregub et al., 2013; Serebrovskaya и Xi, 2016; Dzhalilova et al., 2019a, б; Kurhaluk et al., 2019; Belosludtsev et al., 2020; Kurhaluk и Tkaczenko, 2025). По данным клинических и патофизиологических исследований влияния высокогорных условий на организм по способности адаптироваться к недостатку кислорода, то есть по различиям в исходной устойчивости к гипоксии, выделяют две полярные группы лабораторных животных и людей. В экспериментальных исследованиях по результатам оценки «времени жизни» (времени до появления респираторных нарушений,

признаков асфиксии и принятия бокового положения) в условиях гипобарической гипоксии в барокамере животных делят на высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ). «Время жизни» ВУ животных обычно отличается от НУ как минимум в три раза (Березовский, 1978; Каркищенко, 2017). В результате определения устойчивости к гипоксии в барокамере значительная доля приходится на среднеустойчивых (СУ) животных (40–58%), доля ВУ животных колеблется от 20 до 42%, а НУ – от 18 до 40%. СУ животных, как правило, не используют в дальнейших экспериментах (Джалилова и Макарова, 2022; Jain et al., 2013; Kirova et al., 2013; Pavlik et al., 2018; Dzhalilova et al., 2019a, б; Kurhaluk и Tkaczenko, 2025).

При проведении специальных исследований в барокамере людей, в частности пилотов и космонавтов, также разделяют на ВУ и НУ (Газенко, 1987; Почуев, 2007; Glazachev et al., 2020). Однако преимущественным способом оценки устойчивости людей к гипоксии является пребывание в условиях, соответствующих высоте в несколько тысяч метров и разделение на устойчивых и чувствительных в зависимости от их восприимчивости к острой горной болезни и высокогорному отеку легких (Maleev, 2015; Lu et al., 2016; Kammerer et al., 2018; Lu et al., 2018; Guo et al., 2023). По данным исследований высокогорных популяций, таких как жители Анд, Эфиопии и Тибета, выявлены особенности адаптации к хронической гипоксии, включая изменения эритроцитов, содержания гемоглобина, ангиогенеза, вазорегуляции и иммунного ответа (Simonson, 2015; Azad et al., 2017). Эти особенности дают представление о приспособительных реакциях организма в ответ на гипоксию и являются моделью для исследований и разработки новых способов лечения различных заболеваний, основанных на коррекции индивидуальной устойчивости к недостатку кислорода и направленных на ее повышение (Post et al., 2024).

Чувствительность к гипоксии, в том числе разных видов организмов, во многом обусловлена структурными и функциональными особенностями митохондрий и уровнем окислительного стресса (Лукьянова, 2019; Plotnikov et al., 2011; Plotnikov и Zorov, 2019). Известны различия биоэнергетических и окислительно-восстановительных систем у чувствительных и устойчивых к гипоксии видов животных, включая водные, высокогорные и подземные виды (Sokolova et al., 2019). Генетический анализ 12 видов устойчивых к гипоксии млекопитающих доказывает сильный положительный отбор и конвергентную эволюцию генов, регулирующих электрон-транспортную цепь (ЭТЦ) и окислительное фосфорилирование (Tian et al., 2017). При этом общий адаптационный механизм у устойчивых к гипоксии животных, включая позвоночных и беспозвоночных, обусловлен способностью митохондрий восстанавливать дефицит энергии, вызванный гипоксией, и снижать продукцию АФК при реоксигенации (Sokolova et al., 2019). У чувствительных к гипоксии видов, таких как большинство наземных млекопитающих, воздействие гипоксии значительно снижает

окислительное фосфорилирование в митохондриях и может привести к дефициту АТФ, в то время как аноксия приводит к полному прекращению аэробной продукции АТФ (Hochachka и Mommsen, 1983; Grieshaber et al., 1994). Кроме того, гипоксия способствует повышенной продукции АФК из-за проскальзывания электронов из частично восстановленных вышестоящих комплексов ЭТЦ и/или обратного потока электронов через митохондриальный комплекс I (Chouchani et al., 2014; Cadenas, 2018). АФК могут окислять и повреждать митохондриальные мембраны, а также ферменты ЭТЦ, что приводит к подавлению окислительного фосфорилирования и гиперпродукции АФК (Aragonés et al., 2009; Hernansanz-Agustín et al., 2014). При колебаниях концентрации кислорода основной мишенью внутриклеточных повреждений являются митохондрии из-за их высокой чувствительности к O_2.

Энергетический обмен считается одним из основных факторов, определяющих индивидуальную устойчивость организма к гипоксии (Дудченко и Лукьянова, 2003; Лукьянова, 2019). Установлено, что митохондрии различаются как у ВУ и НУ организмов одного вида, так и между разными видами. По данным Л.Д. Лукьяновой (2019) ВУ и НУ организмам соответствуют два принципиально разных «функционально-метаболических портрета», в основе которых находятся различия в эффективности работы энергетического аппарата, ультраструктурных и функциональных характеристиках митохондрий и кинетических свойствах ферментов дыхательной цепи, а также в состоянии центральной нервной системы (ЦНС) и биохимических свойствах крови. Суммарное потребление O_2 ВУ крысами в нормоксических условиях выше по сравнению с НУ, обмен веществ у них не снижен, что могло бы быть причиной их высокой устойчивости к гипоксии (Лукьянова, 2019).

Кроме того, ВУ и НУ животные различаются особенностями функционирования ЦНС. При подъеме в барокамере на критическую «высоту» динамика ЭЭГ принципиально различалась у ВУ и НУ крыс (Малышев и соавт., 1996). НУ – животные, преимущественно обладающие: слабым типом нервной системы, повышенной возбудимостью и эмоциональной реактивностью, истощаемостью возбудительного процесса, более выраженной судорожной готовностью, менее развитым внутренним торможением. При этом они характеризуются сниженной способностью к физическим нагрузкам, что, в свою очередь, может быть результатом гиперкалиемии и метаболического ацидоза. Для ВУ животных характерны: сниженная возбудимость и тревожность, умеренная агрессивность, более выраженное внутреннее торможение, малая чувствительность к любым провоцирующим воздействиям, склонность к социальному доминированию, устойчивость к нембуталовому наркозу, тормозная реакция на острую гипоксию, ишемию мозга, отравление CO (Лукьянова, 2019).

ВУ и НУ животные принципиально различаются и по биохимическим свойствам крови. НУ животные отличаются низкими значениями pO_2 крови и pH, но высокими значениями pCO_2, что

свидетельствует о признаках базового респираторного ацидоза. Для НУ животных характерны гиперлипидемия и повышенное содержание глюкозы в крови, а также низкое содержание молочной кислоты в миокарде и мозге по сравнению с ВУ животными. Гиперлипидемия и гипергликемия являются признаками, свидетельствующими не только об особенностях в обмене веществ, но и факторами, способствующими возникновению сахарного диабета, ожирения, атеросклероза и коронарного тромбоза (Лукьянова, 2019). Функционально-метаболические различия между ВУ и НУ животными особенно четко выявляются при предъявлении им стресс-нагрузок, которые сопровождаются увеличением тонуса адренергической системы (Лукьянова, 2019; Tkaczenko et al., 2024). В совокупности все особенности «функционально-метаболического портрета» НУ животных характеризуют их как группу «риска» (Лукьянова, 2019).

Различия в индивидуальной устойчивости к гипоксии могут обусловливать предрасположенность к развитию ряда заболеваний. В частности, существуют данные о том, что от устойчивости к гипоксии зависит тяжесть течения COVID-19 (Urakov et al., 2022). Особенности обмена НУ животных свидетельствуют о том, что они предрасположены к развитию различных патологий, в том числе сердечно-сосудистых заболеваний (Лукьянова, 2019).

По данным литературы устойчивость к гипоксии связана с активностью ферментов антиоксидантной защиты, которая выше у людей, проживающих в высокогорных районах, что обусловлено постоянным воздействием кислородной недостаточности и образованием АФК (Sinha et al., 2009). Показано, что в миокарде у ВУ крыс Спрейг-Доули после гипоксического воздействия уровень таких ферментов, как супероксиддисмутаза и каталаза, которые защищают клетки от окислительного стресса, выше по сравнению с НУ животными (Jain et al., 2013). Активность наиболее изученных белков теплового шока (HSP60, HSP70 и HSP90), стабилизирующих мембраны, в миокарде у ВУ крыс была значительно повышена, что свидетельствует об их способности переносить длительное воздействие дефицита O_2 и более эффективной адаптации (Jain et al., 2013). Полученные нами ранее данные (Dzhalilova et al., 2018) также свидетельствуют о том, что животные с разной устойчивостью к гипоксии имеют различные адаптационные возможности и предрасположенность к развитию воспалительных заболеваний: у НУ крыс Вистар после гипоксической нагрузки повышалось содержание маркера окислительного стресса 8-изопростана, что сопряжено с повреждением клеточных мембран и увеличением уровня TGF-β. По данным K. Jain и соавт. (2013) в миокарде у НУ крыс почти в 8 раз выше содержание малонового диальдегида, который образуется при воздействии АФК и является одним из маркеров окислительного стресса. По-видимому, ВУ и НУ организмы могут быть в разной степени предрасположены к развитию опухолевых заболеваний, что, вероятно, во

многом обусловлено различным уровнем окислительного стресса и активностью ферментов антиоксидантной защиты, которые играют ключевую роль в развитии опухолей.

Тем не менее, механизмы развития опухолевых заболеваний у организмов с разной устойчивостью к гипоксии не изучены. Важную роль, вероятно, играют уровни активации HIF-1α, NF-κB и VEGF. В условиях нормоксии у чувствительных к высокогорному отеку легких людей содержание в сыворотке крови HIF-1α выше, чем у устойчивых (Soree et al., 2016). Показано, что ВУ и НУ животные отличаются по содержанию HIF-1α в условиях нормоксии и в ответ на гипоксические и воспалительные стимулы (Jain et al., 2013; Kirova et al., 2013; Dzhalilova et al., 2019a). У НУ крыс в нормоксических условиях его содержание в неокортексе в 1,7 раза выше, чем у ВУ (Kirova et al., 2013). Нами показано, что при системном воспалительном ответе (СВО), индуцированном липополисахаридом (ЛПС), более высокая экспрессия гена *Hif1a* у НУ животных сопровождается повышением экспрессии *Nfkb* и более тяжелым течением заболевания (Dzhalilova et al., 2019a).

Учитывая роль HIF в регуляции множества генов, ответственных за различные процессы в организме, очевидно, что более высокая исходная экспрессия *Hif1a* у НУ организмов может влиять как на процессы онкогенеза, так и на устойчивость к терапии различных видов злокачественных опухолей. T.A. Gorr и соавт. (2010) отмечают, что степень исходной устойчивости организма к кислородной недостаточности может также определять и уровень внутриопухолевой гипоксии. Ранее в нашей лаборатории показано (Fridman et al., 2020), что прогрессия меланомы B16 у НУ мышей характеризовалась б*о*льшим объемом первичного узла, высокими темпами пролиферации, а также повышенной экспрессией *Vegf* в печени. Однако комплексных исследований клеточных и молекулярно-биологических механизмов инициации, прогрессии и метастазирования опухолей у животных с разной устойчивостью к гипоксии не проводилось.

Представляют интерес данные по исследованиям устойчивых к гипоксии голых землекопов, которые живут в экстремальных условиях недостатка кислорода и способны выдерживать в среднем 250 с полной аноксии (Park et al., 2017). Долгое время считалось, что опухоли у них не развиваются, хотя были зарегистрированы случаи нейроэндокринной карциномы желудка и подкожной аденокарциномы (Delaney et al., 2016). Возможно, высокая степень защиты от развития опухолей у голых землекопов зависит от особенностей метаболизма, активности HIF-1α и выраженной антиоксидантной защиты (Park et al., 2017; Xiao et al., 2017).

Следует отметить, что в ряде работ выявлены возрастные различия в способности адаптироваться к высокогорью. 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.

Показано, что новорожденные животные выживают при часовом воздействии тяжелой гипоксии – на высоте 13 000 м в барокамере (Домбровская, 1961; Колчинская, 1964; Singer, 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; Ndubuizu et al., 2009; Dzhalilova и Makarova, 2022; Nisar et al., 2025). У крыс в возрасте до 60 сут чувствительность к гипоксии подвержена значительным колебаниям, а затем достигает уровня, сопоставимого с устойчивостью взрослых животных (Корнеев и соавт., 1993). Несмотря на то, что молекулярно-биологические различия ВУ и НУ половозрелых животных достаточно хорошо изучены, 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. Высокая устойчивость организма к гипоксии рассматривается как один из факторов долголетия (Tregub et al., 2024a).

Таким образом, данные о взаимосвязи устойчивости к гипоксии и возраста противоречивы. Изучение возрастных различий устойчивости к гипоксии остается актуальным, так как они во многом определяют развитие адаптивных реакций и тяжесть течения воспалительных и других заболеваний, а также продолжительность жизни (Джалилова и Макарова, 2022; Nisar et al., 2025).

С точки зрения физиологических и биохимических характеристик различия ВУ и НУ организмов достаточно полно охарактеризованы. Однако все эти особенности установлены после определения устойчивости в барокамере, следовательно, они могут быть модифицированы сублетальной гипоксической нагрузкой на организм. Кроме того, данные об особенностях воспалительных и иммунных реакций у ВУ и НУ организмов фрагментарны, а о темпах инициации и прогрессии опухолей у этих животных отсутствуют.

1.1.3. Способы повышения устойчивости к гипоксии и гипокситерапия

В последние годы актуальной темой исследований является возможность использования гипоксических тренировок и гипокситерапии для профилактики и лечения некоторых заболеваний, а также реабилитации (Меерсон, 1993; Николаева, 2015; Глазачев и Крыжановская, 2019; Рыбникова и соавт., 2025; Verges et al., 2015; Timon et al., 2022; Brown et al., 2023; Li et al., 2024; Tregub et al., 2024б). «Гипоксическая тренировка» рекомендуется для коррекции состояний здорового человека, а «гипокситерапия» – для лечения и реабилитации пациентов (Николаева, 2015). В иностранной литературе используют термины «гипоксическое прекондиционирование», включающее кратковременное воздействие гипоксии, способствующее устойчивости тканей и органов или толерантности к последующему повреждению, и «гипоксическое посткондиционирование», которое относится к гипоксическому воздействию сразу после или

через некоторое время после повреждения для смягчения последствий и облегчения восстановления (Baillieul et al., 2017; Zhang et al., 2023б).

Гипокситерапия инициирует увеличение реактивности организма, повышение чувствительности органов-мишеней к действию внешних и внутренних раздражителей (Игнатенко и соавт., 2022; Verges et al., 2015; Brocherie и Millet, 2020; Liu et al., 2021б; Camacho-Cardenosa et al., 2022; Brown et al., 2023; Li et al. 2024). Одно из первых письменных упоминаний применения гипоксической терапии в лечебных целях принадлежит Гиппократу (V–IV вв. до н.э.), который рекомендовал больным людям переехать жить на умеренную высоту в горы. Воздействие умеренной гипоксии повышает общую неспецифическую резистентность организма, т.е. устойчивость организма не только к данному воздействию, но и ко многим другим неблагоприятным факторам, в частности, к физической нагрузке, изменению температуры окружающей среды и воздействию ионизирующего излучения (Меерсон и Пшенникова, 1988; Меерсон, 1993; Стрелков и Чижов, 2001).

Важность исследований особенностей адаптации человека к экстремальным влияниям внешней среды помимо спортивной медицины обусловлена необходимостью постоянной дислокации военнослужащих в районах Крайнего Севера, а также в пустынно-горных местностях. Высокий уровень физической тренированности не всегда свидетельствует о высокой гипоксической и холодовой устойчивости (Максимов, 2005). В 1980-х гг. отечественными учеными был разработан лечебно-профилактический комплекс режимов как барокамерных воздействий, так и нормобарических с использованием дыхательной газовой смеси с пониженным содержанием O_2 (Агаджанян и соавт., 1984; Avellanas Chavala, 2018; Serebrovska et al., 2022). Н.Н. Сиротинин (1981) предложил использовать при подготовке спортсменов в условиях барокамеры ступенчатый подъем при смене «высот», что оказалось более эффективным по сравнению с непрерывным подъемом (Сиротинин, 1981).

В целом концепция гипоксического кондиционирования (ГК) впервые возникла в авиационной и космической медицине с целью ускорения высотной акклиматизации (Serebrovskaya, 2002). В последние годы исследования влияния условий гор в зависимости от высоты во многом посвящены вопросам гормезиса – низкая доза стрессора (в данном случае гипоксии) способствует адаптации, в то время как более высокая доза может оказывать повреждающее действие (Burtscher и Samaja, 2024). При этом очевидно, что эффективная и безопасная концентрация O_2 будет варьировать в зависимости от индивидуальной устойчивости к гипоксии, что должно учитываться при проведении таких исследований.

ГК, или адаптация к интервальной гипоксии в последние десятилетия становится все более применимым и обоснованным подходом немедикаментозной профилактики и реабилитации пациентов с различными заболеваниями (Рыбникова и соавт., 2025; Verges et al. 2015;

Serebrovskaya и Xi, 2016; Susta et al., 2017). Широкое распространение получила методика интервальной гипоксической тренировки (ИГТ) (Verges et al., 2015; Li et al., 2022; Serebrovska et al., 2022; Tregub et al., 2024б). Разработано множество гипоксических тренировочных режимов с периодической гипоксией, обладающих доказанной эффективностью при лечении сердечно-сосудистых, дыхательных нарушений, сахарного диабета, заболеваний щитовидной железы и многих других распространенных заболеваний (Burtscher et al., 2010; Glazachev et al., 2021; Page et al., 2021; Allsopp et al., 2022; Alekseeva et al., 2024; Tregub et al., 2024б). Для повышения устойчивости к недостатку кислорода применяется также и ИГТ с использованием нормобарической гипоксии – чередование дыхания газовой смесью, обедненной O_2 на 10-12%, и обычным воздухом (Караш и соавт., 1988; Глазачев, 1997). Однако такая тренировка менее эффективна по сравнению с барокамерной. При сравнении изменений у спортсменов в условиях гипобарической и нормобарической гипоксии с соответствующим парциальным давлением вдыхаемого кислорода, показано, что субъекты, подвергшиеся воздействию гипобарической гипоксии демонстрируют более выраженное улучшение результатов и гематологические изменения (Saugy et al., 2014).

Воздействие прерывистой гипоксии имеет как полезные, так и неблагоприятные эффекты (Navarrete-Opazo и Mitchell, 2014). По данным исследования влияния барокамерных тренировок («высоты» – 2000, 4000 и 6500 м) на иммунную систему установлено, что только «высота» 2000 м не сказывается на иммунологическом ответе организма, а большие «высоты» снижают продукцию антител и содержание гликогена в нейтрофилах (Капланский, 1971). Показано, что «высоты» 5000 м и более в условиях барокамеры у 1,5 % практически здоровых людей вызывают различного рода расстройства ритма сердца. По данным Ю.М. Караша и соавт. (1988) приблизительно 1-2% людей являются крайне чувствительными к недостатку кислорода (Караш и соавт., 1988).

Таким образом, несмотря на положительные результаты использования различных режимов воздействия гипоксии, они безопасны и эффективны не для всех. Случаи неэффективности адаптационной защиты были выявлены и в экспериментах на животных (Пшенникова, 2001). Показано, что крысы Вистар менее устойчивы к стрессорным воздействиям по сравнению с крысами линии Август, которые являются высокоустойчивыми (Пшенникова, 2012). При этом крысы линии Август в меньшей степени способны адаптироваться к повторным стрессорным воздействиям. Тем не менее, точные механизмы эффективности адаптации у организмов с разной устойчивостью к гипоксии остаются недостаточно изученными.

Использование нормобарической и гипобарической интервальной гипоксии требует проведения тестов на переносимость, а также участия в исследовании медицинского и инженерно-технического персонала. Оценка переносимости гипобарического воздействия

дается на основании анализа жалоб, внешнего вида и поведения пациента, данных о ЧСС и АД. Индивидуальная непереносимость кислородной недостаточности может быть выявлена во время гипоксической пробы, обязательно проводимой перед курсом гипобарической адаптации. Лица, у которых выявлена плохая переносимость гипобарического воздействия, от последующих подъемов отстраняются. Ранее было установлено, что для определения уровня гипоксической устойчивости человека наиболее целесообразно применять пробу Штанге (задержка дыхания после глубокого вдоха), которая является простым и достаточно информативным показателем состояния компенсаторных возможностей организма. Разность показателей до и после курса служит одним из критериев эффективности гипоксической тренировки (Николаева, 2015). На основе пробы Штанге разработаны критерии устойчивости людей к гипоксии: низкая (до 30 с), умеренная (31-60 с), высокая (61-90 с), и очень высокая (более 90 с) (Заболотский, 1993). Тем не менее, проба Штанге практически не используется в исследованиях из-за субъективности, малой информативности и сложности интерпретации (Воронин и Огородников, 2022).

Воздействие гипоксии в настоящее время предлагается в качестве подхода к терапии многих заболеваний, но не опухолевых (Zhang et al., 2023б). Для терапии опухолей, напротив, предлагается гипероксия, однако данные об ее эффективности противоречивы (Kim et al., 2020). При этом по данным работ отечественных авторов, перемещение больных и здоровых людей из нормоксических в умеренно гипоксические условия высокогорья повышает их адаптационные механизмы, что, в свою очередь, приводит к существенному увеличению неспецифической резистентности; снижается частота заболеваний, в том числе и опухолевых, уменьшается скорость роста первичных опухолей и метастазов, увеличивается продолжительность жизни (Гаркави, 1990; Абазова, 2007). Тем не менее, оптимальная доза, продолжительность и частота гипоксического воздействия остаются неизвестными (Yu et al., 2022).

Необходимы крупномасштабные рандомизированные контролируемые испытания для подтверждения эффективности и безопасности ГК при различных заболеваниях и у разных групп населения. Хотя ИГТ является многообещающим методом лечения с многочисленными потенциальными преимуществами, его внедрение должно быть персонализированным.

Таким образом, гипокситерапия и гипоксические тренировки представляют собой один из способов повышения общей неспецифической резистентности организма к различным факторам. Тем не менее, она имеет побочные эффекты, поэтому для ее применения необходимы точные биомаркеры индивидуальной устойчивости к гипоксии и неинвазивные способы ее определения. Кроме того, остается открытым вопрос об использовании гипокситерапии для профилактики и лечения опухолевых заболеваний.

1.1.4. Разработка способов определения устойчивости к гипоксии без воздействия недостатка кислорода

В настоящее время отсутствуют стандартизованные способы оценки устойчивости экспериментальных животных и людей к недостатку кислорода без гипоксического воздействия. В связи с тем, что чувствительность к дефициту O_2 определяет физиологические реакции и адаптивные процессы, и, очевидно, особенности течения ряда заболеваний, поиск биомаркеров для скрининга организма по устойчивости к гипоксии без помещения в барокамеру или в условия гор, является актуальной задачей. Определение молекул, обеспечивающих устойчивость или чувствительность к стрессовым факторам, таким как гипоксия, будет играть важную роль в оценке адаптационных возможностей, вероятности развития осложнений при хирургических вмешательствах и выживаемости людей в неблагоприятных условиях, включая космические полеты. Кроме того, для терапии злокачественных опухолей в настоящее время разрабатываются новые препараты – ингибиторы HIF, эффективность которых может быть неодинаковой у организмов с разной устойчивостью к гипоксии. Поэтому поиск молекулярно-биологических маркеров, позволяющих выявить людей с различной устойчивостью к дефициту кислорода в условиях нормоксии, несомненно, является целесообразным.

Охарактеризованы способы оценки устойчивости к недостатку кислорода по многим параметрам при использовании гипоксической нагрузки (Венерин и соавт., 2025). С целью определения биомаркеров устойчивости к острой горной болезни и другим обусловленным высокогорьем заболеваниям проводили исследования физиологических параметров и показателей крови у людей до восхождения на высоту, затем отслеживали у них клинические проявления заболеваний. Немногочисленные данные свидетельствуют о том, что одним из косвенных маркеров низкой устойчивости к гипоксии, и, соответственно, развития острой горной болезни, может быть повышенная тревожность на уровне моря (Boos et al., 2018). По данным P. Soree и соавт. (2016) у людей, чувствительных к высокогорному отеку легких, в условиях нормоксии содержание в сыворотке крови белка HIF-1α выше, чем у устойчивых, что может быть потенциальным маркером низкой устойчивости к гипоксии. Однако в данном исследовании количество участников было небольшим – 22 человека, кроме того, не учитывался пол. Генетические и протеомные исследования показали, что ряд регуляторных молекул может участвовать в развитии острой горной болезни. Уровни этих молекул в крови, в частности, IGFBP6 (Insulin-like Growth Factor Binding Protein 6), Dkk4 (Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 4), сывороточного амилоида A1 (SAA1) и IL-17RA (InterLeukin-17 Receptor A), в условиях нормоксии различаются у людей, устойчивых и чувствительных к острой горной болезни. У устойчивых к острой горной болезни людей в крови были выше уровни IGFBP6, но

ниже – Dkk4, SAA1 и IL-17RA. Эти показатели предложено использовать для прогнозирования развития острой горной болезни до восхождения на высоту (Lu et al., 2016).

Проведено сравнительное исследование изменений протеома плазмы крови у устойчивых и чувствительных к острой горной болезни людей (Lu et al., 2018). После острого воздействия гипобарической гипоксии (9 ч на высоте 3800 м) содержание белков, связанных с циклом трикарбоновых кислот и гликолизом, было значительно снижено только у устойчивых к острой горной болезни людей. Показано, что у устойчивых организмов после острого гипоксического воздействия потребление O_2 снижалось в большей степени, чем у чувствительных. Предполагается, что устойчивые к острой горной болезни организмы способны снижать потребление O_2 за счет подавления цикла трикарбоновых кислот и гликолиза, а также потребление энергии – за счет уменьшения деградации и синтеза белков. Подавление цикла трикарбоновых кислот, вероятно, обусловливает менее выраженные воспалительные реакции у устойчивых к острой горной болезни людей. Предполагается, что возможность регуляции потребления O_2 играет важную роль в развитии острой горной болезни, однако для подтверждения необходимы дальнейшие исследования. Протеомный метод, который предполагает анализ образцов плазмы крови устойчивых и чувствительных людей, может быть перспективным для поиска маркеров развития острой горной болезни (Lu et al., 2018).

Кроме того, показано, что до воздействия гипоксии только уровень HSP70, который может защищать клетки и органы от различных типов повреждений, в том числе гипоксических, был выше в крови у устойчивых к острой горной болезни людей по сравнению с чувствительными (Zhou et al., 2004). В пользу важной роли HSP в устойчивости к гипоксии свидетельствует тот факт, что некоторые нуклеотидные полиморфизмы HSP определяют высокую и низкую предрасположенность к высокогорным заболеваниям. Люди с генотипами HSP70-2 B/B и HSP70-hom A/B и B/B более восприимчивы к высокогорным заболеваниям, тогда как люди с генотипом HSP70-hom A/B, напротив, более устойчивы (Zhou et al., 2005). Предложено использовать в качестве биомаркеров устойчивости к гипоксии HSP90α, лактотрансферрин и альфа-1-антитрипсин (Guo et al., 2023). Тем не менее, все эти способы определения устойчивости к высокогорным заболеваниям предполагают гипоксическую нагрузку на организм разной степени тяжести и не подходят, например, для пациентов перед операциями.

Таким образом, существуют межвидовые и индивидуальные различия в устойчивости к гипоксии. ВУ и НУ организмы различаются по биохимическим показателям, уровню окислительного стресса, активности ферментов антиоксидантной защиты, функциональному состоянию митохондрий и другим параметрам, в том числе по содержанию HIF-1α. Механизмы, которые определяют чувствительность к гипоксии и высокогорным заболеваниям, недостаточно изучены. Несмотря на большое количество работ по поиску биомаркеров чувствительности к

гипоксии и острой горной болезни, необходимо проведение дальнейших исследований для определения индивидуальной устойчивости организма при физиологической концентрации кислорода.

1.2. Эпидемиология злокачественных опухолей и механизмы их развития

Злокачественные опухоли являются серьезной проблемой общественного здравоохранения и экономики в XXI веке, они являются причиной неблагоприятного исхода в 16,8% общего числа случаев заболеваний во всем мире (Bray et al., 2024). В 2022 г. было зарегистрировано около 20,0 млн новых случаев заболевания и 9,7 млн случаев смерти от злокачественных опухолей (Bray et al., 2024). Помимо того, что злокачественные опухоли являются важным препятствием на пути увеличения продолжительности жизни, они связаны со значительными социальными и экономическими издержками (Chen et al., 2023a).

Наиболее часто диагностируемыми видами злокачественных опухолей в мире являются рак легких (12,4% от общего числа случаев), рак молочной железы (11,6%) и колоректальный рак (КРР) (9,6%). Рак легких также является ведущей причиной смертности (18,7% от общего числа случаев), затем следуют КРР (9,3%) и рак печени (7,8%) (Bray et al., 2024). Согласно эпидемиологическим исследованиям, заболеваемость злокачественными опухолями в будущем будет увеличиваться и к концу XXI века станет основной причиной смерти во всех странах (Key et al., 2020). У большинства людей с диагнозом «злокачественная опухоль» нет семейного анамнеза этого заболевания, и только 5-10% всех случаев обусловлены наследственностью, следовательно, развитие опухолей можно предотвратить (Bahrami и Tafrihi, 2023).

Установлено, что риск развития злокачественных опухолей увеличивается с возрастом, а заболеваемость у детей и подростков остается достаточно низкой (Laconi et al., 2020). Злокачественные опухоли, характеризующиеся неконтролируемым аномальным делением клеток, образуются из-за воздействия множества различных факторов (Sobti et al., 2024). Мутации в генах, загрязнение окружающей среды и воздействие канцерогенов (например, радиации), хроническое воспаление, инфекции, образ жизни (неправильное питание, низкая физическая активность) и др. увеличивают риск развития злокачественных опухолей. По последним оценкам, примерно 25% случаев злокачественных новообразований во всем мире связаны с хроническим воспалением, в том числе на фоне инфекций и инвазий, к возбудителям которых относят вирусы, бактерии, грибы и паразиты, однако точные механизмы этой взаимосвязи остаются недостаточно изученными (Murata, 2018; Sobti et al., 2024; Turizo-Smith et al., 2024). Кроме того, заболеваемость злокачественными опухолями зависит от географического положения (Soerjomataram и Bray, 2021). Понимание роли этих факторов в развитии опухолей имеет решающее значение для разработки средств эффективной профилактики и определения стратегии терапии.

Хирургия и химиотерапия, а также лучевая терапия являются наиболее часто используемыми методами для лечения миллионов пациентов со злокачественными опухолями (Song et al., 2017). Однако в зависимости от состояния здоровья пациента могут возникать

различные осложнения. Кроме того, данные методы в большинстве случаев неприменимы при поздних стадиях развития злокачественных опухолей. Разрабатывается множество различных подходов к терапии злокачественных опухолей, включая генную терапию, иммунотерапию, использование наночастиц и др. (Hompland et al., 2021; Yahya и Alqadhi, 2021), но многие факторы, в том числе степень внутриопухолевой гипоксии и индивидуальная устойчивость организма к недостатку кислорода не учитываются, что влияет на эффективность терапии.

1.2.1. Ключевые характеристики опухолевых клеток

На протяжении всей истории существования онкологии ученые пытались установить, какие особенности отличают опухолевые клетки от неопухолевых. В 2000 г. Дуглас Ханахан (Douglas Hanahan) и Роберт Вайнберг (Robert Weinberg) (Hanahan и Weinberg, 2000) обобщили ключевые характеристики злокачественных опухолей («Hallmarks of Cancer») как совокупность функциональных способностей, приобретаемых клетками по мере их перехода от нормального состояния к состоянию неопластического роста, которые имеют решающее значение для возможности образовывать злокачественные опухоли. Согласно их работе, общими чертами, которые объединяют все типы опухолевых клеток на уровне фенотипа, являются: самодостаточность в отношении сигналов пролиферации; потеря чувствительности к сигналам, сдерживающим процесс пролиферации; замедление процессов программируемой клеточной гибели; неограниченный репликативный потенциал клеток (преодоление «лимита Хейфлика»); активация ангиогенеза; инвазия и метастазирование.

В 2011 г. Д. Ханахан и Р. Вайнберг (Hanahan и Weinberg, 2011) опубликовали дополнение к списку основных характеристик опухолевого фенотипа: нарушение клеточного метаболизма; «ускользание» от иммунного надзора; геномная нестабильность и мутации; воспаление, способствующее развитию опухолей. Как отмечали авторы, ключевые признаки злокачественных опухолей сами по себе не объясняют сложности их патогенеза – те молекулярные и клеточные механизмы, которые позволяют трансформирующимся клеткам приобретать аберрантные фенотипические свойства в ходе развития опухоли и злокачественной прогрессии. Соответственно, помимо ключевых признаков злокачественных опухолей, авторы выделили факторы их возникновения – молекулярные и клеточные механизмы, позволяющие опухолевым клеткам приобрести особые функциональные характеристики. К двум главным факторам возникновения злокачественных опухолей отнесены нестабильность генома и воспаление.

В работе Д. Ханахана 2022 г. (Hanahan, 2022) сохранены 8 отличительных признаков опухолей, кроме того, к ним добавлены фенотипическая пластичность и нарушения дифференцировки. При этом к факторам возникновения злокачественных опухолей отнесены эпигенетическое репрограммирование и полиморфные вариации микробиомов органов и тканей.

Кроме того, в процессах канцерогенеза существенная роль отводится микроокружению опухоли (Tumor Microenvironment, TME), состоящему из гетерогенных и взаимодействующих друг с другом опухолевых и неопухолевых клеток. Согласно работе 2022 г., к списку функционально важных типов клеток в микроокружении опухоли могут быть добавлены сенесцентные клетки различного происхождения (рис. 1.2).

Рис. 1.2. Ключевые характеристики опухолевых клеток и факторы, способствующие развитию злокачественных опухолей по состоянию на 2022 г. (по D. Hanahan, 2022, в модификации)

Во всех трех перечисленных работах авторы обсуждают гипоксию, определяющую как характеристики опухолевых клеток, так и являющуюся фактором возникновения злокачественных опухолей, поскольку она взаимосвязана с воспалением, регулирует ангиогенез, нарушения метаболизма и др. Подробно роль гипоксии в развитии опухолей будет обсуждаться ниже.

1.2.2. Механизмы развития злокачественных опухолей

В процессе развития злокачественных опухолей условно выделяют этапы инициации, промоции и прогрессии (Lyzhko, 2017; Murata, 2018; Greten и Grivennikov, 2019; Hibino et al., 2021; Kurkowiak et al., 2021; Nagao-Kitamoto et al., 2022), однако в некоторых работах этапы инициации и промоции объединяют, а термин «прогрессия» относят к этапу, когда опухоль трансформируется в злокачественную, при этом выделяют этапы инвазии опухолевых клеток и метастазирования (Behranvand et al., 2022; de Visser и Joyce, 2023).

На **этапе инициации опухолевого роста** клетка приобретает ряд генетических мутаций и/или эпигенетических изменений в функционировании генов и сигнальных путей опухолевых супрессоров и протоонкогенов, и по мере увеличения их числа повышается вероятность образования опухоли. Для дальнейшего развития опухоли необходима пролиферация клонов трансформированных клеток (Greten и Grivennikov, 2019).

Протоонкогены – гены, участвующие в регуляции ключевых процессов жизнедеятельности клетки. В случае структурных изменений или повышения уровня экспрессии этих генов нарушается контроль нормального клеточного роста и дифференцировки, что приводит к трансформации клетки (Lyzhko, 2017; Sobti et al., 2024; Zhang et al., 2024a). К ключевым протоонкогенам относят семейства *RAS, MYC* и *MET,* мутации в которых обнаруживаются в широком спектре опухолей человека и приводят к неконтролируемой пролиферации клеток и ингибированию апоптоза (Zinatizadeh et al., 2019; Dhanasekaran et al., 2022; Rivas et al., 2022).

Гены-супрессоры (антионкогены) – гены, кодирующие ключевые регуляторные белки, потеря которых влечет за собой нарушение контроля пролиферации (Lyzhko, 2017; Sobti et al., 2024; Zhang et al., 2024a). Ген ретинобластомы (*RB*) – первый из идентифицированных генов-супрессоров, его инактивация ассоциирована с неконтролируемым ростом опухолевых клеток (Wu и Wu, 2021). Другой ключевой опухолевый супрессор – ген *TRP53 (Transformation-Related Protein 53)*, участвует в ряде важнейших процессов в жизнедеятельности клеток, таких как репарация ДНК, поддержание структуры теломер и центромер (Toufektchan и Toledo, 2018). Он кодирует фактор транскрипции p53, который обеспечивает функционирование белков, контролирующих клеточное деление (Zhu et al., 2015). Индукция p53 вызывает задержку клеточного цикла с последующей репарацией повреждений или естественную гибель клеток, препятствуя нарушению целостности генома и приобретению опухолевого фенотипа. Экспрессия мутантного гена и синтез белка p53 способствует быстрой пролиферации, метастазированию и устойчивости к терапии (Sobti et al., 2024).

Еще один ген-супрессор опухолей *PTEN (Phosphatase and TENsin homolog deleted on chromosome 10)* кодирует липидную фосфатазу, которая отрицательно регулирует PI3K/AKT/mTOR, контролирующий пролиферацию клеток, клеточный цикл и апоптоз (Zhang et al., 2020; Trinh et al., 2024). Белок PTEN также регулирует миграцию клеток, адгезию и ангиогенез, нарушения его функционирования часто встречаются при различных видах злокачественных опухолей и зависят от окислительного стресса (Zhang et al., 2020; Trinh et al., 2024).

На **этапе промоции** клетки приобретают способность к автономному росту и пролиферации, начинается процесс непрерывной аутокринной и паракринной стимуляции трансформированных клеток ростовыми факторами, клетки начинают активно пролиферировать,

подавляется апоптоз (Ungefroren, 2021; Chaudhry et al., 2022; Zhang et al., 2024a). Генетическая нестабильность вместе с постоянно идущим отбором обеспечивают накопление в одной клетке сразу нескольких мутаций, происходит активация фермента теломеразы и иммортализация клеток (Compton, 2020). Кроме того, изменяется биохимический профиль трансформированных клеток, активируется синтез нуклеиновых кислот, процесс аэробного гликолиза, т.е. распад углеводов до пирувата и превращение его в молочную кислоту в присутствии O_2 (эффект Варбурга) (Менчиков и соавт., 2023; Kobliakov, 2019; Moldogazieva et al., 2020).

На **этапе опухолевой прогрессии** злокачественные клетки приобретают новый фенотип. Опухоль из моноклонального образования превращается в поликлональное, то есть в ней одновременно существует множество клонов с различными наборами мутаций. Происходит постоянный отбор тех клонов опухолевых клеток, которые наиболее приспособлены к выживанию в окружающей среде. Увеличивающееся число опухолевых клеток требует все большего количества питательных веществ, происходит стимуляция ангиогенеза – формирования сети новых кровеносных сосудов (рис. 1.3) – необходимое условие для дальнейшего роста опухоли, которая достигла размера 1-2 мм^3 (Folkman, 1971; Zeng и Fu, 2024). Приобретение неопластическими клетками способности стимулировать ангиогенез связано с прекращением секреции ими факторов, ингибирующих ангиогенез (тромбоспондины и др.), и увеличением продукции проангиогенных факторов (VEGF, TGF-β, фактора роста тромбоцитов PDGF, эпидермального фактора роста EGF, фактора роста фибробластов FGF и др.), сопровождающимся повышением секреции и/или активности протеаз (матриксных металлопротеиназ MMP2, MMP9 и др.), обеспечивающих протеолиз внеклеточного матрикса (ВКМ) (Liu et al., 2023).

В результате опухолевой трансформации клетки приобретают способность к прогрессии – инвазии и метастазированию (рис. 1.3), т.е. образованию вторичных очагов опухолевого роста за счет изменения морфологии и движения опухолевых клеток (Копнин, 2004; Kurkowiak et al., 2021). В основе морфологических преобразований лежат взаимосвязанные между собой изменения цитоскелета, адгезионных взаимодействий клеток друг с другом и с ВКМ. Они выражаются в нарушении формирования контактов и ухудшении прикрепления клеток к ВКМ, дезорганизации системы актиновых микрофиламентов, что приводит к изменениям подвижности клеток (Alexandrova et al., 2020). На первом этапе происходит эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), при котором опухолевые клетки приобретают свойства фибробластов, что способствует повышению их подвижности, позволяет им проникать через базальную мембрану и достигать эфферентных кровеносных или лимфатических сосудов (Dongre и Weinberg, 2019).

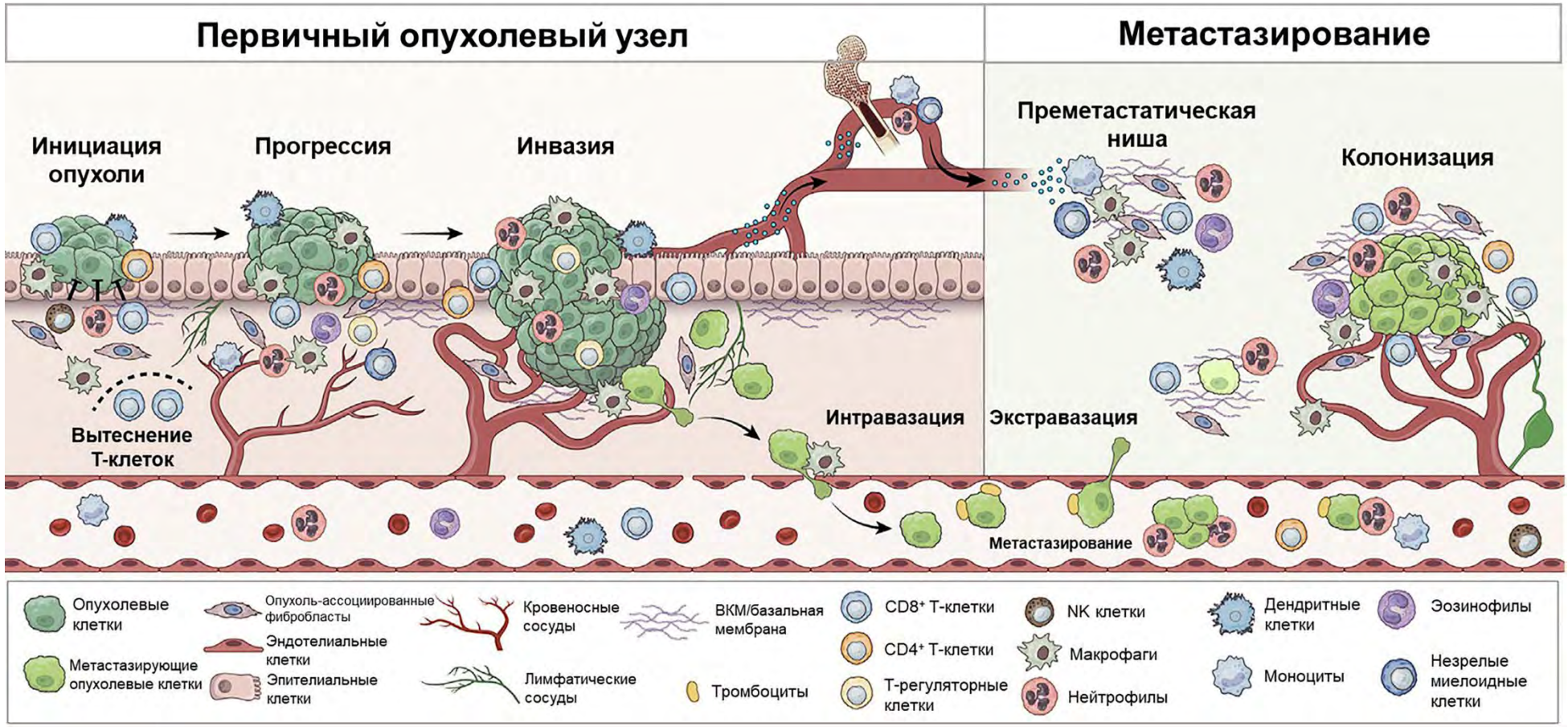


Рис. 1.3. Основные этапы и участники опухолевого процесса (по K.E. de Visser и J.A. Joyce, 2023, в модификации)

Снижение синтеза Е-кадгерина предполагается как одно из ключевых событий в ЭМП. На следующем этапе опухолевые клетки проникают в кровеносные и лимфатические сосуды – происходит интравазация. Опухолевые клетки, попав в сосуды, выживают и перемещаются по ним, затем останавливаются и выходят из сосудов в ткани – происходит экстравазация. Для пролиферации опухолевых клеток в отдаленных органах должна сформироваться соответствующая местная микросреда в органе-мишени — преметастатическая ниша (Wang et al., 2024б). Проникновение опухолевых клеток обеспечивается обширным протеолизом ВКМ в области инвазии (Dongre и Weinberg, 2019). Установлено, что только около 0,01% опухолевых клеток, которые попадают в циркуляцию, выживают и дают начало развитию микрометастазов (Grivennikov et al., 2010). На следующем этапе единичные метастазирующие опухолевые клетки взаимодействуют с неопухолевыми – стромальными и иммунными клетками, и начинают пролиферировать, способствуя образованию макрометастазов – колонизации (Dongre и Weinberg, 2019; Schito и Rey-Keim, 2023). Показано, что в процессе колонизации опухолевые клетки могут восстанавливать синтез Е-кадгерина – этот процесс называется MET (Mesenchymal Epithelial Transition), тем не менее, в некоторых случаях опухолевые клетки могут метастазировать и независимо от MET (Jolly et al., 2017; Akhmetkaliyev et al., 2023). В настоящее время процесс метастазирования остается недостаточно изученным.

Таким образом, развитие опухолей происходит в несколько ключевых этапов – инициации, промоции и прогрессии, и сопровождается формированием микроокружения, в котором происходит воспалительный и иммунный ответ, определяющие прогрессию заболевания.

1.2.3. Способы моделирования опухолевого процесса у животных

За последние годы были достигнуты большие успехи в разработке экспериментальных моделей злокачественных опухолей, подходящих для проведения биомедицинских исследований (Barré-Sinoussi и Montagutelli, 2015; Costa et al., 2020). Наиболее простыми являются модели *in vitro*, которые позволяют контролировать рост клеток, поддерживать культуру и тестировать лекарственные препараты на отдельных изолированных клеточных линиях или синергии нескольких линий (Sajjad et al., 2021). Более сложными являются *in vivo* модели, которые предполагают эксперименты с использованием лабораторных животных, и характеризуются сходством процессов с организмом человека, поскольку формируется микроокружение опухолей, а также происходят иммунные реакции (Robinson et al., 2019). Лабораторные грызуны имеют наиболее высокую степень сходства с человеком, особенно мыши и крысы, а короткий цикл размножения значительно повышает эффективность экспериментов. Эксперименты с использованием лабораторных животных относительно дешевы, кроме того, позволяют изучать механизмы возникновения и развития опухолей, а также влияние генов на онкогенез и воздействовать на развитие опухолей путем нокдауна или нокаута определенного гена, кроме

того, создавать модели для скрининга лекарств и доклинических испытаний. Таким образом, использование животных моделей чрезвычайно ценно для исследования опухолей (Robinson et al., 2019; Zhou et al., 2023).

В настоящее время, исходя из причин образования опухолей, модели опухолевого процесса на лабораторных животных разделяют на четыре категории: спонтанные, индуцированные, трансгенные и трансплантированные (аллогенная и ксеногенная трансплантация). Для каждого типа опухоли наиболее подходящей может быть та или иная модель и вид животного (мышь, крыса), что обусловлено спецификой опухолевого процесса для каждого типа злокачественных опухолей (Barré-Sinoussi и Montagutelli, 2015; Costa et al., 2020).

Спонтанные опухоли возникают без какого-либо воздействия, частота значительно варьирует в зависимости от вида и линии экспериментальных животных. Преимущество этих моделей состоит в том, что процесс образования опухоли аналогичен таковому у человека, за счет длительного периода возникновения и развития опухоли можно исследовать множество способов терапии, кроме того, установить роль генетических факторов в развитии опухолей. Однако недостатком данных моделей является использование большого количества экспериментальных животных и длительность эксперимента. Спонтанные опухоли у животных часто неоднородны и имеют индивидуальные различия в темпах роста, что затрудняет получение одновременно большого количества животных с опухолями с равномерным ростом (Zhou et al., 2023). Спонтанные модели редко используются из-за их низкой воспроизводимости (Nascimento-Gonçalves et al., 2021).

Трансгенные модели используют для изучения влияния генных мутаций на онкогенез и развитие опухолей из-за высокого сходства генов, кодирующих белки мышей и человека. Модели опухолей трансгенных животных имеют большие преимущества при изучении механизмов онкогенеза и ускользания опухоли от иммунного ответа, однако процесс создания моделей трансгенных животных длительный и дорогостоящий, получить большое количество экспериментальных животных сложно. Хотя генно-инженерные модели представляют собой ценный инструмент для фундаментальных исследований, их использование для доклинических исследований ограничено (Bürtin et al., 2020).

Трансплантатные модели получают посредством пересадки опухоли от одного живого организма другому. Трансплантатные модели классифицируют по 3 основным параметрам:

1) По типу трансплантата. Используют либо суспензии опухолевых клеток, либо фрагменты ткани опухоли (тканевые штаммы). Например, карцинома легких Льюис (Lewis Lung Carcinoma, LLC) в настоящее время широко используется в качестве экспериментальной модели рака легких. LLC – опухоль, возникшая спонтанно у мыши линии C57BL/6 в лаборатории Маргарет Льюис в 1951 г. и переведенная в иммортализованную клеточную линию. Начиная с этого времени она

сохранялась путем подкожной и внутримышечной трансплантации мышам, являясь единственной воспроизводимой сингенной моделью рака легких (Garcia-Sanz et al., 1989). Полученная модель рака легких широко используется в исследовании процессов ангиогенеза в опухоли, метастазирования, для тестирования противоопухолевых препаратов, а также в качестве доклинической модели, при ортотопической трансплантации – в исследованиях опухолевого микроокружения (Janker et al., 2018; Skurikhin et al., 2022).

Клеточные линии опухолей фенотипически и генетически достаточно однородны и не воспроизводят гетерогенность реальных опухолей, кроме того, опухолевые клетки вследствие отбора в условиях *in vitro* обычно имеют тенденцию к слабо выраженной дифференцировке и развивающиеся опухоли более агрессивны по сравнению с опухолями человека. Фрагменты ткани опухоли позволяют сохранить исходное микроокружение, генетическую и молекулярную гетерогенность опухолевых клеток, и являются более адекватной моделью, но их приживляемость ниже. Тканевые штаммы невозможно культивировать *in vitro*, для пролиферации их необходимо привить животному. Штаммы ткани опухоли лучше воспроизводят гетерогенность, в частности, глиомы человека, чем любая клеточная линия или комбинация нескольких. Существуют различные экспериментальные модели диффузных глиом высокой степени злокачественности – глиобластомы крыс 101.8, 11-9-2 и 14-4-5, которые изначально были индуцированы химическими канцерогенами (Яблоновская и Спрышкова, 1967). Глиобластома 101.8 крыс является особенно агрессивным штаммом, который используется для оценки эффективности химиотерапии и является релевантной моделью глиомы человека высокой степени злокачественности (Alekseeva et al., 2023; Sentyabreva et al., 2024). Остальные *in vivo* модели глиальных опухолей мозга менее воспроизводимы и адекватны – они включают в себя трансгенные модели и ксенотрансплантаты (Antonica et al., 2022).

2) По источнику трансплантата. Сингенная трансплантация опухоли характеризуется приживлением ткани опухоли или линии опухолевых клеток в пределах одной и той же линии животных; ксеногенные трансплантаты получены от других линий животных или доноров-людей. Среди этих моделей сингенные трансплантации являются более адекватными, так как они, в отличие от ксеногенных, где используют животных с ослабленным иммунитетом, позволяют изучать взаимодействие между опухолью и иммунным микроокружением и дают возможность оценивать эффективность иммунотерапии (Antonica et al., 2022).

3) По месту введения трансплантата. Опухоль может быть трансплантирована подкожно, в селезенку, в капсулу почки, в кровоток (гетеротопические модели) или непосредственно в толстую или прямую кишку, например, при моделировании КРР (ортотопические модели). Подкожное введение (гетеротопическая модель) является одним из наиболее часто используемых методов из-за простоты воспроизведения, легкого доступа и быстрого роста опухоли (Bürtin et

al., 2020). Трансплантатные модели позволяют воспроизвести инвазию и прогрессию опухоли, а также метастазирование в другие органы. Однако они не подходят для изучения инициации опухолевого роста и ранних стадий канцерогенеза, а также исследования роли иммунной системы и воспаления, например, в патогенезе КРР.

Модели индуцированных опухолей основаны на использовании экзогенных канцерогенов, вызывающих изменения генетических характеристик клеток, что приводит к их аномальной пролиферации и образованию опухолей. Методы индукции включают физические, химические и биологические методы, из которых химические являются наиболее эффективными за счет простоты применения и высокой воспроизводимости (Malyla et al., 2020). Недостатком индуцированных моделей является вариабельность локализации, времени развития и количества опухолей среди особей, что может быть связано с устойчивостью животных к гипоксии.

Одной из наиболее распространенных индуцируемых моделей опухолей является модель КРР. Наиболее часто используемые химические вещества для индукции КРР – это 1,2-диметилгидразин (DMH) и его метаболит азоксиметан (AOM). Проканцерогены DMH и AOM после серии метаболических реакций образуют канцероген метилазоксиметанол (MAM) и АФК, которые алкилируют ДНК и инициируют развитие опухолей в толстой кишке за счет индукции широкого спектра мутаций в ключевых генах, кодирующих компоненты множества каскадов внутриклеточной передачи сигналов (Venkatachalam et al., 2020). MAM под действием ферментов толстой кишки и печени расщепляется с образованием формальдегида и сильного алкилирующего агента – иона метилдиазония. Алкилирование ДНК способствует ошибочному спариванию оснований и мутагенезу (Venkatachalam et al., 2020). AOM после метаболической активации в организме приводит к O_6- или N_7-метилированию гуанина в ДНК (De Robertis et al., 2011).

AOM вводят, как правило, один раз в неделю внутрибрюшинно в дозе 10-15 мг/кг массы тела животного в течение 2-10 недель, развитие опухолей оценивают через 16-36 недель (Velázquez et al., 2016; Uyar et al., 2022). Недостатками этой модели являются длительный срок индукции опухолей, не очень высокая воспроизводимость, а также необходимость многократного введения опасного для экспериментатора канцерогена.

Развитие КРР у людей часто ассоциировано с воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК). Поэтому в 2003 г. T. Tanaka и соавт. предложили новую экспериментальную модель КРР, ассоциированного с хроническим воспалением (Tanaka et al., 2003). Самцам мышей ICR однократно внутрибрюшинно вводили AOM (10 мг/кг массы тела), а через неделю после инъекции на 7 сут заменяли воду в поилках на 2%-ый раствор декстрансульфата натрия (ДСН). ДСН – провоспалительный агент, используемый для моделирования острого и хронического колита у лабораторных животных. Уже к 12-й неделе эксперимента у всех животных развивались

аденокарциномы толстой кишки. Таким образом, комбинация АОМ и ДСН позволяет воспроизвести колит-ассоциированный КРР (Tanimura et al., 2021; Deng et al., 2022; Dzhalilova et al., 2023г).

Выделяют два типа КРР, обусловленных различиями в кровоснабжении и эмбриональном происхождении отделов толстой кишки – левосторонний, локализующийся в дистальной трети поперечной ободочной кишки, селезеночном изгибе, нисходящей ободочной кишке, сигмовидной кишке и прямой кишке, и правосторонний в слепой восходящей ободочной кишке и проксимальных двух третях поперечной ободочной кишки (Stintzing et al., 2017). Использование канцерогена АОМ в сочетании с провоспалительным агентом ДСН вызывает развитие опухолей толстой кишки, сходных с опухолями при колит-ассоциированном КРР у человека по их локализации и морфологической характеристике (Tanimura et al., 2021; Deng et al., 2022; Dzhalilova et al., 2023г). Опухоли также располагаются в медиальном и дистальном отделах толстой кишки, гистологически характеризуются как тубулярные аденомы или умеренно дифференцированные тубулярные аденокарциномы. Наблюдается инвазия опухолей в подслизистую основу, мышечную и серозную оболочки. Важно отметить, что в отличие от опухолей, вызванных только АОМ, которые в основном представляют собой аденомы, воздействие АОМ и ДСН индуцирует полный процесс онкогенеза толстой кишки, прогрессирующего от начальной избыточной пролиферации эпителия крипт до развития карциномы толстой кишки (Li et al., 2022).

Индукция КРР с использованием АОМ в сочетании с ДСН у мышей оказалась информативной для выявления различных механизмов онкогенеза, многие из которых также имеют отношение к спорадическому КРР (Schmitt и Greten, 2021). Эта модель также оказалась очень удобной, относительно недорогой и высоковоспроизводимой, и в настоящее время широко используется в исследованиях колит-ассоциированного канцерогенеза.

Разные линии мышей имеют различную чувствительность к сочетанному воздействию АОМ и ДСН. R. Suzuki и соавт. (2006) оценивали развитие опухолей толстой кишки у четырех различных линий мышей: BALB/c, C3H/HeN, C57Bl/6N и DBA/2N. Животным однократно внутрибрюшинно вводили АОМ (10 мг/кг массы тела), затем через неделю воду заменяли на 1%-ый ДСН на 4 сут, животных выводили из эксперимента через 18 недель после инъекции АОМ. Частота развития аденокарцином толстой кишки у мышей BALB/c составила 100%, C57Bl/6N – 50%, а у двух других линий мышей опухоли не выявлены.

Несмотря на широкое использование АОМ/ДСН-индуцированного КРР, модель не стандартизована. Кроме того, в исследованиях не учитывается индивидуальная устойчивость к гипоксии. Большинство работ выполнено на мышах, преимущественно линий C57Bl/6, C57Bl/6J, C57Bl/6N и BALB/c. Для моделирования КРР преимущественно используют самцов, 1-5

внутрибрюшинных инъекций АОМ в суммарной дозе 7,4-60 мг/кг массы тела животного и 1-4 цикла потребления 1-5% ДСН в течение 2-8 сут с перерывами по 7-30 сут. Преимущественно используется одна инъекция АОМ в первый день эксперимента в дозе 10 мг/кг или 12,5 мг/кг. Мыши потребляют три цикла ДСН, продолжительностью 5 или 7 сут в концентрации 1-2%, перерывы между циклами ДСН составляют 14 сут. Длительность эксперимента колеблется от 6 до 25 недель, чаще всего составляет 10-12 недель (Dzhalilova et al., 2023г).

В большинстве работ отсутствует детальная патоморфологическая характеристика опухолей, индуцированных АОМ и ДСН. Наблюдаемые изменения чаще всего характеризуют как атипичную гиперплазию эпителия, дисплазию низкой и высокой степени, аденомы и аденоматозные полипы. По данным C. Bernardazzi и соавт. (2022) у самцов мышей C57Bl/6 после однократной внутрибрюшинной инъекции 12,5 мг/кг АОМ и трех циклов потребления по 7 сут 2,5%-го ДСН к 57 сут эксперимента (8 недель) 90% поражений были представлены аденомами и 10% – аденокарциномами. В работах R. Suzuki и соавт. (2015) и Y. Tanimura и соавт. (2021) использовали сроки 10, 20 и 30 недель после введения АОМ, частота развития опухолей с увеличением срока повышалась. Однако в данных работах использовали мышей Crl:CD-1 (ICR) и один цикл 2%-го ДСН. Следует отметить, что модель АОМ/ДСН лишь в редких случаях воспроизводит процессы метастазирования (Tanimura et al., 2021; Dzhalilova et al., 2023г).

Таким образом, существует множество экспериментальных подходов для изучения онкогенеза. Однако наиболее адекватной и высоковоспроизводимой моделью развития злокачественных опухолей от момента инициации на фоне хронического воспаления до прогрессии является модель колит-ассоциированного КРР с помощью АОМ и ДСН у мышей. Для изучения опухолевой прогрессии перспективными представляются модели наиболее злокачественных опухолей, например, глиобластомы. Однако частота метастазирования в этих моделях низкая, поэтому для сравнительной оценки распространенности метастазов наиболее адекватной моделью является перевиваемая клеточная линия карциномы легких Льюис.

1.3. Роль воспаления и иммунных реакций в развитии опухолей

1.3.1. Воспалительный и иммунный ответ на развитие опухоли

Воспалительный и иммунный ответ сопровождает развитие опухолей на всех этапах – инициации, промоции и прогрессии. Прогноз онкологических пациентов определяется не только характеристиками самой опухоли, но и связанным с ней воспалением (Diakos et al., 2014). По данным исследований с использованием технологии секвенирования единичных клеток и мультиплексного пространственного анализа показано, что на ранних этапах опухолевой трансформации происходят сопутствующие пространственные, молекулярные, структурные и функциональные изменения в функционировании иммунных клеток (Rozenblatt-Rosen et al., 2020). Предложен количественный метод Immunoscore, основанный на иммуногистохимическом (ИГХ) исследовании, который учитывает инфильтрацию опухоли и микроокружения CD3+ Т-лимфоцитами и CD8+ цитотоксическими Т-лимфоцитами и может использоваться для определения стратегии терапии КРР на ранней стадии (Galon и Lanzi, 2020). Клетки врожденного и адаптивного иммунитета реагируют на самые ранние неопластические процессы – установлено, что зоны метаплазии и дисплазии низкой степени характеризуются инфильтрацией наивными CD4+ Т-лимфоцитами, нейтрофилами, макрофагами, дендритными клетками (ДК) и тучными клетками (Angelova et al., 2021; de Visser и Joyce, 2023). По мере трансформации клеток и промоции опухоли наблюдается ее инфильтрация цитотоксическими Т-лимфоцитами, NK клетками (Natural Killer, естественные киллеры), а также поляризация макрофагов в провоспалительный фенотип (de Visser и Joyce, 2023).

По данным многочисленных экспериментальных и клинических исследований была предложена концепция иммунного надзора за опухолевым ростом, которая предполагает распознавание опухолевых антигенов и уничтожение возникающих опухолевых клеток иммунными (Swann и Smyth, 2007). Иммунная система противодействует развитию опухоли за счет активации NK клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов, которые способны непосредственно уничтожать трансформированные клетки. Кроме того, в борьбе с опухолью участвуют антигенпрезентирующие клетки – макрофаги и ДК, которые помогают распознавать трансформированные клетки (Angelova et al., 2021; de Visser и Joyce, 2023).

С другой стороны, иммунная система может способствовать опухолевой прогрессии. Двойственный характер взаимодействия иммунной системы и опухоли рассматривается как динамический процесс иммунноредактирования, состоящий из трех фаз: элиминации, равновесия и «ускользания» (Dunn et al., 2002; McCoach и Bivona, 2018). В период элиминации клетки врожденного и адаптивного иммунитета уничтожают возникающие опухолевые клетки задолго до клинического проявления заболевания. Этап элиминации может перейти в фазу равновесия, в период которой некоторые опухолевые клетки не уничтожаются, но поддерживается

контролируемый иммунной системой баланс между пролиферацией и гибелью опухолевых клеток, что объясняет десятилетия «покоя» опухоли (Koebel et al., 2007). Опухоль обладает различными механизмами, способными препятствовать нормальному функционированию иммунных клеток. Согласно концепции иммунного надзора и иммунноредактирования опухолевые клетки постоянно редактируют и модулируют противоопухолевый иммунный ответ организма, активируя механизмы иммуносупрессии, что способствует росту опухоли (Koebel et al., 2007). Предполагается, что для изменения баланса в свою пользу опухолевые клетки редактируют репертуар опухолевых антигенов, снижая их иммуногенность, и преобразуют микроокружение, которое становится иммуносупрессивным (Grivennikov et al., 2010). Опухолевые клетки «маскируются», и борьба иммунной системы со злокачественным образованием оказывается недостаточно эффективной. Если опухоль «ускользает» от распознавания и уничтожения иммунными клетками, она прогрессирует из фазы равновесия в фазу «ускользания» и проявляется клинически. Таким образом, взаимодействие иммунной системы со злокачественной опухолью представляет собой баланс между процессами иммунной активации и иммунной супрессии (Teng et al., 2015).

По мере прогрессии опухоли активируются механизмы иммуносупрессии для уклонения от иммунного надзора за счет того, что опухолевые клетки способствуют продукции цитокина TGF-β, индуцируют активацию Т-регуляторных клеток и накопление супрессорных клеток миелоидного происхождения MDSCs (Myeloid-Derived Suppressor Cells), а также повышение экспрессии генов, участвующих в иммуносупрессии. В итоге формируется иммуносупрессивное опухолевое микроокружение (TME), снижается распознавание опухолевых клеток за счет уменьшения антигенной нагрузки и синтеза MHC (Major Histocompatibility Complex, главный комплекс гистосовместимости) класса I и подавляется противоопухолевый иммунитет (Angelova et al., 2021; de Visser и Joyce, 2023). На ранних стадиях развития и прогрессии опухолей решающее значение имеет активация NF-κB как в трансформированных клетках, так и в клетках микроокружения (Wang et al., 2014).

1.3.1.1. Влияние локального воспаления на течение опухолевого процесса

Семейство NF-κB, открытое в 1986 г. группой Дэвида Балтимора (David Baltimore) как специфичный для В-лимфоцитов транскрипционный фактор (Sen и Baltimore, 1986; Zhang et al., 2017), состоит из пяти различных ДНК-связывающих белков, которые образуют множество гомодимеров и гетеродимеров (Karin, 2006; Perkins, 2012). Показано, что при многих типах злокачественных опухолей, как в опухолевых клетках, так и в микроокружении, NF-κB конститутивно активен и лишь в редких случаях такая активация обусловлена генетическими изменениями, связанными с NF-κB (Staudt, 2010). Конститутивно активный NF-κB был выявлен не только в опухолевых клеточных линиях человека, но и в опухолевых тканях, полученных от

пациентов с множественной миеломой, раком простаты, молочной железы и др. (Balkwill и Mantovani, 2001; Plummer et al., 2016). В опухолевых клетках активация NF-κB способствует повышению экспрессии антиапоптотических генов и выживанию клеток. Причины активации NF-κB в опухолевых клетках не до конца изучены, однако одной из них может быть окислительный стресс (Ju et al., 2024).

В клетках микроокружения опухоли NF-κB активируется в ответ на связывание патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMPs, Pathogen-Associated Molecular Patterns) и молекулярных паттернов, связанных с повреждением (DAMPs, Damage-Associated Molecular Patterns) с Толл-подобными рецепторами (TLRs, Toll-Like Receptors). Это взаимодействие в конечном итоге активирует комплекс IKK (IκB Kinase, киназа ингибитора NF-κB – IκB), который фосфорилирует IκB, что приводит к активации NF-κB в клетках микроокружения. В ответ на активацию NF-κB клетки микроокружения опухоли секретируют провоспалительные цитокины, такие как TNF-α (Tumor Necrosis Factor-α – фактор некроза опухоли-α), IL-1β и др. Они действуют на специфические рецепторы, присутствующие на трансформированных клетках, что приводит к дополнительной индукции NF-κB в опухолевых клетках через IKKβ-опосредованный канонический сигнальный путь (Martins et al., 2016). Каноническая стимуляция NF-κB индуцирует гены, участвующие в пролиферации клеток, их выживании, ангиогенезе и метастазировании. Возникновение метастазов требует тесного взаимодействия опухолевых и неопухолевых клеток (Lambert et al., 2017; Dongre и Weinberg, 2019). TGF-β – цитокин, продуцируемый опухолевыми, миелоидными клетками и регуляторными Т-лимфоцитами. TGF-β является важным регулятором ЭМП и метастазирования, его повышенный уровень на поздних стадиях развития опухолей ассоциирован с неблагоприятным прогнозом (Derynck et al., 2021). Однако на начальных этапах развития опухолей TGF-β проявляет противоопухолевую активность, ингибируя пролиферацию клеток и способствуя апоптозу (Ungefroren, 2021). Противоположные эффекты TGF-β на различных стадиях развития опухолей в настоящее время недостаточно исследованы.

Таким образом, активация NF-κB в злокачественных опухолях способствует выживанию опухолевых клеток за счет повышения экспрессии антиапоптотических генов и активирует гены, способствующие воспалению, в микроокружении. Цитокины, хемокины и другие белки, продуцируемые злокачественными клетками или клетками стромы, эндотелиальными и иммунными клетками, координируют внутриклеточную коммуникацию в микроокружении опухоли. Постоянный перекрестный обмен сигналами между клетками необходим для роста опухоли, ангиогенеза, инвазии и метастазирования (Diakos et al., 2014).

Воспалительное и иммунное микроокружение опухоли (TME) является одним из ключевых факторов, определяющих терапевтическую эффективность химиотерапии и иммунотерапии (Li

et al., 2021). Результаты опубликованных к настоящему времени многочисленных исследований, посвященных роли различных популяций иммунокомпетентных клеток в противоопухолевом иммунитете, указывают на то, что клеточный состав микроокружения опухоли характеризуется высокой гетерогенностью. Микроокружение опухоли может включать в себя множество иммунных клеток (табл. 1.1) – нейтрофилы, тучные клетки, эозинофилы, CD8+, CD4+ Т-лимфоциты, NK и NKT клетки, различные популяции регуляторных Т-клеток, В-лимфоциты, ДК, макрофаги (TAMs, Tumor-Associated Macrophages) и другие клеточные популяции, которые влияют на опухолевый процесс, включая рост, генетическую нестабильность, ангиогенез и метастазирование (Li et al., 2021; Lee и Ginhoux, 2022). Клеточный состав TME и его функциональное состояние различны при развитии опухолей разного типа и даже у пациентов с одной и той же нозологической формой опухоли, и могут во многих случаях коррелировать с прогнозом заболевания и результатами лечения, в то время как в других случаях не имеют прогностического значения (González-Silva et al., 2020; Klemm et al., 2020; Pan и Jia, 2021; Wang et al., 2023д). Индивидуальные особенности пациента (возраст, пол, индекс массы тела, образ жизни, микробиота), а также локализация опухоли являются значимыми факторами, определяющими свойства и состав TME.

Таблица 1.1

Ключевые иммунные клетки, формирующие TME (по K.E. de Visser и J.A. Joyce, 2023)

Тип клеток	**Функции в TME**	**Литературные источники**
Миелоидные иммунные клетки		
Макрофаги (TAMs)	Высокопластичная популяция иммунных клеток с про- и противоопухолевыми функциями. TAMs включают в себя несколько подгрупп, которые возникают из разных источников (резидентные макрофаги или инфильтрирующие макрофаги). В опухолях сосуществуют несколько подгрупп TAMs. Проопухолевые функции TAMs – способствуют иммуносупрессии, ангиогенезу, образованию метастазов и устойчивости опухолевых клеток к терапии, противоопухолевые – фагоцитоз опухолевых клеток и активация противоопухолевых иммунных реакций	DeNardo и Ruffell, 2019; Güç и Pollard, 2021
Моноциты	Моноциты циркулируют в кровотоке и мигрируют в ткани, где они дифференцируются в макрофаги и ДК. Моноциты выполняют проопухолевые и противоопухолевые функции, они могут вырабатывать противоопухолевые медиаторы и стимулировать NK клетки. Однако в TME они способствуют иммуносупрессии, ремоделированию ВКМ, ангиогенезу и интравазации опухолевых клеток	Olingy et al., 2019
Дендритные клетки (ДК)	ДК – это группа антигенпрезентирующих клеток, инициирующих и регулирующих адаптивные иммунные реакции. Интегрируя информацию из TME и передавая ее другим иммунным клеткам, в первую очередь Т-лимфоцитам, ДК могут способствовать формированию противоопухолевого иммунитета.	Gerhard et al., 2021; Hato et al., 2024
Нейтрофилы	При развитии опухолей число нейтрофилов увеличивается в TME, а также в крови и отдаленных от опухоли органах. В зависимости от условий в TME нейтрофилы могут выполнять проопухолевые и противоопухолевые функции. Увеличение их числа в крови приводит к иммуносупрессии и ремоделированию ВКМ в отдаленных от опухоли органах, что способствует формированию пре-метастатических ниш	Jaillon et al., 2020; Güç и Pollard, 2021
Супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSCs)	MDSCs представляют собой гетерогенную популяцию незрелых миелоидных клеток, которые в норме дифференцируются в ДК, макрофаги и гранулоциты. Они обладают выраженными иммуносупрессивными свойствами. Число этих клеток увеличивается у пациентов с опухолями и в моделях опухолей у мышей, и их присутствие в TME связано с неблагоприятным клиническим исходом. MDSCs подавляют NK клетки, Т-лимфоциты, В-лимфоциты и ДК посредством паракринных и межклеточных механизмов	Veglia et al., 2021

Таблица 1.1 (продолжение)

Ключевые иммунные клетки, формирующие TME (по K.E. de Visser и J.A. Joyce, 2023)

Тип клеток	**Функции в TME**	**Авторы**
Лимфоидные иммунные клетки		
Цитотоксические Т-лимфоциты (CD8+)	CD8+ Т-лимфоциты – мощные эффекторные клетки, осуществляющие противоопухолевый иммунный ответ. Они могут специфически распознавать и уничтожать опухолевые клетки посредством взаимодействия Т-клеточного рецептора (TCR, T-Cell Receptor) с пептидными комплексами, представленными на MHC класса I. В опухолях могут присутствовать CD8+ Т-лимфоциты с нарушенными функциями	van der Leun et al., 2020; Philip и Schietinger, 2022
Т-хелперы (CD4+)	CD4+ Т-хелперы влияют на множество других иммунных клеток, в частности, они способствуют эффективному функционированию CD8+ Т-лимфоцитов. В опухолях CD4+ Т-лимфоциты играют двойную роль. В частности, подтип Th1 CD4+ Т-клеток выполняет противоопухолевые функции, помогая CD8+ Т-цитотоксическим клеткам и В-лимфоцитам, а также уничтожая опухолевые клетки посредством продукции IFN-γ и TNF-α. С другой стороны, подтип Th2 секретирует противовоспалительные медиаторы, которые выполняют проопухолевые функции	DeNardo et al., 2009; Borst et al., 2018
Регуляторные Т-лимфоциты	Регуляторные Т-лимфоциты являются иммуносупрессивной субпопуляцией CD4+ Т-клеток. В опухолях регуляторные Т-лимфоциты подавляют противоопухолевый иммунитет с помощью различных механизмов. Их точная эффекторная программа зависит от сигналов микроокружения	Togashi et al., 2019
В-лимфоциты	В-лимфоциты – ключевые медиаторы гуморального иммунитета. В опухолях В-лимфоциты могут оказывать противоопухолевое действие посредством антителозависимой клеточной цитотоксичности и активации комплемента, они способствуют активации Т-лимфоцитов посредством презентации антигенов. В-лимфоциты также могут поддерживать рост опухолей, способствуя иммуносупрессии, продуцируя противовоспалительные и проангиогенные медиаторы. Субпопуляция иммуносупрессивных В-клеток (Bregs, regulatory B cells), участвует в формировании иммунологической толерантности	Yuen et al., 2016; Laumont et al., 2022
NK клетки	NK клетки – это цитотоксические лимфоидные клетки врожденного иммунитета. Они распознают и уничтожают клетки, утратившие MHC класса I. NK клетки обладают мощными противоопухолевыми свойствами, однако при прогрессии опухолевые клетки избегают устранения NK клетками путем снижения их цитотоксичности и мобилизации иммуносупрессивных миелоидных клеток и регуляторных Т-лимфоцитов	Chan и Ewald, 2022

Макрофаги играют ключевую роль в защите организма от чужеродных агентов и поддержании тканевого гомеостаза, в том числе при таких заболеваниях, как язвенный колит (ЯК) и сепсис, а также при развитии опухолей (Liu et al., 2021a; Hou et al., 2025; Qu et al., 2025). Костномозговые моноцитарные предшественники, проникая в ткани, дифференцируются в зрелые макрофаги и поляризуются в подтипы с различным фенотипом в зависимости от особенностей микроокружения. Предложена упрощенная классификация макрофагов на два основных типа: классически активированные противоопухолевые M1 и альтернативно активированные проопухолевые M2. Приобретение макрофагами M1 фенотипа индуцируется связыванием лигандов TLRs (например, ЛПС) или цитокинами, такими как TNF-α, IFN-γ (Interferon-γ, интерферон-γ) и GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор). Классические M1 макрофаги характеризуются поверхностной экспрессией TLR2, TLR4, CD80 и CD86 (Liu et al., 2021a). Они секретируют АФК и провоспалительные цитокины, такие как IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, IL-23 и TNF-α, которые модулируют Th1-опосредованные антигенспецифические воспалительные реакции (Biswas и Mantovani, 2010). Кроме того, в M1 макрофагах увеличивается экспрессия гена *NOS2* индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS, inducible Nitric Oxide Synthase), что способствует синтезу NO из L-аргинина. M1 макрофаги обладают высокой антигенпрезентирующей способностью и представляют опухолевые антигены (Locati et al., 2020; Liu et al., 2021a). Они определяются в опухолевом узле, как правило, на ранних стадиях развития опухоли и их основными функциями являются стимуляция воспаления, фагоцитоз и противоопухолевая активность (Кадагидзе и Черткова, 2016; Chanmee et al., 2014). Инфильтрация опухоли M1 макрофагами считается благоприятным признаком в прогнозе течения опухолевых процессов (Zhang и Sioud, 2023).

Напротив, M2 макрофаги, индуцируемые такими факторами как IL-4, IL-10, IL-13 или глюкокортикоидами, синтезируют противовоспалительные цитокины, ключевыми из которых являются TGF-β и IL-10 (Mantovani et al., 2004a). Продуцируя эти цитокины, M2 макрофаги создают иммуносупрессивную среду, поэтому к TAMs чаще всего относят именно M2 макрофаги (Mantovani et al., 2004a; Sica et al., 2006; Chen et al., 2023б). Однако существуют также экспериментальные данные о том, что TAMs представляют собой как M1, так и M2 макрофаги (Allavena et al., 2008). Выраженная инфильтрация опухоли M2 макрофагами обычно связана с неблагоприятным прогнозом (Mantovani et al., 2017). TGF-β и IL-10, продуцируемые макрофагами, ингибируют цитотоксические Т-лимфоциты, Th1 и Th2 CD4+ Т-клетки (Ng et al., 2013; Oh и Li, 2013). M2 макрофаги обладают ангиогенными и проинвазивными свойствами, они продуцируют факторы роста, хемокины, матриксные металлопротеиназы (MMPs), которые

направленно действуют на опухолевые клетки и клетки микроокружения, приводя к росту опухоли, инвазии и метастазированию (Condeelis и Pollard, 2006).

Таким образом, макрофаги регулируют множество ключевых процессов, обеспечивающих прогрессию опухолей, включая ангиогенез, инвазию опухолевых клеток, а также метастазирование. Следовательно, функциональные особенности макрофагов могут стать перспективными терапевтическими мишенями в клеточной терапии опухолей. Переключение направления дифференцировки макрофагов с фенотипа M2 на M1 было предложено в качестве терапевтического подхода для лечения злокачественных новообразований (Jumaniyazova et al., 2022; Shi et al., 2025).

Тем не менее, M1-M2 классификация макрофагов в последние годы подвержена значительной критике, так как макрофаги – динамичная популяция клеток, экспрессия генов в которых может постоянно меняться в зависимости от микроокружения (Ельчанинов и Фатхудинов, 2023; Murray et al. 2014). По данным исследований с использованием РНК-секвенирования единичных клеток (scRNA-seq, single-cell RNA-sequencing) в настоящее время предложена консенсусная модель транскриптомного разнообразия TAMs. Согласно полученным данным, на основе анализа генов, активности сигнальных путей и выполняемых функций в популяции макрофагов можно выделить семь основных подтипов, которые различаются по поверхностным маркерам и уровню экспрессии различных генов (Ma et al., 2022a). Тем не менее, и эти субпопуляции TAMs не являются исчерпывающими. Помимо них, существуют и другие, которые характерны для определенного типа опухоли и нозологии, поэтому изучение TAMs продолжается. Например, J. Wang и соавт. (2023) с помощью scRNA-seq выявлены четыре новые субпопуляции TAMs в различных солидных опухолях, включая *FCN1*+, *SPP1*+, *C1Q*+ и *CCL18*+ TAMs, которые характеризуются высокой экспрессией соответствующих генов. *FCN1*+ TAMs могут стимулировать воспаление; *SPP1*+ TAMs участвуют в ангиогенезе и активации стволовых опухолевых клеток, тогда как *C1Q*+ TAMs – в регуляции и подавлении иммунитета. Клетки *CCL18*+ являются терминальными иммуносупрессивными макрофагами, которые не только обладают более выраженной иммуносупрессивной функцией, но и способствуют усилению метастазирования (Wang et al., 2023б). Тем не менее, существуют некоторые несоответствия между субпопуляциями TAMs, идентифицированными с помощью scRNA-seq, и их фактической функцией, поэтому необходимо проведение дальнейших исследований.

TAMs и ассоциированные с опухолью нейтрофилы (TANs, Tumor-Associated Neutrophils) часто являются наиболее распространенными миелоидными клетками в TME различных опухолей. Помимо них по мере роста опухолей в микроокружении наблюдается увеличение количества дисфункциональных CD8+ Т-лимфоцитов, иммуносупрессивных CD4+FOXP3+ Т-регуляторных и регуляторных В-клеток, нарушается дифференцировка и функционирование ДК,

прогрессирующее снижение числа цитотоксических CD8+ Т-лимфоцитов и NK клеток (van der Leun et al., 2020; Zheng et al., 2021; Philip и Schietinger, 2022; de Visser и Joyce, 2023). Изучению прогностической значимости лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (TILs, Tumor-Infiltrating Lymphocytes), уделяется огромное внимание. TILs включают гетерогенную популяцию лимфоцитов, таких как Т-лимфоциты, В-лимфоциты и NK клетки (Santoiemma и Powell, 2015). В нескольких исследованиях показано, что локальное воспаление с увеличением числа TILs указывает на благоприятный прогноз при множестве опухолевых заболеваний (Lin et al., 2020; Sarnaik et al., 2024).

По данным клинических исследований, оценивающих прогностическое значение субпопуляций иммунокомпетентных клеток, повышенная инфильтрация опухолей цитотоксическими Т-лимфоцитами, Th1 и Th17 Т-лимфоцитами, NK клетками, ДК и М1 макрофагами при некоторых типах злокачественных опухолей является независимым благоприятным прогностическим фактором (Senovilla et al., 2012). В то же время, большое количество регуляторных Т-лимфоцитов, Th2 CD4+ Т-лимфоцитов и М2 макрофагов, как правило, указывают на неблагоприятный прогноз заболевания (Senovilla et al., 2012). Взаимодействие Т-лимфоцитов с прогрессирующими опухолями, установленное в 1968 г. I. Hellstrom и соавт. (1968) предполагает, что CD8+ Т-лимфоциты становятся дисфункциональными (толерантными или инертными) в ходе онкогенеза и не вырабатывают эффекторные цитокины (IFN-γ и TNF-α) и цитотоксические молекулы, такие как гранзимы и перфорин (Hellstrom и Hellstrom, 2019). Поэтому несмотря на инфильтрацию опухоли CD8+ Т-лимфоцитами, она прогрессирует (Philip и Schietinger, 2022).

Стимулируемые воспалением клетки являются важными источниками протеаз, которые разрушают ВКМ и облегчают метастазирование. Множество цитокинов, присутствующих в микроокружении опухоли, в том числе TNF-α, IL-6 и др., способствуют выживанию циркулирующих в крови метастатических клеток (Nguyen et al., 2009; Grivennikov et al., 2010). Некоторые провоспалительные цитокины, уровень которых повышается в крови пациентов со злокачественными опухолями, способствуют увеличению синтеза молекул адгезии на эндотелии или органах-мишенях и тем самым вероятности прикрепления метастазирующих опухолевых клеток (Mantovani et al., 2008; Grivennikov et al., 2010). Воспалительные процессы сохраняются до тех пор, пока растет опухоль, впоследствии вызывая системное воспаление.

1.3.1.2. Вызванный опухолью системный воспалительный ответ

Воспаление, вызванное опухолью, является ключевым фактором быстрой прогрессии при большинстве злокачественных опухолей (Grivennikov et al., 2010; de Visser и Joyce J.A., 2023; Xie et al., 2025). Связанное с опухолью локальное воспаление имеет последствия не только для ближайшего микроокружения, но также способствует высвобождению в кровоток медиаторов –

цитокинов, хемокинов, эйкозаноидов, активных форм кислорода и азота, белков острой фазы и факторов роста, DAMPs, внеклеточных везикул и других компонентов, которые инициируют и поддерживают воспалительный ответ (Dolan et al., 2017; Aguilar-Cazares et al., 2022). В результате развивается СВО, индуцируемый окислительным стрессом и некротической гибелью опухолевых клеток вследствие недостаточного кровоснабжения (Dolan et al., 2017). СВО является одной из основных характеристик злокачественного новообразования, он тесно связан с клиническими симптомами, указывающими на наличие и прогрессию опухоли, и служит неблагоприятным прогностическим признаком для онкологических пациентов (Dolan et al., 2017; Aguilar-Cazares et al., 2022).

Точный механизм СВО на фоне опухолевой прогрессии остается недостаточно изученным, однако очевидно, что он связан с гипоксией и воспалением, индуцированными опухолью, а также синтезом цитокинов и образованием DAMPs. Гипоксия и воспаление приводят к продукции разнообразных секретируемых факторов, образующихся в опухоли (TDSF, Tumor-Derived Secreted Factors), внеклеточных везикул или экзосом и др. (Aguilar-Cazares et al., 2022; Zhang et al., 2024б). Иммунные клетки, мигрировавшие в ткани опухоли, и клетки опухоли продуцируют различные медиаторы (IFN-γ, IL-1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 17, 18, TNF-α, TGF-β, GM-CSF, PDGF, VEGF, EGF и др.), которые высвобождаются в кровоток, приводя к СВО (Dolan et al., 2017). СВО способствует пролиферации опухолевых клеток, ангиогенезу и метастазированию в отдаленные органы, привлекая супрессорные и/или регуляторные иммунные клетки, включая макрофаги, и обеспечивая формирование пре-метастатических ниш (Tuomisto et al., 2019; Aguilar-Cazares et al., 2022; Wang et al., 2024б). При прогрессии опухолей число нейтрофилов, MDSCs и регуляторных Т-лимфоцитов увеличивается в крови и периферических тканях, что ингибирует цитотоксические лимфоциты и способствует иммуносупрессивному фенотипу макрофагов, что еще больше стимулирует опухолевый рост (Murray et al., 2014). Это механизм, с помощью которого воспаление и опухоли инициируют и поддерживают друг друга.

СВО вызывает дисфункцию клеток в различных органах и тканях, удаленных от опухоли, вызывая метаболические нарушения, расстройства нейроэндокринной регуляции и появление комплекса различных симптомов, называемых паранеопластическим синдромом (рис. 1.4), который снижает эффективность терапии, качество жизни и выживаемость онкологических пациентов.

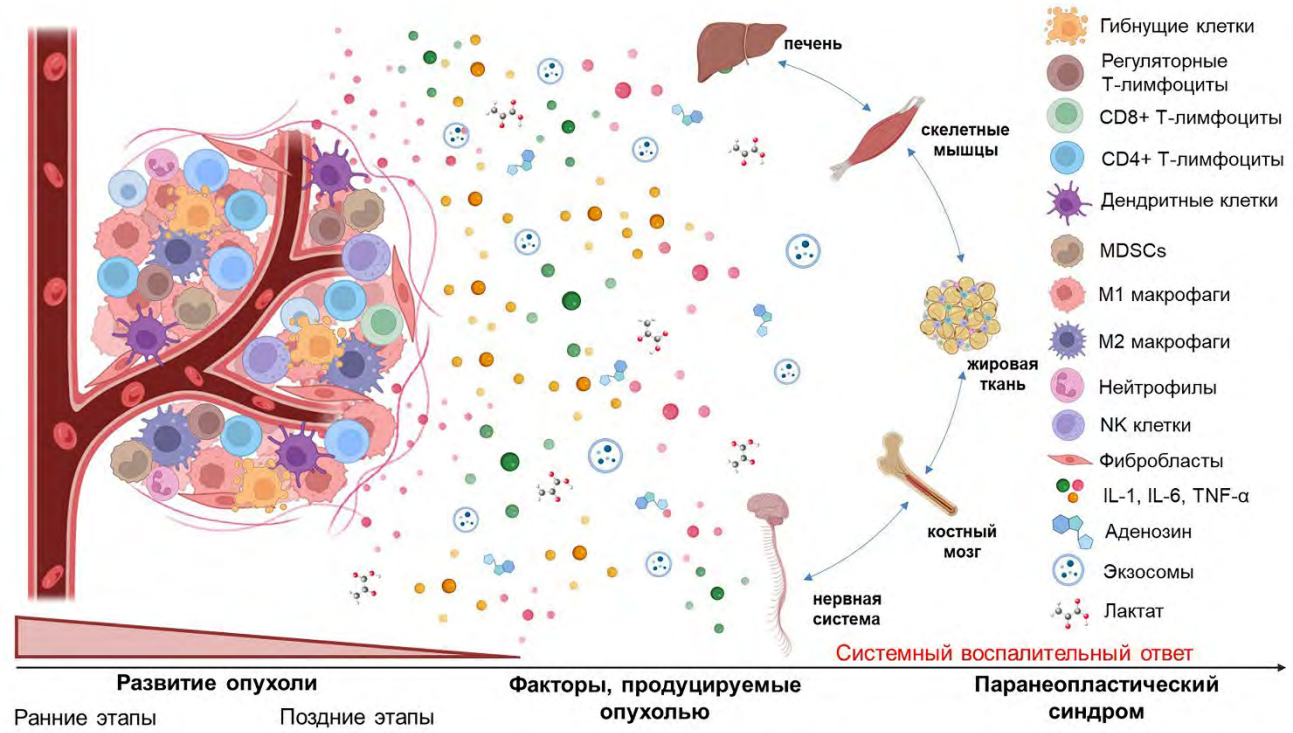


Рис. 1.4. Механизм развития паранеопластического синдрома, вызванного СВО на фоне прогрессии опухоли (по D. Aguilar-Cazares и соавт., 2022, в модификации). Во время поздних стадий развития опухоли, опухолевые, стромальные и иммунные клетки продуцируют множество молекул, таких как цитокины, хемокины, ростовые факторы и др., которые при попадании в кровоток индуцируют функциональные и метаболические нарушения в отдаленных от опухоли органах

Под паранеопластическим синдромом понимают клинические проявления отдаленного эффекта опухолевого процесса, что является результатом химических, биологических, иммунологических и гормональных изменений, индуцированных опухолью (Фурсова и Лихачева, 2017). Паранеопластический синдром представляет одну из наиболее актуальных проблем в связи с его прогностической значимостью. Данный синдром входит в обширный круг различных групп заболеваний, может проявляться многообразной неспецифической клинической картиной. Многие симптомы у онкологических пациентов, такие как лихорадка, анемия, усталость, потеря аппетита и кахексия являются проявлением паранеопластического синдрома (Johannes и Musser, 2019; Tomasin et al., 2019). Проявления данного синдрома длительное время могут препятствовать постановке правильного диагноза (Oh et al., 2014; Wu et al., 2018a). Паранеопластический синдром чаще развивается у пациентов среднего и пожилого возраста, и по разным оценкам выявляется у 7-33% больных злокачественными опухолями (Ülger и Delik, 2022; Pérez-Bucio et al., 2025). Паранеопластический синдром может формироваться вместе с развитием опухоли и, что более значимо, задолго до ее клинического проявления (Болотная и Сербина, 2008).

Для оценки СВО при прогрессии опухолей используют различные биомаркеры, в том числе гематологические показатели, преимуществом которых является простота выполнения анализа. К маркерам СВО относят лейкоцитоз, лимфопению, тромбоцитоз, повышение числа нейтрофилов со сдвигом лейкоцитарной формулы влево, белков острой фазы воспаления (например, С-реактивного белка – СРБ) и различных цитокинов (Diakos et al., 2014; Guner и Kim, 2019), что расценивают как отражение общего нарушения баланса воспалительных и противоопухолевых иммунных реакций организма. Показана взаимосвязь количества и соотношения клеток крови с развитием различных опухолевых заболеваний (Wong et al., 2020; Nøst et al., 2021). По данным клинических исследований, изменение соотношения специфических популяций клеток крови может служить независимым фактором прогноза при злокачественных опухолях различных локализаций (Dolan et al., 2017). Для оценки СВО при прогрессии опухолей преимущественно анализируют различные индексы: соотношение нейтрофилов к лимфоцитам – NLR (Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio), лимфоцитов к моноцитам – LMR (Lymphocyte-to-Monocyte Ratio), PLR (тромбоцитарно-лимфоцитарный индекс) и индекс системного воспалительного ответа SIRI (Systemic Inflammatory Response Index, нейтрофилы×моноциты/лимфоциты) (Pacheco-Barcia et al., 2020; Nøst et al., 2021; Kim et al., 2022; Zhu et al., 2022). Высокие показатели таких маркеров системного воспаления, как СРБ, NLR и PLR связаны с неблагоприятным прогнозом или поздними стадиями при различных видах опухолей, включая рак молочной железы, КРР и рак легких (Nora et al., 2018; Pacheco-Barcia et al., 2020; Nøst et al., 2021; Kim et al., 2022; Zhu et al., 2022). Все перечисленные выше индексы (NLR, LMR и PLR) продемонстрировали высокую прогностическую значимость при исследовании выживаемости онкологических пациентов. Кроме того, показана значимость изменений в сыворотке крови цитокинов, хемокинов и факторов роста в качестве маркеров СВО при опухолях (Сергеева и соавт., 2022; Kantola et al., 2012; Chen et al., 2015в; Dolan et al., 2017).

Таким образом, опухолевые клетки и клетки иммунной системы конкурируют друг с другом, иммунная система осуществляет надзор, который на ранних стадиях может препятствовать развитию опухоли. При прогрессии опухоль приобретает способность уклоняться от иммунного надзора, блокируя противоопухолевый иммунитет, формируя иммуносупрессивное ТМЕ и вырабатывая различные факторы, способствующие как локальному, так и системному воспалению. Роль воспаления при развитии опухолей является одной из ключевых и зависит от многих факторов. Известно, что воспаление может развиваться не только в ответ на прогрессию опухоли, но и предшествовать ее появлению.

1.3.2. Хроническое воспаление как фактор инициации злокачественных опухолей

Воспаление – это древний эволюционный процесс, который включает активацию, рекрутирование и взаимодействие клеток врожденного и адаптивного иммунитета. Воспаление

играет важную роль в защите организма от патогенов, но оно также важно для восстановления, регенерации и ремоделирования тканей, а некоторые его формы необходимы для регуляции тканевого гомеостаза (Medzhitov, 2008). Наличие взаимосвязи между воспалением и онкогенезом было предложено Р. Вирховым (Virhow, 1858), когда при микроскопическом исследовании опухолей он обнаружил в них лейкоциты, а в 1915 г. было подтверждено, что хроническое воспаление может приводить к развитию злокачественных опухолей (Yamagiwa и Ichikawa, 1915). Вклад иммунной системы и воспаления в развитие, прогрессию и метастазирование злокачественных опухолей неоспорим, что подтверждается включением воспаления в факторы, способствующие развитию опухолей («Hallmarks of Cancer») (Hanahan и Weinberg, 2011). Воспаление тесно связано со всеми стадиями развития большинства видов злокачественных опухолей, а также с эффективностью противоопухолевой терапии (Coussens и Werb, 2002; Taniguchi и Karin, 2018). В настоящее время хроническое воспаление является общепризнанным фактором, способствующим развитию злокачественных опухолей.

Существует множество факторов, инициирующих хроническое воспаление, которые увеличивают риск развития опухолей, в частности, персистенция вирусов гепатита B, C, папилломы человека, инфекция *Helicobacter pylori* и др. (de Martel et al., 2020; Nejsum и Andersen, 2020). Своевременная элиминация патогенов и эффективное лечение хронического воспалительного процесса предупреждает развитие опухолей.

Хроническое воспаление часто протекает без определенных признаков и симптомов, и им могут пренебрегать до тех пор, пока заболевание не станет клинически очевидным (Liu et al., 2019). Хроническое воспаление способствует формированию иммуносупрессивной среды с большим количеством противовоспалительных M2 макрофагов, MDSCs, Т-регуляторных лимфоцитов, а также противовоспалительных цитокинов, таких как IL-4, IL-10, IL-13 и TGF-β, регулирующих иммунный и воспалительный ответ, что обеспечивает благоприятные условия для инициации, промоции и прогрессии опухолей (Murata, 2018; Zhao et al., 2021).

Установлено, что около 25% случаев злокачественных опухолей связаны с хроническим воспалением, однако точные механизмы этой взаимосвязи остаются недостаточно изученными (Balkwill и Mantovani, 2012; Murata, 2018; Greten и Grivennikov, 2019; Turizo-Smith et al., 2024). Воспалительные и опухолевые процессы сопровождаются активацией сходных сигнальных путей, контролирующих пролиферацию клеток, миграцию и ангиогенез, которые регулируются факторами роста, провоспалительными цитокинами и проангиогенными факторами (Dvorak, 1986; Balkwill и Mantovani, 2001). Например, более 500 связанных с прогрессией опухолей генов регулируются сигнальным путем NF-κB (Taniguchi и Karin, 2018).

Активация NF-κB является ключевым фактором, который приводит к развитию злокачественной опухоли на фоне хронического воспаления и индуцируется вирусными и

бактериальными инфекциями, продуктами некроза клеток, повреждением ДНК, окислительным стрессом и провоспалительными цитокинами (Pikarsky et al., 2004; Karin и Greten, 2005). Роль NF-κB в инициации и прогрессии опухолей на фоне хронического воспаления впервые была изучена у мышей на классической модели КРР – химической индукции ВЗК с помощью АОМ и ДСН (Greten et al., 2004; Grivennikov et al., 2009; Keller et al., 2019). NF-κB активируется как в эпителиальных клетках, где он препятствует гибели клеток, так и в миелоидных клетках, где он контролирует продукцию цитокинов, способствующих развитию опухолей (Greten et al., 2004). Помимо NF-κB, хроническое воспаление приводит к активации множества сигнальных путей, таких как MAPK, JAK-STAT (Janus Kinases-Signal Transducer and Activator of Transcription proteins), PI3K/AKT/mTOR. Таким образом, хроническое воспаление способствует инициации опухоли и пролиферации трансформированных клонов.

Кроме инициации опухолей, воспаление может служить непосредственным фактором их промоции. Одно из первых доказательств роли воспаления в промоции опухоли было получено на модели колит-ассоциированного КРР в ходе исследований инактивации NF-κB в миелоидных клетках, что приводило к снижению роста опухоли (Greten et al., 2004). NF-κB-зависимые цитокины играют ключевую роль в промоции роста опухоли, их инактивация снижает рост опухоли (Grivennikov et al., 2009; Liu et al., 2018; Gargalionis et al., 2021). Активация внутриклеточных сигнальных каскадов под действием провоспалительных цитокинов, таких как IL-6, IL-11 и IL-17, увеличивает скорость пролиферации опухолевых клеток, особенно в условиях гипоксии и недостатка питательных веществ (Hibino et al., 2021).

Мигрирующие в очаг воспаления макрофаги и нейтрофилы продуцируют активные формы кислорода и азота (рис. 1.5), что вызывает окислительный стресс и приводит к различным типам повреждений нуклеиновых кислот, белков и липидов (Murata et al., 2012; Canli et al., 2017). Эти изменения способствуют накоплению мутаций, нарушению функционирования опухолевых супрессоров и протоонкогенов, что увеличивает вероятность избыточной пролиферации клеток и развития опухоли (Murata, 2018). Например, хроническое воспаление в кишке приводит к накоплению мутаций в *Trp53* и других генах, связанных с развитием злокачественных опухолей, в эпителиальных клетках (Grivennikov и Cominelli, 2016; Robles et al., 2016).

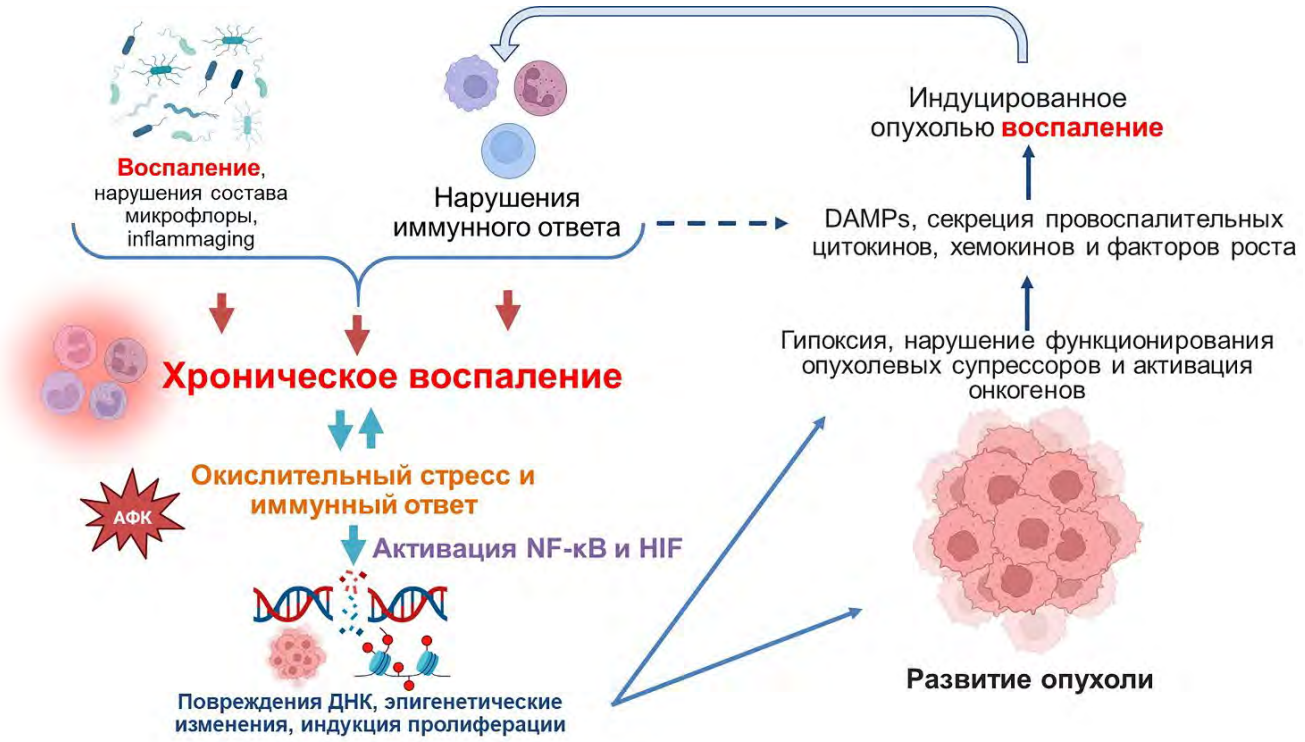


Рис. 1.5. Роль воспаления в развитии опухолей (по F. Anwar и соавт., 2023)

Подчеркивая важность окислительного стресса в процессе развития воспаления, G. Valacchi и соавт. (2018) предложили термин «OxInflammation» (Valacchi et al., 2018). Уровень OxInflammation предполагается использовать в качестве биомаркера для мониторинга патологических состояний, вызванных стрессорами окружающей среды (Mrakic-Sposta et al., 2022). Предложенная концепция OxInflammation основана на эпидемиологических и клинических данных, свидетельствующих о взаимосвязи между уровнем маркеров воспаления в сыворотке и плазме крови, и маркеров окислительного стресса (Pou et al., 2007; Il'yasova et al., 2008). В отличие от маркеров воспаления (таких как СРБ, IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α и др.), которые измеряются стандартизованными и высокопроизводительными методами, валидированный индекс окислительного стресса не разработан (Cervellati и Bergamini, 2015; Frijhoff et al., 2015). Однако существуют способы оценки окислительного стресса (тест FORT – Free Oxygen Radicals Testing) по выделению АФК с использованием колориметрической регистрации, а также определения общей антиоксидантной способности (тест FORD – Free Oxygen Radicals Defence) по измерению снижения абсорбции, которое пропорционально концентрации антиоксидантов в крови (Palmieri и Sblendorio, 2007; Pavlatou et al., 2009; Găman et al., 2020).

Воспаление регулирует метастазирование, так как экспериментальное ингибирование воспалительных реакций способствует уничтожению микрометастазов. Адекватных моделей метастазирования опухолей крайней мало, поэтому механизмы того, как воспаление может влиять на этот процесс, недостаточно изучены (Diakos et al., 2014; Tomasin et al., 2019). Цитокины, включая IL-1β и TNF-α, могут напрямую влиять на активацию индуцирующих ЭМП

транскрипционных факторов TWIST и SLUG (Li et al., 2012; Sistigu et al., 2017; Suarez-Carmona et al., 2017). Рекрутирование миелоидных клеток к инвазивному краю опухоли приводит к продукции матриксных металлопротеиназ (MMPs) и других ферментов, которые ремоделируют ВКМ и облегчают миграцию клеток (Hibino et al., 2021; Salemme et al., 2021).

Таким образом, хроническое воспаление приводит к развитию опухолей за счет активации различных сигнальных путей, способствующих пролиферации клеток и подавлению их апоптоза, а также окислительного стресса. Одним из классических видов опухолей, развивающихся на фоне воспаления, является колит-ассоциированный КРР.

Роль хронического воспаления в развитии злокачественных опухолей на примере колит-ассоциированного КРР

Некоторые хронические воспалительные заболевания с клинической точки зрения считаются предраковыми состояниями. Хроническое воспаление органов ЖКТ, например, возникающее при гастрите и ВЗК, значительно увеличивает риск развития опухолей за счет продукции цитокинов, таких как TNF-α, IL-1, IL-6, IL-17A и IL-23, а также активации NF-κB и STAT3 (West et al., 2015; Lasry et al., 2016). Рак желудка и КРР являются классическими воспалительно-зависимыми видами злокачественных опухолей (Coussens и Werb, 2002; Grivennikov et al., 2010).

Существует три основных типа КРР: спорадический, наследственный и связанный с ВЗК. Эпидемиологические, клинические и патологические особенности КРР, связанного с ВЗК, отличаются от спорадического и наследственного (Nebbia et al., 2020). Воспаление также играет критическую роль в развитии и прогрессии спорадического КРР, которому не предшествует воспаление толстой кишки (West et al., 2015; Lasry et al., 2016). Большинство случаев спорадического КРР сопровождаются повышенной экспрессией IL-1β, IL-6, IL-17A и IL-23 (Schetter et al., 2009; Tosolini et al., 2011).

Длительность ВЗК и тяжесть его течения напрямую связаны с риском развития КРР (Schmitt и Greten, 2021). Более того, на фоне ВЗК опухоль развивается у пациентов более молодого возраста по сравнению со спорадическим КРР. Риск колит-ассоциированного КРР, по-видимому, связан с различными факторами, такими как возраст на момент постановки диагноза, длительность заболевания и тяжесть ЯК (Yamamoto-Furusho и Gutierrez-Herrera, 2025). Вероятно, одним из факторов возникновения КРР на фоне хронического колита может быть индивидуальная устойчивость организма к гипоксии.

Считается, что канцерогенез, связанный с ВЗК, обусловлен хроническим воспалением толстой кишки, а также сочетанием генетических, иммунологических, инфекционных и других факторов. Хроническое воспаление приводит к патологической регенерации тканей и таким образом усиливает промоцию и прогрессию опухолей (Kuraishy et al., 2011). В развитии колит-

ассоциированного КРР ключевую роль играет активация NF-κB и связанных с ним сигнальных путей и цитокинов, таких как PI3K/AKT/mTOR, TNF-α, IL-1β и IL-6, что приводит к нарушению баланса пролиферации и дифференцировки клеток и инициации опухолевой трансформации (Greten et al., 2004; Yamamoto-Furusho и Gutierrez-Herrera, 2025). Опухоли при колит-ассоциированном КРР расположены в зонах активного воспаления и развиваются за счет накопления многочисленных мутаций в эпителиальных клетках (Van Der Kraak et al., 2015).

Накопление мутаций, сопровождающее последовательность воспаление-дисплазия-карцинома при ВЗК, отличается от классической последовательности аденома-карцинома при спорадическом КРР (Nagao-Kitamoto et al., 2022). Спорадический КРР сопровождается мутациями в аденоматозном опухолевом супрессоре *APC (Adenomatous Polyposis Coli)*, что приводит к аберрантной активации сигнального пути Wnt (Wingless-related integration site), контролирующего пролиферацию и дифференцировку клеток (Jen et al., 1994; Vinson et al., 2016). Кроме того, активируется сигнальный путь Notch, регулирующий пролиферацию, дифференцировку и апоптоз (Zhang et al., 2010). Последующие мутации обычно затрагивают ген *KRAS* (Kirsten Rat Sarcoma 2 viral oncogene homolog, гомолог вирусного онкогена саркомы крысы Кирстен), который в дальнейшем усиливает передачу сигналов Wnt и тем самым способствует росту аденомы (Smith et al., 1994; Janssen et al., 2006). Мутации в гене опухолевого супрессора *TRP53* в дальнейшем способствуют трансформации аденоматозных полипов кишки в карциномы (Weinberg, 1989; Rodrigues et al., 1990).

Напротив, при колит-ассоциированном КРР самые ранние мутации в основном затрагивают ген, кодирующий p53 (Brentnall et al., 1994). Мутации *TRP53* были обнаружены у 89% пациентов с колит-ассоциированным КРР (всего исследовали 47 пациентов разного пола) (Yaeger et al., 2016), в то время как другие мутации, присутствующие при спорадическом КРР, были менее частыми, например, изменения гена *APC* были обнаружены менее чем в 30% образцов колит-ассоциированного КРР. Мутации, которые инактивируют или нарушают функцию p53, часто соответствуют поздней стадии перехода аденома-карцинома при спорадическом раке, а при КРР, связанном с ВЗК, инициируют мутации, которые могут даже предшествовать развитию гистологически наблюдаемой дисплазии (Ullman и Itzkowitz, 2011).

Тем не менее, как и в случае спорадического КРР, ранняя активация Wnt имеет решающее значение для развития опухоли на фоне хронического колита (Shenoy et al., 2012). Кроме того, мутации *KRAS* были обнаружены примерно в 30-40% случаев как спорадического КРР, так и при колит-ассоциированном КРР (Smith et al., 2002; Yaeger et al., 2016). Хотя генетические изменения, лежащие в основе КРР, достаточно хорошо изучены, только состав мутаций опухолевых клеток не позволяет классифицировать типы опухолей или точно прогнозировать выживаемость

пациентов, так как прогрессия опухоли зависит, помимо мутаций, от тесного взаимодействия опухолевых клеток с TME (Schmitt и Greten, 2021).

В пятом издании классификации опухолей ЖКТ (Digestive System Tumours WHO Classification of Tumours, 2019) Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) канцерогенезу, связанному с ВЗК, посвящен специальный раздел (Дисплазия толстой кишки, связанная с воспалительными заболеваниями кишечника, стр. 174), в котором представлена подробная информация о его патогенезе и гистопатологии. Дисплазия, связанная с ВЗК, представляет собой явное неопластическое изменение кишечного эпителия, которое остается ограниченным базальной мембраной, при этом выделяют железистую интраэпителиальную неоплазию высокой и низкой степени. При ЯК в большинстве случаев дисплазия возникает в левом или дистальном отделе толстой кишки. Специфических признаков или симптомов, связанных с дисплазией при ВЗК, нет. Распространенные изъязвления и полипоидные поражения могут вызывать кровотечения, однако чаще они происходят уже при прогрессии злокачественной опухоли. Для эндоскопической классификации поверхностных эпителиальных образований преимущественно используют Парижскую классификацию (The Paris endoscopic classification of superficial neoplastic lesions: esophagus, stomach, and colon, 2003; Endoscopic Classification Review Group, 2005). Эпителиальные новообразования ЖКТ квалифицируются как поверхностные, когда глубина их распространения ограничена слизистой оболочкой. Невыступающие или неполиповидные новообразования включают язвы и так называемые плоские поражения. Плоские поражения могут быть слегка (незначительно) приподнятыми, полностью плоскими или углубленными по сравнению с прилегающей слизистой оболочкой. Полиповидные новообразования при эндоскопическом исследовании возвышаются над окружающей слизистой оболочкой (Кашин и соавт., 2019).

Таким образом, воспаление играет существенную роль на всех этапах развития опухолей (рис. 1.6). Хроническое воспаление может способствовать развитию и прогрессии опухолей, вызывая иммуносупрессию и нарушая противоопухолевый иммунитет (Shalapour и Karin, 2015; Pęczek et al., 2023). Стимулирующая онкогенез функция воспаления во многом обусловлена его существенной ролью в регенерации и восстановлении тканей (Karin и Clevers, 2016).

Рис. 1.6. Влияние воспаления на развитие опухолей (по M. Catalano и соавт., 2023, в модификации). Как хроническое воспаление, предшествующее развитию опухолей, так и воспаление, развившееся на фоне опухолевого процесса, способствуют опухолевой прогрессии. Во многом это обусловлено активацией фактора NF-κB и синтезом провоспалительных цитокинов, а также иммуносупрессией. Кроме того, в данном процессе ключевую роль играет гипоксия и активация фактора HIF-1α

Следует отметить, что хотя большинство данных подтверждают стимулирующий эффект воспаления на онкогенез, в некоторых случаях оно может оказывать супрессорное действие. Например, широкое применение Bacillus Calmette-Guerin (BCG, БЦЖ) для иммунотерапии рака мочевого пузыря основано на ее способности стимулировать продукцию различных цитокинов (IL-10, 12, 18, TNF-α, GM-CSF и IFN-γ) и привлекать эффекторные иммунные клетки (NK клетки, CD4+ и CD8+ Т-лимфоциты), что в совокупности формирует эффективный противоопухолевый ответ (Askeland et al., 2012). Воздействие таких стимулов как БЦЖ, β-глюкан и ЛПС может приводить к формированию тренированного иммунитета, который при повторной стимуляции способствует более выраженному ответу, и рассматривается как один из подходов к персонализированной иммунотерапии опухолей (Lérias et al., 2019; Netea et al. 2020).

Таким образом, воспалительный и иммунный ответ сопровождает развитие опухолей на всех этапах – инициации, промоции и прогрессии. Прогноз онкологических пациентов определяется не только характеристиками самой опухоли, но и связанным с ней воспалением. Кроме того, хроническое воспаление может приводить к развитию опухолей за счет формирования иммуносупрессивной среды с большим количеством противовоспалительных М2

макрофагов, MDSCs, Т-регуляторных лимфоцитов, а также противовоспалительных цитокинов, таких как IL-10 и TGF-β, регулирующих иммунный ответ, что обеспечивает благоприятную среду для инициации опухолей. При этом воспаление при развитии опухолей сопровождается кислородной недостаточностью – гипоксией, что будет обсуждаться ниже.

1.4. Гипоксия в развитии опухолей

1.4.1. Гипоксия и активация HIF на различных этапах развития опухолей

По данным литературы кислородная недостаточность играет одну из ключевых ролей в развитии злокачественных опухолей различных типов, и присутствует в 90% солидных новообразований (Harris, 2002; Semenza 2010; Ye et al., 2019; Della Rocca et al., 2022; Luo et al., 2022). Показано, что локальный дефицит O_2 в опухоли коррелирует с ее агрессивностью, темпами прогрессии и метастазирования, а также устойчивостью к терапии (Semenza, 2010; Gorr et al., 2010; Wicks и Semenza, 2022). Развитие гипоксии в ткани опухоли является неблагоприятным прогностическим фактором патогенеза онкологических заболеваний. У пациентов, первичная опухоль которых находится в состоянии гипоксии при постановке диагноза, с большей вероятностью будет наблюдаться рецидив опухоли и метастатического очага, независимо от вида проведенной терапии (Jun et al., 2017). Гипоксия в тканях опухоли связана со снижением выживаемости пациентов при раке предстательной железы, шейки матки и плоскоклеточном раке головы и шеи (Datta et al., 2021; Abu El Maaty et al., 2022; Ostapowicz et al., 2024). Гипоксическая среда изменяет уровни экспрессии генов, которые регулируют метаболизм опухолевых клеток и другие процессы, такие как ангиогенез, ЭМП, инвазия и метастазирование (рис. 1.7), что способствует формированию более агрессивного фенотипа опухолей и низкой эффективности их терапии (Dzhalilova и Makarova, 2021; Luo et al., 2022). Поэтому исследование молекулярно-биологических механизмов взаимосвязи индивидуальной устойчивости организма к гипоксии и опухолевого роста позволит определить мишени для разработки новых методов эффективной терапии.

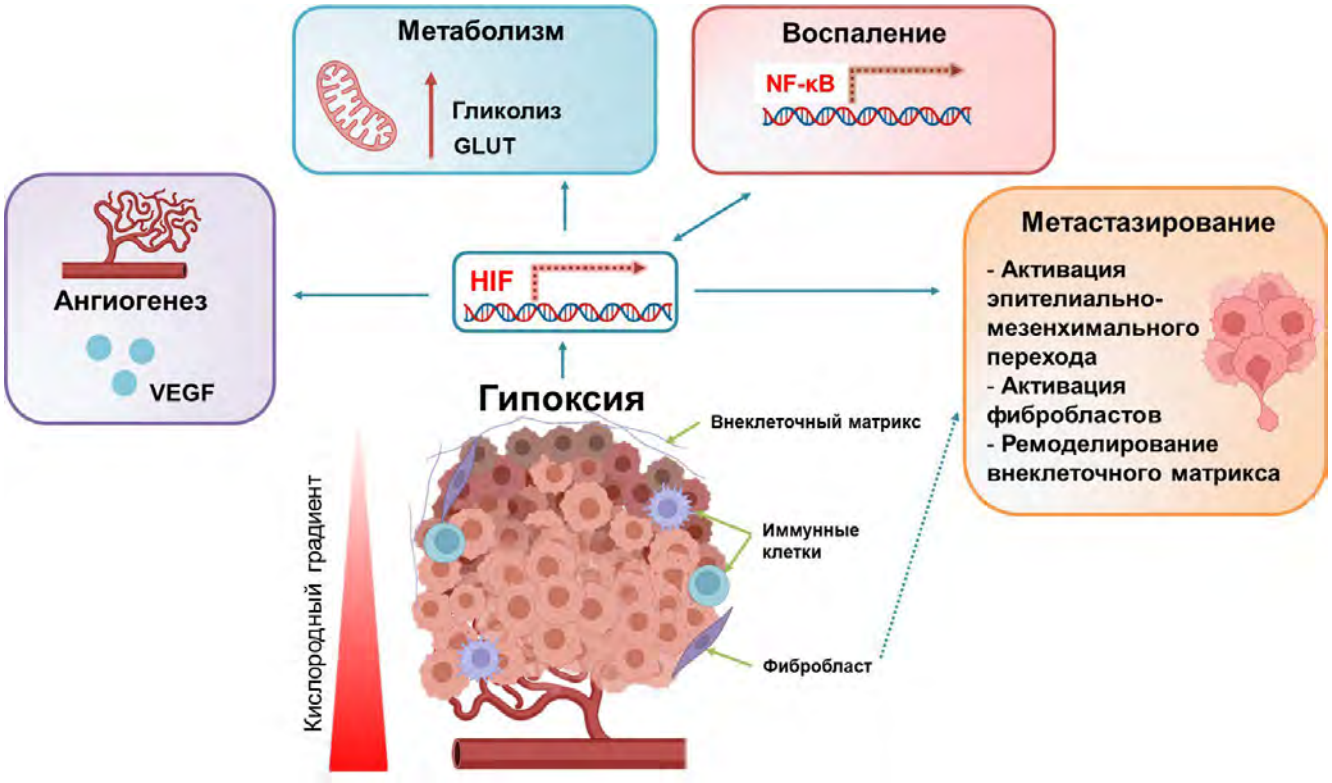


Рис. 1.7. Роль гипоксии и HIF в развитии злокачественных опухолей (по E.E. Wicks и G.L. Semenza, 2022, в модификации)

Определить степень гипоксии в опухолях сложно из-за различий в их размерах, области и методах измерения. Кроме того, в тканях оксигенация сильно варьирует, в том числе в пределах одного и того же органа (Wicks и Semenza, 2022). При измерении полярографическим методом парциального давления кислорода (pO_2) у пациентов выявлены его низкие значения (<10 мм рт.ст.) во многих опухолях, включая рак поджелудочной железы, молочной железы и шейки матки (Lartigau et al., 1997; Koong et al., 2000; McKeown, 2014).

Возникающие в процессе развития опухолей мутации и активная пролиферация клеток приводят к развитию гипоксии и активации фактора HIF (Semenza, 2010). С увеличением активности HIF связаны как мутации, приводящие к нарушению функции опухолевых супрессоров (в первую очередь, *VHL*), так и мутации, активирующие протоонкогены и различные сигнальные пути. На экспериментальных моделях и клиническом материале показано, что содержание HIF-1α или HIF-2α в опухоли коррелирует с темпами ее роста, васкуляризации и метастазирования (Semenza, 2010). Повышение активности HIF-1α при развитии опухолей происходит либо в результате уменьшения его убиквитинирования, либо увеличения синтеза белка. Например, подавление функции генов-супрессоров, таких как *TRP53* и *VHL*, уменьшает убиквитинирование HIF-1α, в то время как активация сигнальных путей PI3K/AKT/mTOR, MAPK и нарушение функционирования *PTEN* способствуют увеличению синтеза белка HIF-1α (Zundel et al., 2000; Semenza, 2010). Таким образом, одним из последствий многих ключевых генетических изменений в опухолевых клетках является повышение активности HIF.

Гипоксия, инициация развития опухолей, увеличение пролиферации клеток и их выживания. Гипоксия играет ключевую роль в процессе инициации опухолей, т.к. множество генов, в том числе протоонкогенов и опухолевых супрессоров, контролируются HIF (Semenza, 2010; Schödel et al., 2011; Watts и Walmsley, 2019). M. Koshiji и соавт. (2005) показали, что активация HIF-1α приводит к генетической нестабильности посредством ограничения репарации ошибочно спаренных нуклеотидов ДНК путем ингибирования экспрессии генов *MSH2 (MutS homolog 2)* и *MSH6 (MutS homolog 6)*. Установлено, что HIF также способствует активации протоонкогена *KRAS* (Zeng et al., 2010). В процессе развития опухолей важную роль играют стволовые опухолевые клетки, которые были обнаружены в гипоксических зонах ряда опухолей – рака пищевода, желудка, молочной железы, яичников и почек (Ayob и Ramasamy, 2018; Corrò и Moch, 2018; Muinao et al., 2018). Стволовые опухолевые клетки более устойчивы к химио- и радиотерапии, чем не стволовые (Ayob и Ramasamy, 2018). На экспериментальных моделях в системах *in vitro* и *in vivo* показано, что активация HIF поддерживает фенотип стволовых опухолевых клеток (Oliveira-Costa et al., 2011; Ayob и Ramasamy, 2018). HIF регулирует активность теломеразы TERT, факторов плюрипотентности (NANOG и OCT4 – Octamer-binding transcription factor 4), гликолитических ферментов глюкозо-6-фосфат-изомеразы (GPI, Glucose-6-Phosphate Isomerase) и фосфоглицератмутазы, блокирующих клеточное старение (Mathieu et al., 2011; Wicks и Semenza, 2022; Srivastava et al., 2023). При гипоксии происходит индукция ингибиторов апоптоза и подавление синтеза проапоптотических белков, нарушение процесса метилирования ДНК (Camuzi et al., 2019; Srivastava et al., 2023).

Опухолевые клетки, в отличие от неопухолевых, характеризуются увеличением скорости пролиферации и ингибированием апоптоза из-за повышенной продукции секретируемых факторов роста и антиапоптотических факторов, обеспечивающих выживаемость клеток. HIF-1α стимулирует синтез факторов роста, таких как TGF-β, инсулиноподобный фактор роста 2 (IGF2, Insulin-like Growth Factor 2), IL-6, 8, фактор ингибирования миграции макрофагов (MIF, Macrophage migration Inhibitory Factor) и рецепторов факторов роста, таких как рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), что приводит к непрерывной передаче сигналов пролиферации. В условиях гипоксии конститутивная активация сигнальных путей, контролирующих пролиферацию (например, RAS и PI3K) стабилизирует HIF-1α (Harris, 2002). В случае PI3K конститутивная активация может быть результатом появления мутаций в генах-супрессорах опухолей (например, *PTEN*), мутаций в генах самого комплекса PI3K или аберрантной передачи сигналов в рецепторных тирозинкиназах (Wong et al., 2010). Повышенный уровень PI3K стимулирует mTOR и синтез АТФ, что поддерживает пролиферацию клеток (Guertin и Sabatini, 2007).

Гипоксия и изменение метаболизма опухолевых клеток. В условиях нормоксии митохондрии поддерживают окислительное фосфорилирование на уровне, необходимом для продукции АТФ (аэробный метаболизм). Однако в условиях гипоксии метаболизм переключается на анаэробный гликолиз. В опухолевых клетках так же, как и в неопухолевых, активация HIF способствует адаптации к гипоксии, ангиогенезу и изменению метаболизма. Известно, что опухолевые клетки генерируют АТФ с помощью гликолиза даже в условиях нормального снабжения кислородом («эффект Варбурга»). HIF-1α играет существенную роль в процессе аэробного гликолиза для обеспечения энергетических потребностей опухолевых клеток (Semenza, 2010; Kobliakov, 2019; Vaupel et al., 2019; Belisario et al., 2020). HIF-1α регулирует экспрессию генов, кодирующих белки-переносчики глюкозы (*GLUT1, GLUT3*) и гликолитические ферменты (*ALDOA* – альдолаза А, *ENO1* – енолаза 1, *GAPDH* – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, *HK1*, *HK2* – гексокиназа 1 и 2, *PFKL* – фосфофруктокиназа L, *PGK1* – фосфоглицераткиназа 1, *PKM2* – пируваткиназа М2, *LDHA* – лактатдегидрогеназа А), которые превращают глюкозу в лактат (Semenza, 2010; Watts и Walmsley, 2019). Скорость аэробного гликолиза выше по сравнению митохондриальным окислительным фосфорилированием. Таким образом, HIF-1α за счет усиления поглощения глюкозы и увеличения активности гликолитических ферментов стимулирует в опухолевых клетках гликолиз – малоэффективный, но быстрый способ получения энергии.

Активация HIF и зависимых генов в пролиферирующих опухолевых клетках способствует не только изменениям метаболизма, но и формированию особого микроокружения. Критическим эффектом усиленного поглощения глюкозы и активации гликолиза опухолевыми клетками является ацидоз межклеточного пространства в тканях опухоли. Уменьшение pH межклеточного пространства стимулирует активность металло- и других протеиназ, которые разрушают межклеточный матрикс и нарушают способность клеток к взаимодействию. Изменения метаболизма, активация гликолиза и формирование кислой среды способствуют пролиферации клеток и прогрессии опухоли (Semenza, 2009). Показано, что повышение концентрации лактата во многих карциномах связано с увеличением риска метастазирования (Brizel et al., 2001).

Основными компонентами микроокружения опухоли являются кровеносные и лимфатические сосуды, фибробласты, иммунные клетки и ВКМ (Petrova et al., 2018). Опухоль-ассоциированные фибробласты (Cancer-Associated Fibroblasts, CAFs) являются одними из главных компонентов стромы, и могут составлять до 80% среди всех клеток опухоли. Опухолевые клетки в условиях гипоксии могут секретировать паракринные сигнальные молекулы, которые способствуют репрограммированию клеток-предшественников в CAFs (Gilkes et al., 2014), и HIF-1α регулирует некоторые из этих сигнальных молекул, такие как TGF-

β, bFGF (основной фактор роста фибробластов, basic Fibroblast Growth Factor) и PDGFB (тромбоцитарный фактор роста B, Platelet-Derived Growth Factor subunit B) и др. (Semenza, 2010).

По сравнению с окружающими опухоль неопухолевыми тканями pO_2 в ней значительно ниже (Brown и Wilson, 2004). Гипоксия обычно возникает в солидных опухолях на расстоянии примерно 100 мкм от функционального кровеносного сосуда (Helmlinger et al., 1997). По другим оценкам по мере увеличения размера опухоли более 400 мкм создается гипоксическая среда, особенно в центре, поскольку питательные вещества и O_2 могут диффундировать только в пределах радиуса 200 мкм (Grimes et al., 2014; Däster et al., 2017; Riffle и Hegde, 2017). Сообщается, что более 50% клеток солидных опухолей, преимущественно тех, которые расположены в центральных областях, лишены достаточного снабжения O_2; в то время как клетки, расположенные близко к периферии опухоли, оксигенируются в достаточной мере (Parks et al., 2013; Kumari et al., 2020). Гипоксические области обнаруживаются на разных стадиях роста опухоли, например, в злокачественных опухолях размером 1 мм (Denny, 2000). Кроме того, даже преинвазивные поражения могут содержать участки некрозов, в которых доступность O_2 недостаточна для поддержания жизнеспособности клеток (Thomlinson и Gray, 1955; Bos et al., 2001).

Поскольку органы и ткани человека в разной степени снабжаются кислородом, уровень гипоксии в опухолях может различаться в зависимости от их гистогенеза. Например, при саркомах мягких тканей pO_2 менее 22 мм рт. ст., тогда как в прогрессирующей плоскоклеточной карциноме головы и шеи показатель составляет менее 5 мм рт. ст. (Nordsmark et al., 1996). Опухоли с максимально низким значением pO_2 характеризуются высокой скоростью инвазии и метастазирования (Höckel и Vaupel, 2001; Harris, 2002). Показано, что у пациенток, страдающих раком шейки матки, с pO_2 в опухоли меньше 10 мм. рт. ст. (1% O_2) при хирургическом лечении или радиотерапии длительность жизни значительно ниже, чем у пациенток с более высокой степенью оксигенации опухолей (Höckel et al., 1996).

Распределение кислорода в опухолях крайне неоднородно: уровни гипоксии варьируют от легкой, почти негипоксической, до тяжелой и аноксической. Эта гетерогенность определяет кратковременные и долгосрочные реакции по мере развития опухоли и особенности взаимодействия между опухолевыми, стромальными и иммунными клетками в микроокружении (Bader et al., 2020). Несмотря на имеющиеся данные, точная оценка степени гипоксии в опухолях остается сложной задачей. Это связано с высокой вариабельностью pO_2 как между разными опухолями, так и внутри одной и той же опухоли, а также с различиями в используемых методах измерения (Ortiz-Prado et al., 2019; Wicks и Semenza, 2022).

Универсального порогового значения для определения гипоксии в опухолях не существует (Hompland et al., 2021). В настоящее время предлагается условное разделение опухоли на три

отдельные зоны: негипоксическую зону (40 < pO_2 < 160 мм рт. ст.), зону периодической гипоксии (OXOPHOS, Oxidative Phosphorylation) (10 < pO_2 < 40 мм рт. ст.) и зону тяжелой гипоксии (pO_2 < 10 мм рт. ст.) (McKeown, 2014; Rastogi et al., 2023). Опухолевые клетки, прилегающие к кровеносным сосудам, оксигенируются лучше, и в них выражен окислительный метаболизм, тогда как клетки, расположенные на расстоянии от кровеносных сосудов, оксигенированы недостаточно, и в них преобладает гликолиз (Semenza, 2008).

Исследования показали, что при снижении градиента кислорода в солидных опухолях от 40 мм рт. ст. pO_2 (5% O_2) в негипоксической зоне до 10 мм рт. ст. pO_2 (1% O_2) в зоне периодической гипоксии (OXOPHOS) PHD2 теряет свою активность, тогда как FIH-1 ингибируется только в условиях тяжелой гипоксии <10 мм рт. ст. pO_2 (1% O_2) (Dayan et al., 2006; Dayan et al., 2009). Таким образом, в негипоксической зоне, где функционируют PHD2 и FIH-1, HIF-1α разрушается и транскрипционно не активен. Напротив, в зоне OXOPHOS HIF-1α стабилизируется за счет инактивации PHD2, но остается транскрипционно неактивным в отношении зависимых генов из-за присутствия FIH-1. В зоне тяжелой гипоксии HIF-1α одновременно стабилен и транскрипционно активен благодаря инактивации как PHD2, так и FIH-1. По мере того, как концентрация O_2 снижается в зонах периодической гипоксии и тяжелой гипоксии во время развития опухоли, сначала HIF-1α стабилизируется вследствие инактивации PHD2 и постепенно становится транскрипционно активным за счет инактивации FIH-1. В таких случаях ангиогенез, гликолиз, синтез жирных кислот, миграция, метастазирование, выживание и пролиферация опухолевых клеток регулируются в негипоксических и периодически гипоксических зонах, что поддерживает прогрессию опухоли. Вероятно, на ранней стадии возникновения и прогрессии опухоли, когда достаточное напряжение кислорода ограничивает транскрипционную активность HIF-1α, другие механизмы могут быть ответственны за регуляцию выживания и пролиферации опухолевых клеток. Одним из таких механизмов может быть активация NF-κB, что будет обсуждаться ниже (раздел 1.5).

Гипоксия и ангиогенез. Прогрессия опухолевого роста, распространенность опухолевого процесса, инвазия и метастазирование зависят от интенсивности васкуляризации. В процессе развития и прогрессии опухолей из-за избыточной пролиферации клеток и недостаточного кровоснабжения возникает гипоксия, которая активирует ангиогенез, регулируемый HIF-зависимым фактором VEGF (Semenza, 2010; Lv et al., 2017; Manuelli et al., 2022). Кислородная недостаточность индуцирует нарушение баланса между продукцией проангиогенных и антиангиогенных факторов, что приводит к избыточному, быстрому и хаотичному формированию кровеносных сосудов со значительным увеличением их количества. Такие сосуды характеризуются тонкими стенками, разнообразием форм и размеров (Semenza, 2010; Carmeliet и Jain, 2011). HIF-1α контролирует экспрессию нескольких генов, кодирующих

ангиогенные факторы роста, включая VEGF, SDF1 (Stromal-Derived Factor 1), PGF (фактор роста плаценты), PDGFB, ангиопоэтин и др. (Semenza, 2010; Lv et al., 2017).

Гипоксия и метастазирование опухолей. Подавляющее большинство летальных исходов, связанных со злокачественными опухолями (около 90%), вызвано метастазированием, а не первичными опухолями (Lambert et al., 2017). HIF-1α регулирует процесс метастазирования опухолей, изменяя адгезию и подвижность опухолевых клеток и активируя процессы ЭМП (Wicks и Semenza, 2022). Индуцированный гипоксией ЭМП характеризуется уменьшением экспрессии генов, кодирующих белки, характерные для эпителия – E-кадгерин и β-катенин, и увеличением экспрессии генов, кодирующих белки мезенхимного фенотипа – N-кадгерин, виментин, α-SMA (α-Smooth Muscle Actin) и хемокиновый рецептор CXCR4 (C-X-C motif chemokine Receptor 4) (Kim et al., 2002; Hapke и Haake, 2020). HIF-1α активирует экспрессию генов *TGFA* и виментина (*VIM*), которые способствуют изменению структуры цитоскелета и приобретению опухолевыми клетками мезенхимного фенотипа, *TWIST* и протоонкогена *MET*, ответственных за миграцию и способность к инвазии, матриксных металлопротеиназ *MMP1*, *2* и *MMP9*, а также *LOX (Lysyl Oxidase)* (Yang et al., 2008; Hapke и Haake, 2020; Wicks и Semenza, 2022).

Роль HIF на разных этапах развития опухолей представлена на рис. 1.8.

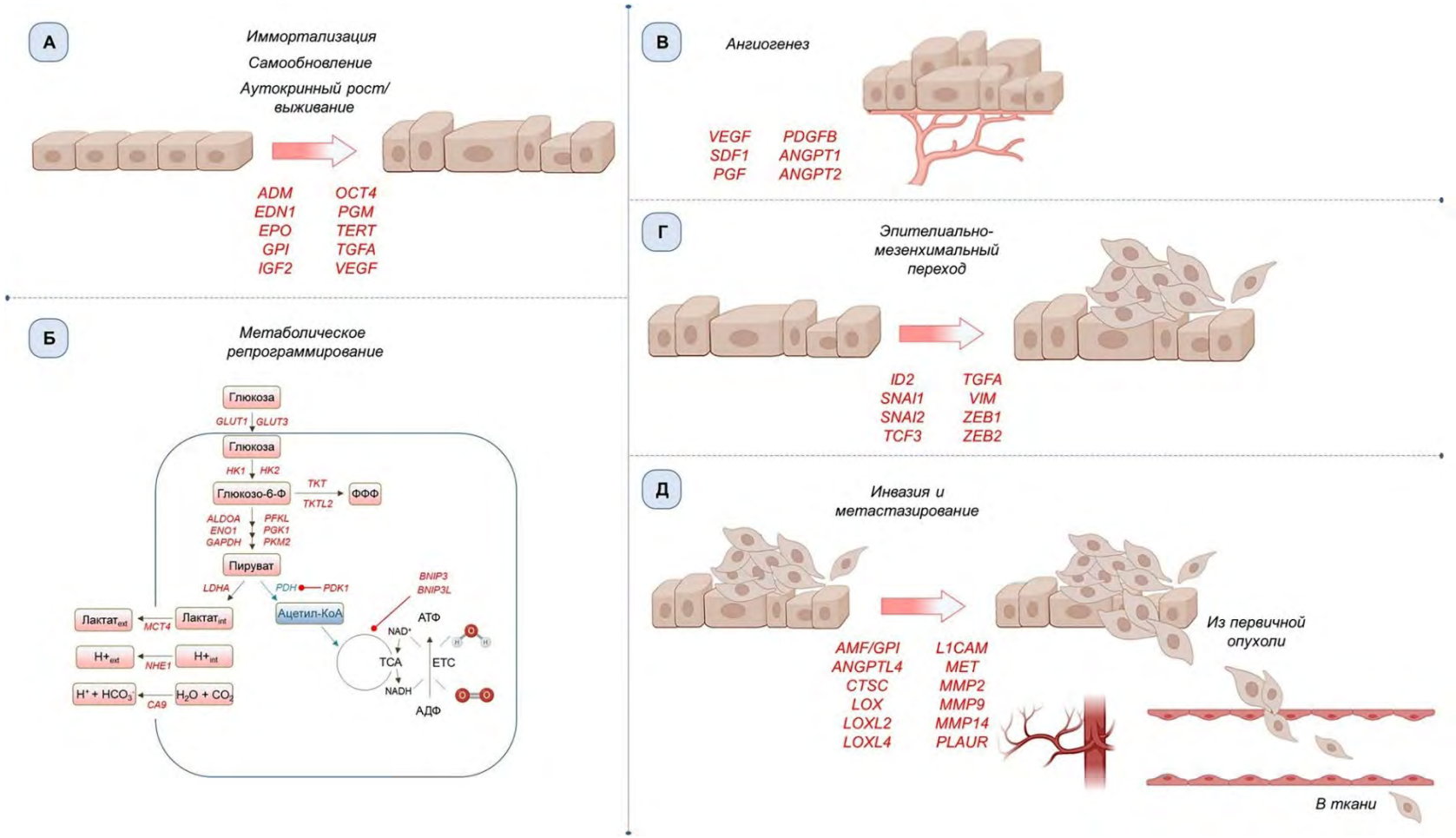


Рис. 1.8. Роль активации HIF и зависимых генов на разных этапах развития опухолей. Красным цветом выделены HIF-зависимые гены, кодирующие белки, которые принимают участие в ключевых этапах развития опухолей. А – гены, контролирующие иммортализацию, самообновление стволовых клеток, аутокринный рост и выживание; Б – гены, участвующие в метаболическом репрограммировании. Ферментативная активность пируватдегидрогеназы (Pyruvate Dehydrogenase, PDH) ингибируется HIF-зависимой PDH-киназой 1 (Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1, PDK1), что блокирует превращение пирувата в ацетил-КоА для участия в цикле трикарбоновых кислот (Tricarboxylic Acid, TCA); В – HIF активирует гены, способствующие ангиогенезу в опухоли; Г – гены, способствующие ЭМП; Д – гены, контролирующие инвазию и метастазирование в ткани

Таким образом, локальная гипоксия и активация HIF играют ключевую роль на всех этапах развития опухолей – инициации, промоции и прогрессии. Тем не менее, оценка степени гипоксии в опухоли представляет определенные трудности, поэтому для прогнозирования темпов прогрессии опухолей часто используют ИГХ выявление белков семейства HIF.

1.4.2. Роль гипоксии и HIF в прогрессии опухолей разной локализации и степени дифференцировки

Поддержание достаточного уровня O_2 в тканях является одной из самых важных задач существования организма, поскольку крайне сложно обеспечить точное и непрерывное снабжение кислородом каждой из примерно 30 трлн клеток взрослого организма для удовлетворения их метаболических потребностей в окислительном фосфорилировании и нескольких сотнях других биохимических реакций (Raymond и Segrè, 2006; Hatton et al., 2023). Значительно усложняет эту задачу то, что клетки по всему организму находятся в тканевых микроокружениях с совершенно разными уровнями кислорода: например, эпителиальные клетки дыхательных путей подвергаются воздействию 21% O_2, тогда как в тимусе мышей среднее зарегистрированное pO_2 составляло 7,6 мм рт. ст., что соответствует примерно 1% O_2 (Braun et al., 2001). Известно, что даже в физиологических условиях внутри одной ткани наблюдается кислородный градиент и существуют гипоксические области, что необходимо для нормального функционирования клеток. Например, в почках pO_2 варьирует от 70 мм рт. ст. во внешней части коркового вещества до 10 мм рт. ст. во внутренней части мозгового вещества (Vaupel et al., 2021). Таким образом, в физиологических условиях на уровне моря pO_2 варьирует в разных органах, зависит от типа ткани и выполняемых функций. Различия pO_2 определяют порог чувствительности органа к гипоксии (Ortiz-Prado et al., 2019; Chen и Gaber, 2021). На клеточном уровне гипоксия и связанные с ней молекулярные ответы происходят при pO_2 около 7-10 мм рт. ст. (примерно 1% O_2). Установлено, что жизненно важные органы различаются по чувствительности к гипоксии, что в итоге определяет устойчивость к недостатку O_2 всего организма (Leach и Treacher, 1998; Burtscher et al., 2012). Наиболее чувствительными к гипоксии являются филогенетически более молодые отделы головного мозга – кора больших полушарий и мозжечка (Zarubina, 2011). Кроме головного мозга высокочувствительными к гипоксии органами являются сердце, легкие, почки и печень (Leach и Treacher, 1998). По сравнению с другими органами головной мозг, сердце и печень в норме отличаются высоким потреблением O_2 и повышенным уровнем экспрессии мРНК и содержанием белка HIF-1α (Шустов и соавт., 2015; Kirova et al., 2013). К органам со средней чувствительностью к гипоксии относят поджелудочную железу и надпочечники, а к низкочувствительным – кости, хрящи, сухожилия и связки (Zarubina, 2011).

Выявлены различия в частоте возникновения злокачественных опухолей разных органов и тканей, в частности, пожизненный риск развития опухоли составляет 6,9% для легких, 1,08% для щитовидной железы, 0,6% для головного мозга, 0,003% для тазовых костей и 0,00072% для хряща гортани (Jaffe et al., 2010; Dubal et al., 2014). Одна из гипотез, объясняющая различия частоты развития опухолей в разных органах, основана на различиях в интенсивности делений стволовых клеток (Tomasetti и Vogelstein, 2015). Однако немаловажную роль в процессах канцерогенеза может играть гипоксия, которая способствует мутациям и гетерогенности клеточного состава опухолей (Grimes et al., 2020). Поэтому роль HIF в прогрессии опухолей во многом зависит от ее локализации и гистогенетического типа. Однако в литературе отсутствуют данные по взаимосвязи темпов развития опухоли и исходного кислородного статуса органа, в котором она образуется.

Тем не менее, повышенное содержание HIF-1α обнаружено в клетках практически всех опухолей человека, что основано на ИГХ исследовании биопсийного материала (Zhong et al., 1999; Talks et al., 2000). Содержание HIF-2α увеличено только в некоторых типах опухолей, таких как КРР, карцинома почки, немелкоклеточный рак легких, гемангиобластома мозжечка (Flamme et al., 1998; Krieg et al., 2000; Zhao et al., 2015; Davis et al., 2022). HIF-1α способствует прогрессии злокачественных опухолей молочной железы, и его ингибирование уменьшает метастазирование (Wong et al., 2012). Кроме того, повышенное содержание HIF-1α в карциномах толстой кишки, желудка, легких, кожи, яичника, поджелудочной и предстательной желез коррелирует с высокой пролиферативной активностью опухолевых клеток (Zhong et al., 1999). По данным ИГХ исследований, повышенное содержание HIF-1α в опухолевых клетках сочетается с высокой степенью злокачественности, неблагоприятным прогнозом и резистентностью к разным видам терапии опухолей различных локализаций – головы и шеи, молочной железы, яичника, пищевода и др. (Zhong et al., 1999; Talks et al., 2000; Semenza, 2010; Chen et al., 2012; Zheng et al., 2013; Takasaki et al., 2016; Shamis et al., 2021). Повышение экспрессии некоторых HIF-зависимых генов, в частности, *VEGF*, который является ключевым регулятором ангиогенеза, также является фактором неблагоприятного прогноза (Chen et al., 2015a).

По данным ряда исследований выявлена взаимосвязь высокой экспрессии гена *HIF1A* и содержания белка HIF-1α в тканях опухоли с тяжестью течения КРР. При этом у таких пациентов также отмечалось формирование резистентности опухоли к лечению, более частые рецидивы, неблагоприятный прогноз и низкая выживаемость (Schmitz et al., 2009; Ioannou et al., 2015; Wei et al., 2020). В то же время по данным H. Yoshimura и соавт. (2004) и D. Furlan и соавт. (2008) высокий уровень экспрессии гена *HIF1A* в опухолях не был связан с неблагоприятным прогнозом у пациентов с КРР.

В некоторых тканях стабилизация HIF-1α оказывает супрессорное действие на рост опухоли. В частности, показано, что ингибирование HIF-1α способствует пролиферации клеток карциномы почки (Shen et al., 2011). Кроме того, при раке яичника повышенное содержание HIF-1α коррелирует с интенсивностью апоптоза, а сочетание высокой гибели опухолевых клеток и высокой активности HIF-1α способствует выживаемости пациентов (Birner et al., 2001). Таким образом, эффект высокого содержания HIF-1α во многом зависит от локализации опухоли.

Установлено, что различные изоформы HIF, HIF-1α и HIF-2α, могут играть разную роль в прогрессии опухолей. На мышиной модели немелкоклеточного рака легких (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) показано, что ингибирование HIF-2α способствует пролиферации опухолевых клеток, а снижение активности HIF-1α не влияет на онкогенез (Mazumdar et al., 2010). При анализе выживаемости пациентов с NSCLC показано, что повышенное содержание HIF-2α статистически значимо связано с неблагоприятным прогнозом, а активность HIF-1α такого влияния не оказывает (Giatromanolaki et al., 2001). Однако при исследовании образцов папиллярной карциномы щитовидной железы было показано, что более высокая экспрессия гена *EPAS1*, кодирующего HIF-2α, в тканях опухоли положительно коррелирует с инфильтрацией цитотоксическими Т-лимфоцитами и отрицательно – с уровнем экспрессии гена *CD274*, что свидетельствует о противоопухолевой активности HIF-2α (Zhang et al., 2023в). Вероятно, эти противоречивые результаты обусловлены молекулярно-биологическими различиями гистогенетических типов опухолей, исследованных в этих работах, а также с их гетерогенным клеточным составом. Более того, как упоминалось выше, органы, как и организмы, различаются по устойчивости к гипоксии, что также влияет на результаты исследований роли HIF в онкогенезе.

Противоречивые данные о роли HIF и его субъединиц в прогрессии опухолей разных локализаций, вероятно, также обусловлены комплексом взаимодействий множества факторов, активации и супрессии тех или иных генов при развитии каждой конкретной опухоли. Поэтому необходимы дальнейшие исследования роли HIF в прогрессии опухолей различной локализации, степени дифференцировки и гистогенеза с учетом исходного кислородного статуса ткани.

1.4.3. Потенциальные возможности терапии опухолей, основанные на коррекции внутриопухолевой гипоксии

Учитывая ключевую роль гипоксии в прогрессии опухолей, в последние десятилетия интенсивно развивается направление по ее фармакологической коррекции. С этой целью используются лекарственные средства, направленные на ингибирование HIF несколькими путями – через уменьшение экспрессии гена, синтеза белка, димеризации HIF-α- и HIF-β-субъединиц, увеличение деградации HIF-α и активности пролилгидроксилаз, уменьшение

связывания димера HIF-α/β с ДНК и др. (Fallah и Rini, 2019; Semenza, 2019; Luo et al., 2022; Qannita et al., 2024). Существует две основные категории ингибиторов HIF: прямые, влияющие на экспрессию или функционирование молекул HIF, и непрямые, регулирующие другие молекулы, которые опосредованно влияют на HIF. Многие из потенциальных ингибиторов HIF в настоящее время проходят клинические испытания, однако их эффективность остается низкой (Новиков и Левченкова, 2024; Fallah и Rini, 2019; Rani et al., 2022; Qannita et al., 2024). Как отмечают R.A. Qannita и соавт. (2024), неудачи клинических испытаний ингибиторов HIF во многом являются результатом недостаточно адекватного отбора пациентов. Для оценки эффективности ингибиторов HIF пациентов включают в клинические исследования независимо от исходного уровня его активности в опухолях. Однако внедрение ингибиторов HIF в клиническую практику требует персонализированного подхода. Отбор пациентов на основе исходного уровня HIF позволит исключить из терапии пациентов с низким уровнем HIF, у которых данная терапия, вероятно, будет неэффективной. У пациентов с высоким уровнем HIF лечение может показать наилучшие результаты, что требует подтверждения в целевых клинических испытаниях, основанных на принципах персонализированной медицины (Qannita et al., 2024).

Активация HIF играет решающую роль в способности опухолевых клеток многих типов, включая рак печени, молочной железы и КРР уклоняться от клеток иммунной системы и формировать иммуносупрессивное TME (Srivastava et al., 2023). В экспериментах на мышах показано, что низкомолекулярные ингибиторы HIF-1α и HIF-2α значительно улучшают ответ на ингибиторы иммунных контрольных точек (антитела анти-CTLA4 (Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4), анти-PD-1 (Programmed cell death-1) или анти-PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1)) (Bailey et al., 2022; Salman et al., 2022). Такие ингибиторы хорошо переносятся экспериментальными животными без каких-либо изменений в их внешнем виде, поведении или массе тела, что позволяет предположить, что существует терапевтическое окно для ингибирования HIF, однако необходимо проведение дальнейших исследований (Semenza, 2024).

Несмотря на разработку ингибиторов HIF, напротив, в нескольких исследованиях показана корреляция между высокой активностью PHD или FIH и низкой выживаемостью при некоторых типах опухолей (Couvelard et al., 2008; Gossage et al., 2010; Andersen et al., 2011). Точный механизм такой взаимосвязи не изучен. Показано, что FIH способствует пролиферации и выживанию клеток рака легких, воздействуя на клеточный цикл, и его ингибирование предлагается в качестве подхода к терапии (García-Del Río et al., 2023).

Следует отметить, что стратегия использования ингибиторов HIF-1α в онкологии может оказать неблагоприятное воздействие на течение сопутствующих заболеваний, при которых, напротив, необходима высокая активность HIF-1α – ишемии, анемии и др. (Новиков и

Левченкова, 2024). В частности, при ишемической болезни сердца и ишемическом инсульте HIF-1-зависимое повышение синтеза VEGF индуцирует образование новых кровеносных сосудов в области ишемии, усиливает кровоток и снабжение кислородом, тем самым уменьшая ишемию (Sen Banerjee et al., 2012). При лечении анемии, связанной с хроническим гломерулонефритом, необходимо повышение активности HIF-1α и HIF-2α для увеличения синтеза эритропоэтина (Souza et al., 2020). С этой целью используют многочисленные ингибиторы PHD. Кроме того, активация HIF-α рассматривается как подход к увеличению продолжительности жизни (Nisar et al., 2025). На экспериментальных моделях показано, что повышение активности HIF-1α способствует уменьшению тяжести течения ВЗК (Cummins et al., 2008). Однако очевидно, что активация HIF ингибиторами PHD может способствовать пролиферации, инвазии и метастазированию клеток, уже подвергшихся злокачественной трансформации. Стабилизация HIF, вызванная ингибиторами PHD, имеет плейотропные эффекты (влияние на ангиогенез, метаболические изменения и выживаемость клеток), что может привести к нежелательным побочным эффектам. Наиболее распространенной проблемой остается сердечно-сосудистый риск, который связан со скоростью увеличения содержания гемоглобина и повышенным риском тромбозов. Также одной из существенных проблем ингибиторов PHD является воздействие на опухоль, поскольку активация HIF в гипоксических условиях помогает уже существующей опухоли выживать и продолжать рост (Мельник, 2018; Waldum, 2023). Одним из потенциальных долгосрочных последствий ингибирования PHD является повышенный риск развития мелкоклеточного рака почек. Этот эффект опосредован активацией HIF и избыточной стимуляцией клеток эритропоэтином (Waldum, 2023). Пациентов следует обследовать и наблюдать с помощью соответствующих методов визуализации до и после введения ингибиторов PHD и не реже одного раза в год после введения (Шутов и соавт., 2022; Новиков и Левченкова, 2024; Lee et al., 2021; Li et al., 2023a). Для подтверждения безопасности и эффективности ингибиторов PHD необходимы дополнительные исследования и проведение долгосрочных клинических испытаний (Hirota, 2021; Nisar et al., 2025).

Противоопухолевые химиотерапевтические препараты при внутривенном введении оказывают не только локальный эффект (на опухолевые клетки), но и системное действие, что может снижать эффективность лечения и вызывать нежелательные побочные эффекты. Эффективность лекарственных средств может быть неодинаковой у организмов с разной устойчивостью к гипоксии. В частности, эффект терапии антигипоксантами более выражен у НУ животных (Каркищенко, 2017). Однако терапевтический эффект противоопухолевых лекарственных средств в зависимости от исходной устойчивости организма к гипоксии и уровня активации HIF не исследован.

Одним из перспективных подходов к лечению опухолей с выраженной гипоксией стало использование молекул с повышенной токсичностью селективно для гипоксических клеток (Mathur et al., 2024). Пролекарства, активируемые гипоксией (Hypoxia-Activated Prodrugs, HAP) – это агенты, селективно активирующиеся в условиях недостатка кислорода. Их действие направлено на уничтожение опухолевых клеток, находящихся в условиях гипоксии, которые устойчивы к традиционным методам терапии. HAP вводятся в неактивной форме и в условиях гипоксии подвергаются ферментативному восстановлению оксидоредуктазами с образованием биологически активных соединений (Fu et al., 2021; Khakina et al., 2025). Эвофосфамид (TH-302) показал высокую эффективность на этапе доклинических исследований, но она не подтвердилась при оценке в клинических испытаниях III фазы, что, возможно, связано с тем, что не учитывался уровень внутриопухолевой гипоксии (Spiegelberg et al., 2019; Li et al., 2021). L. Spiegelberg и соавт. (2019) отмечают необходимость ранжирования пациентов по степени внутриопухолевой гипоксии, включенных в клинические исследования III фазы (Spiegelberg et al., 2019). Кроме того, эффективность пролекарств, действующих на опухолевые клетки, находящиеся в условиях гипоксии, может зависеть не только от степени локальной гипоксии в опухоли, но и от индивидуальной устойчивости к недостатку кислорода всего организма.

В настоящее время оценку pO_2 в опухолях проводят главным образом с исследовательской целью, и для этого существуют несколько методов. Измерение pO_2 с помощью электрода, введенного в опухоль, было широко использовано для определения степени оксигенации солидных опухолей. Эта процедура инвазивная, что затрудняет выполнение повторных измерений. Кроме того, опухоли гетерогенны по степени гипоксии, а для работы с электродами требуется квалифицированный персонал (Milosevic et al., 2004).

Таким образом, разрабатываются подходы к коррекции внутриопухолевой гипоксии, в том числе путем фармакологического ингибирования изоформ HIF. Тем не менее, в настоящее время потенциальные лекарственные средства показывают достаточно низкую эффективность, вероятно, во многом из-за того, что не учитывается индивидуальная устойчивость к гипоксии. Кроме того, стратегия использования ингибиторов HIF-1α для терапии опухолей может оказать неблагоприятное воздействие на течение сопутствующих заболеваний, при которых, напротив, необходима высокая активность HIF-1α – ишемии, анемии и др.

1.4.4. Структура заболеваемости злокачественными опухолями у населения, проживающего в высокогорных районах

Считается, что гипоксия нарушает физиологические функции и ограничивает работоспособность, однако существуют данные о том, что воздействие хронической (гипобарической) гипоксии при некоторых заболеваниях может быть полезно (Nisar et al., 2025).

Например, некоторые исследования свидетельствуют о том, что у жителей высокогорья снижается уровень заболеваемости злокачественными опухолями (Thiersch et al., 2017; Thiersch и Swenson, 2018). Необходимы дальнейшие исследования, чтобы выявить конкретные эффекты гипоксии, например, определить, различаются ли риски развития злокачественных опухолей у населения, проживающего в условиях высокогорья в течение нескольких поколений, и у тех, кто переехал на уровень моря (Calderón-Gerstein и Torres-Samaniego, 2021; Yu et al., 2022).

Возникновение большинства опухолей связано с влиянием факторов окружающей среды и зависит от генетических особенностей организма (Milne et al., 2009). Установлено, что развитие 95% опухолей связано с взаимодействием факторов внешней среды и генов, и 5% – только генами (Perera, 1997). Генетические факторы, влияющие на предрасположенность к развитию опухолей, включают редкие доминантные мутации, а также более распространенные генетические полиморфизмы, которые определяют индивидуальную реакцию на воздействие окружающей среды (Perera, 1997). В частности, вариабельность в уровнях экспрессии или изоформах различных генов метаболизма, кодирующих цитохром P450, глутатион S-трансферазу (Glutathione S Transferase, GST) и N-ацетилтрансферазу (N-acetyltransferase, NAT), а также HIF-1α значительно влияет на индивидуальную реакцию на канцерогены. Показано, что люди отличаются индивидуальной вариабельностью уровней экспрессии *HIF1A* и HIF-зависимых генов в лейкоцитах (Brooks et al., 2009; van Patot и Gassmann, 2011). У людей выявлено наличие полиморфизмов гена *HIF1A*, обеспечивающих высокий уровень его экспрессии. Один из наиболее исследованных полиморфизмов гена *HIF1A* – 1772 C>T (rs11549465 C>T, Pro582Ser). По сравнению с диким типом этот полиморфный вариант определяет увеличение транскрипционной активности HIF-1α как в нормоксических, так и в гипоксических условиях (Li et al., 2013). Показано, что полиморфизм *HIF1A* rs11549465 C>T связан с увеличением риска развития опухолей (Gladek et al., 2017; Li et al., 2019). Согласно литературным данным, наличие полиморфизма A588T (rs11549467) в гене *HIF1A* у пациентов с КРР коррелирует с локализацией опухоли в прямой кишке, а также с ее б***о***льшим размером (Knechtel et al., 2010). Также показано, что наличие полиморфизмов c.1084C>T (p.L362L) и c.1121T>G (p.F374C) в гене *EPAS1,* кодирующем HIF-2α, при КРР взаимосвязано с б***о***льшим размером опухолей, быстрыми темпами прогрессии и более высокой частотой осложнений в виде перфорации толстой кишки (Islam et al., 2021).

Системная гипоксия оказывает влияние на частоту развития некоторых видов злокачественных опухолей. Известно, что частота развития опухолей различных гистогенетических типов варьирует в зависимости от высоты проживания над уровнем моря. Хотя общая смертность от злокачественных опухолей отрицательно коррелирует с увеличением высоты, в зависимости от гистогенеза опухоли выявляется ряд особенностей (Amsel et al., 1982;

Weinberg et al., 1987; Hart, 2013; Simeonov и Himmelstein, 2015). В то время как при лимфоме, раке молочной железы, пищевода, языка и полости рта показано снижение смертности в высокогорье, смертность от рака печени и шейки матки не различалась у людей, живущих на уровне моря и в высокогорье (Amsel et al., 1982; Weinberg et al., 1987). Выявлено наличие обратной связи между уровнем заболеваемости и смертности от рака легких и высотой (Simeonov и Himmelstein, 2015). Заболеваемость и смертность от меланомы увеличивается на высоте из-за большего воздействия ультрафиолета (Aceituno-Madera et al., 2011). Кроме того, заболеваемость опухолью каротидного тела, параганглиомой, увеличивается в высокогорье (Astrom et al., 2003; Kumar et al., 2024). 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 Tugasworo, 2019). Высота считается очень важным фактором среды при развитии рака желудка (Zhao et al., 2017). В высокогорных провинциях Эквадора смертность от рака желудка наиболее высокая (Torres et al., 2013; Zhao et al., 2017; Garrido и Garrido, 2018; Barrera et al., 2022). Высокая частота встречаемости рака желудка наблюдается в высокогорных районах Испании, Ирана, Китая и в Южной Америке, а КРР – в Эквадоре (Torres et al., 2013; Zhao et al., 2017; Garrido и Garrido, 2018). Следует отметить, что кроме условий высокогорья на развитие рака желудка существенное влияние оказывает ряд других факторов – например, особенности питания и низкое содержание селена в почве, воздействие ультрафиолета и др. (Kabuto et al., 1994).

Снижение доступности кислорода – главный фактор окружающей среды на высоте, который вносит основной вклад в снижение смертности от злокачественных новообразований среди населения высокогорья. Данные о том, что в условиях высокогорья в зависимости от pO_2 смертность от рака снижена, на первый взгляд, противоречат здравому смыслу, поскольку внутриопухолевая гипоксия сама по себе является фактором для роста опухоли и формированием ее более агрессивного фенотипа (Höckel и Vaupel, 2001; Harris, 2002). Следует отметить, что на высоте в связи с адаптацией организма включаются механизмы коррекции гипоксии, происходит активация HIF и увеличивается содержание гемоглобина в крови (Höckel и Vaupel, 2001; Harris, 2002). Вероятно, снижение заболеваемости и смертности от разных типов злокачественных опухолей у людей, проживающих в высокогорье, может быть связано с их адаптацией. К популяциям, проживающим на высотах свыше 3500 м, относят тибетские, андские и эфиопские популяции в Центральной Азии, Южной Америке и Восточной Африке, соответственно. Они различаются по стратегии адаптации к условиям гипоксии (Moore, 2017; Pamenter et al., 2020). В частности, у жителей Анд уменьшено насыщение крови кислородом, но увеличен уровень гемоглобина по сравнению с жителями Тибета и Эфиопии (Beall, 2006). По сравнению с людьми, проживающими на уровне моря, люди, проживающие на высотах более 2500 м над уровнем моря, в целом адаптированы к условиям гипоксии, но и они характеризуются индивидуальными

физиологическими различиями в ответ на недостаток кислорода. В частности, выявлены половые и индивидуальные различия гемодинамики и уровня гемоглобина при адаптации к высоте у популяции, проживающей в Непале (высота 3570 м) (Nishimura et al., 2022). Такие различия во многом обусловлены вариациями экспрессии генов, отвечающих за адаптацию к гипоксии (Pamenter et al., 2020). Кроме того, важную роль в ответе на гипоксию играют эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов (Tsai и Wu, 2014; Batie et al., 2019; Chen et al., 2020б).

Таким образом, кислородная недостаточность и активация HIF являются патогенетическими факторами развития опухолей и играют ключевую роль на всех стадиях их развития. Активация HIF в процессе развития и прогрессии опухолей стимулирует ангиогенез, способствует изменениям метаболизма клеток, адгезии, способности к инвазии и метастазированию. Различные изоформы HIF – HIF-1, HIF-2 и HIF-3 – могут играть противоположную роль в опухолевом процессе. Организмы человека и лабораторных животных отличаются как по устойчивости к гипоксии, так и по активности изоформ HIF и его зависимых генов, что может обусловливать предрасположенность к развитию определенных онкологических заболеваний. Частота развития опухолей различных типов варьирует у людей, проживающих в высокогорье и на уровне моря. Необходимы дальнейшие исследования роли гипоксии в формировании опухолей с учетом индивидуальной устойчивости к недостатку O_2.

1.5. Взаимосвязь воспаления и гипоксии при развитии опухолей

Эволюция иммунной системы в комплекс сложных адаптируемых защитных механизмов происходила на протяжении 400 млн лет (Coventry et al., 2015). Участие и важность воспалительных и иммунных процессов в развитии опухолей неоспорима, однако O_2, появившийся в атмосфере Земли гораздо раньше, примерно 2,0-2,5 млрд лет назад, играет жизненно важную роль в метаболизме эукариотических клеток как конечный акцептор электронов в митохондриальной ЭТЦ, которая ответственна за синтез АТФ (Raymond и Segrè, 2006; Lyons et al., 2014). Поэтому ключевую роль гипоксии во всех процессах в организме, в том числе в развитии опухолей, сложно переоценить. Гипоксия, также как и воспаление, фигурирует в ключевых характеристиках опухолевых клеток (Hanahan и Weinberg, 2011).

Воспаление связано с высокой потребностью иммунных клеток в энергии и, следовательно, в O_2, а также с повреждением сосудов, и может привести к тканевой гипоксии (Campbell et al., 2014; Buck et al., 2017; Colgan et al., 2020). Помимо повреждения клеток и продукции АФК, одним из решающих факторов активации врожденной и адаптивной иммунной систем является уровень O_2 в клетках и окружающей среде (Taylor и Scholz, 2022). Изменения pO_2 в различных тканях влияют на иммунные клетки (Zenewicz, 2017). Лимфоидные органы находятся в условиях физиологической гипоксии, что играет ключевую роль в их нормальном функционировании, поскольку способствует рециркуляции гемопоэтических клеток и регуляции продукции антител светлыми центрами лимфоидных узелков селезенки, модулируя таким образом как врожденные, так и адаптивные иммунные реакции (Simsek et al., 2010; Cho et al., 2016).

HIF-1α регулирует функционирование и метаболизм клеток как врожденного, так и адаптивного иммунитета (Colgan et al., 2020; McGettrick и O'Neill, 2020; Taylor и Scholz, 2022). В то время как физиологическая гипоксия важна для нормального функционирования клеток иммунной системы, хроническая гипоксия, например, возникающая при высокогорных заболеваниях, легочной гипертензии, ишемии и злокачественных опухолях, может приводить к иммуносупрессии (Mo et al., 2021; Arnaiz и Harris, 2022; Xie et al., 2023). Установлен высокий риск развития злокачественных опухолей у пациентов с гипоксией, обусловленной хронической сердечной недостаточностью, хронической обструктивной болезнью легких, анемией и др. (Park et al., 2020; Roderburg et al., 2021; Boennelykke et al., 2022; Jaiswal et al., 2023). Пациенты с хронической гипоксией вследствие хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) подвержены высокому риску рака легких независимо от статуса курения (Park et al., 2020). Кроме того, онкологические пациенты с анемией или ХОБЛ, как правило, имеют неблагоприятный прогноз вследствие развития хронической гипоксии (Höckel et al., 1996; Varlotto и Stevenson, 2005; Xu et al., 2022). Активация HIF-1α является ключевым механизмом, связывающим хроническое воспаление и гипоксию при ХОБЛ с последующим развитием рака легких (Xu et al.,

2022). Клеточные и молекулярно-биологические механизмы возникновения опухолей и их прогрессии на фоне хронической гипоксии недостаточно изучены, однако ключевую роль играют NF-κB и HIF, активация которых приводит к синтезу провоспалительных цитокинов, окислительному стрессу, ангиогенезу и опухолевому росту (Hunyor и Cook, 2018).

NF-κB непосредственно влияет на активацию HIF-1α, как в условиях нормоксии и гипоксии, так и в ответ на воспалительные стимулы, а также контролирует уровни экспрессии гена и содержание белка HIF-1β (Rius et al., 2008; van Uden et al., 2008; van Uden et al., 2011). В проксимальной части промотера гена *HIF1A*, на -197/-188 парах оснований, содержится консервативный активный NF-κB-связывающий сайт, что свидетельствует о том, что связь между этими двумя путями широко распространена среди различных видов организмов (Belaiba et al., 2007; Rius et al., 2008; van Uden et al., 2008). Кроме индукции через NF-κB-зависимый путь, при воспалении функциональная активация HIF-1α осуществляется провоспалительными цитокинами – IL-1β и TNF-α, а также другими факторами – АФК, NO и PI3K (Hellwig-Bürgel et al., 1999). Увеличение продукции АФК при воспалении приводит к ингибированию PHD и активации HIF-1α (Tannahill et al., 2013; Hirota, 2015).

Следует отметить, что условия, при которых индуцируется HIF-1α (гипоксия или воспаление) влияют на результат его активации. При активации HIF-1α в ответ на гипоксию усиливается транскрипция различных зависимых генов, позволяющих адаптироваться к недостатку кислорода. При индукции через NF-κB-зависимый путь преимущественно активируются гены провоспалительных цитокинов (Jantsch et al., 2011).

В свою очередь, гипоксия активирует NF-κB-зависимую транскрипцию генов и увеличивает чувствительность этого пути к провоспалительным стимулам, таким как цитокины, путем уменьшения гидроксилирования ключевых регуляторов NF-κB – IKK (Cummins et al., 2006). Как IKKα, так и IKKβ содержат в своих киназных доменах эволюционно консервативный консенсусный мотив, который гидроксилируется PHD. Таким образом, одни и те же гидроксилазы, которые регулируют чувствительный к кислороду путь и способствуют убиквитин-зависимому разрушению HIF-1α, контролируют активность киназного комплекса, отвечающего за регуляцию NF-κB, и играют определяющую роль в его реакции на гипоксию (Cummins et al., 2006; Eltzschig и Carmeliet, 2011). При нормоксии IKKβ, по-видимому, гидроксилируется PHD1 и PHD2, что приводит к супрессии его ферментативной активности и подавлению NF-κB. При гипоксии гидроксилирование IKKβ пролилгидроксилазами подавляется, что вызывает активацию NF-κB и экспрессию провоспалительных и антиапоптотических генов (Cummins et al., 2006; Rius et al., 2008). Таким образом, при недостатке кислорода происходит гидроксилазное ингибирование компонентов NF-κB пути, которое может

приводить к его активации и представляет собой критическую точку взаимосвязи между гипоксией и воспалением (Cummins et al., 2006).

Роль HIF в активации NF-κB изучена недостаточно. Показано, что HIF-1α может ограничивать транскрипционную активность NF-κB *in vitro* и *in vivo* в условиях воспаления (Bandarra et al., 2015). С использованием опухолевых клеточных линий млекопитающих установлено, что в отсутствие HIF-1α активность NF-κB повышена. Обнаружено существование эволюционно консервативного механизма отрицательной обратной связи, посредством которой HIF может регулировать NF-κB через IKK- и CDK6 (Cell Division Protein Kinase 6)-зависимые способы (Bandarra et al., 2015). Эти результаты свидетельствуют в пользу того, что активация HIF может оказывать также и противовоспалительный эффект. В таком случае, HIF является одним из компонентов отрицательной обратной связи, которая важна для ограничения активности NF-κB (Bandarra et al., 2015). По-видимому, HIF-1α может быть как провоспалительным, так и противовоспалительным фактором в зависимости от условий.

В настоящее время представления о развитии злокачественных опухолей расширены от подхода, ориентированного на опухолевые клетки, к более всеобъемлющей концепции, которая предполагает сосуществование опухолевых клеток и клеток микроокружения (TME). Аберрантный метаболизм опухолевых клеток не только создает гипоксическую среду внутри TME, но и модулирует сигнальные пути в микроокружении опухоли путем продукции различных метаболитов, таких как лактат, АФК, АТФ и др. (Zhang et al., 2024б).

Как уже упоминалось, опухоли делят на три зоны по степени оксигенации (Rastogi et al., 2023). На ранней стадии образования опухолей, когда клетки находятся вблизи кровеносных сосудов и достаточно оксигенированы, белок HIF-1α разрушается в протеасоме. В этих условиях выживание и пролиферация опухолевых клеток преимущественно регулируются NF-κB (рис. 1.9) (Barcellos-Hoff et al., 2013).

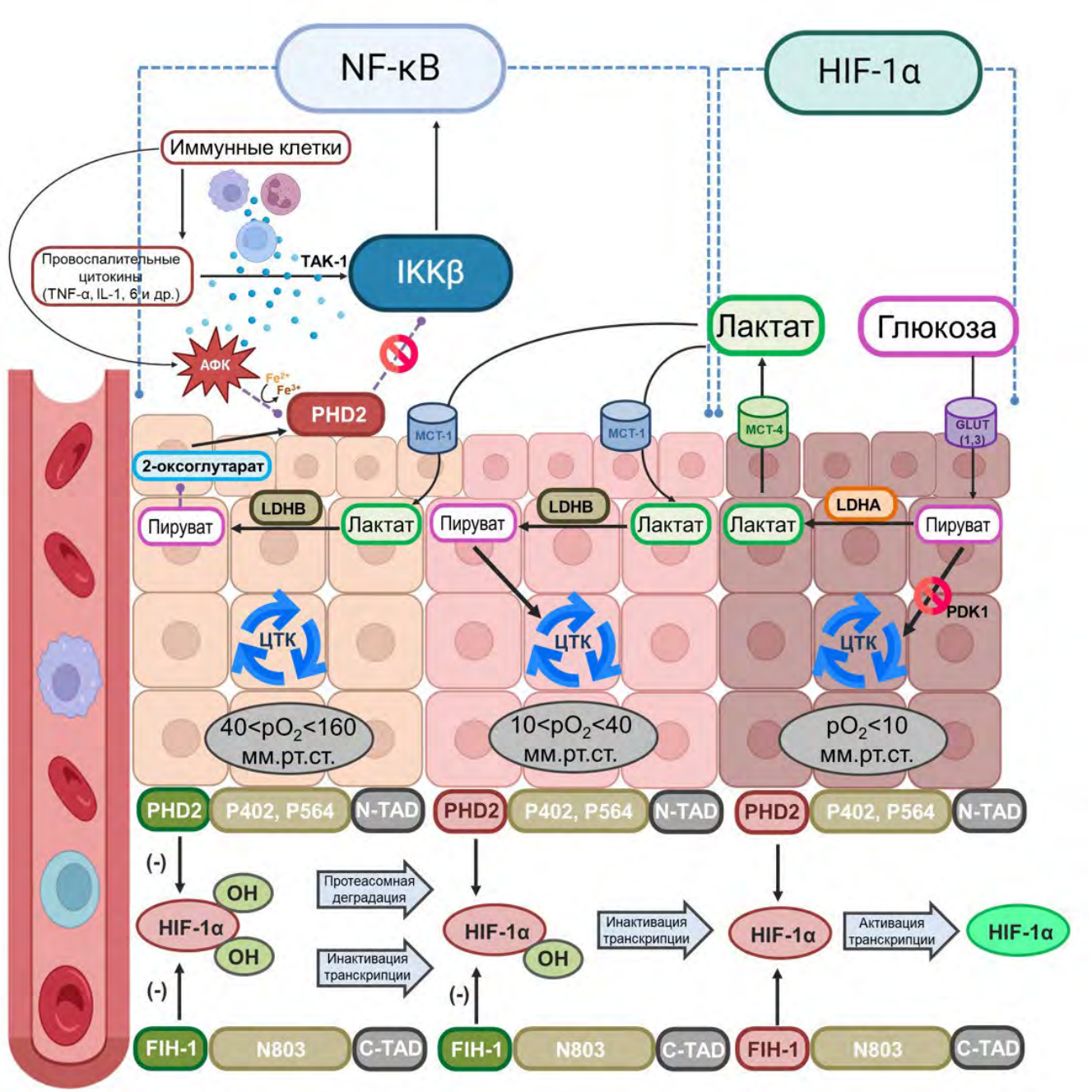


Рис. 1.9. Активация NF-κB и HIF-1α при развитии опухоли. В зонах с достаточным pO_2 активируется преимущественно NF-κB, а в зонах гипоксии – HIF-1α (по S. Rastogi и соавт., 2023, в модификации). ЦТК – цикл трикарбоновых кислот; P402, P564 – остатки пролина; N803 – остаток аспарагина; C-TAD – C-terminal Transcriptional Activity Domain – С-концевой домен транскрипционной активности HIF-1α; N-TAD – N-terminal Transcriptional Activity Domain – N-концевой домен транскрипционной активности HIF-1α; PDK1 – Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1; TAK-1 – Transforming growth factor-β-Activated Kinase-1

Из-за ингибирования PHD2 промежуточными продуктами цикла Кребса и АФК возможна негипоксическая стабилизация HIF-1α и NF-κB, но присутствие FIH блокирует транскрипционную активность HIF-1α в отношении зависимых генов, в то время как NF-κB активируется. NF-κB индуцирует трансформацию нормальных клеток в опухолевые путем ингибирования апоптоза и усиления продукции АФК, которые вызывают повреждения клеток и

способствуют онкогенезу (Ledoux и Perkins, 2014; Kiraly et al., 2015). Таким образом, предполагается, что на начальном этапе развития опухолей пролиферация клеток преимущественно зависит от NF-κB. До тех пор, пока pO_2 не станет настолько низким, что ингибируется активность FIH, NF-κB регулирует рост и пролиферацию опухолевых клеток (Rastogi et al., 2023).

NF-κB и HIF-1α при развитии опухолей способствуют активации одних и тех же генов-мишеней, регулирующих воспаление, аутофагию, клеточный цикл, апоптоз, изменения метаболизма, ангиогенез, инвазию, миграцию и метастазирование, поэтому их регуляторные механизмы сходны (рис. 1.10) (Rocha, 2007; Park и Hong, 2016; Rastogi et al., 2023). Таким образом, процессы гипоксии, воспаления и онкогенеза непосредственно взаимосвязаны.

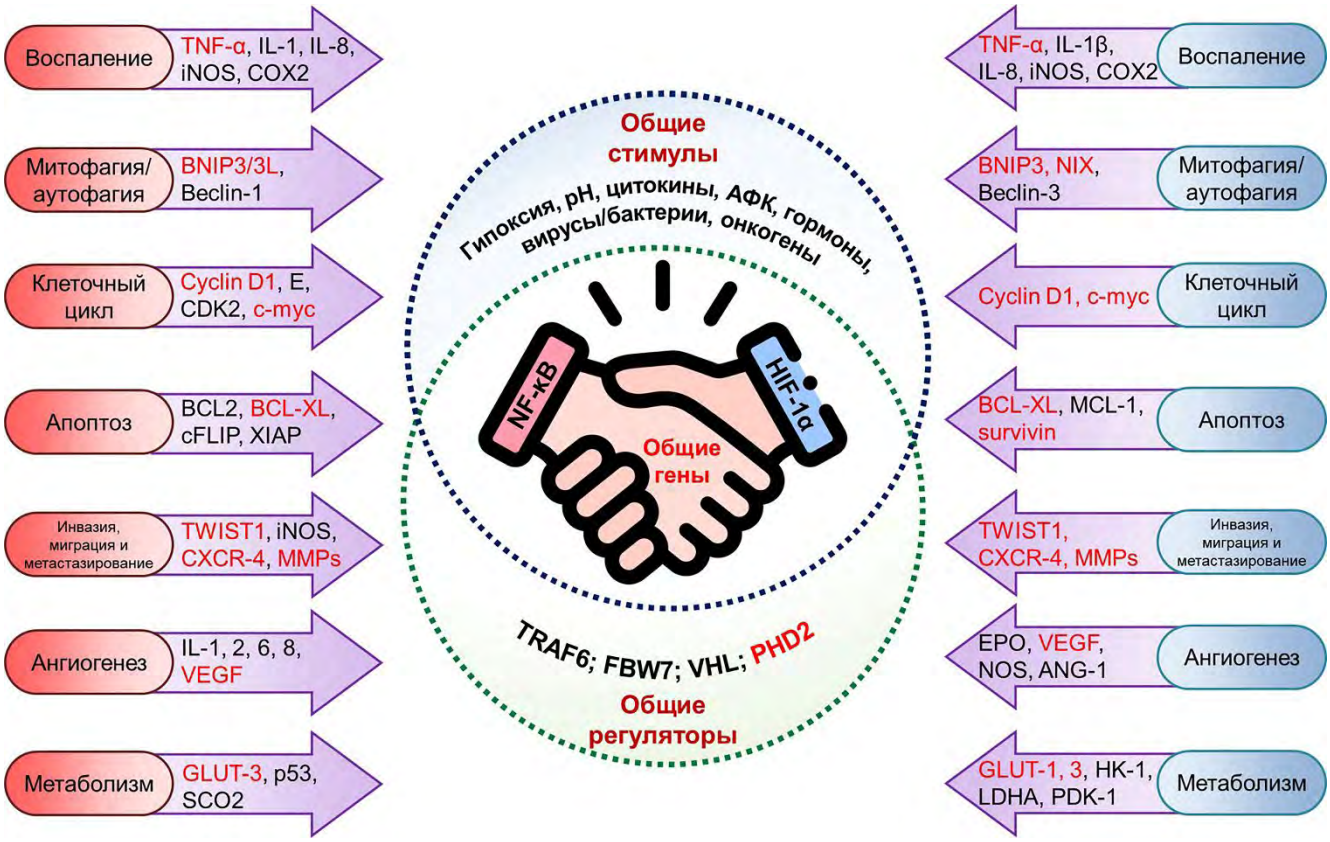


Рис. 1.10. NF-κB (слева) и HIF-1α (справа) при развитии опухолей способствуют активации одних и тех же генов-мишеней, регулирующих воспаление, аутофагию, клеточный цикл, апоптоз, изменения метаболизма, ангиогенез, инвазию, миграцию и метастазирование (по S. Rastogi и соавт., 2023, в модификации)

Разрабатываются новые терапевтические стратегии, избирательно воздействующие на HIF и NF-κB. Для активации как HIF-1α, так и NF-κB необходимо ингибирование PHD2, поэтому регуляция ее активности может представлять собой новый подход к терапии опухолей (D'Ignazio et al., 2017; Rastogi et al., 2023). Активность пролилгидроксилазы PHD2 можно напрямую регулировать различными низкомолекулярными веществами (Rastogi et al., 2023). Учитывая тесное перекрестное взаимодействие HIF и NF-κB, возможно, что некоторые из используемых

терапевтических средств могут оказывать действие на оба фактора транскрипции. Ингибирование PHD может стабилизировать HIF-α, но также активировать и другие пути, такие как NF-κB (D'Ignazio и Rocha, 2016).

Возможность прямого воздействия на NF-κB для терапии злокачественных опухолей активно изучается. С одной стороны, уменьшение воспаления представляется адекватной мишенью для терапии злокачественных опухолей (Munn, 2017). С другой стороны, из-за множества ключевых функций NF-κB во врожденных и адаптивных иммунных реакциях, использование его ингибиторов не рекомендуется для лечения злокачественных новообразований, особенно в фазе элиминации опухоли, когда иммунные клетки осуществляют эффективный противоопухолевый ответ (D'Ignazio et al., 2017).

Таким образом, в настоящее время общепризнано, что на всех этапах развития опухолей важную роль играет локальная активация транскрипционных факторов, регулирующих ответ на гипоксию и воспаление, и зависимых от них генов. Однако на системном уровне индивидуальная исходная устойчивость к недостатку кислорода и взаимосвязанные с ней особенности течения воспаления до сих пор не рассматриваются в качестве фактора, влияющего на процессы инициации и прогрессии опухолей.

Заключение к обзору литературы

Известно, что организмы человека и лабораторных животных отличаются по устойчивости к гипоксии, что сочетается с различиями в уровнях экспрессии и содержании белка HIF-1α, уровню окислительного стресса, активности ферментов антиоксидантной защиты, функциональному состоянию митохондрий и другим параметрам. В экспериментальных исследованиях по результатам воздействия сублетальной гипоксической нагрузки в барокамере выделяют ВУ и НУ лабораторных животных. У НУ животных содержание HIF-1α в разных органах выше. Показано, что люди также отличаются значительной индивидуальной вариабельностью уровней экспрессии *HIF1A* и HIF-зависимых генов в лейкоцитах, выявлено наличие полиморфизмов гена *HIF1A*, обеспечивающих высокий уровень его экспрессии. Полиморфизм *HIF1A* rs11549465 C>T связан с увеличением риска развития опухолей. С целью исследования чувствительности к острой горной болезни и высокогорному отеку легких у людей их помещают в барокамеру или в условия гор. Индивидуальная вариабельность устойчивости к гипоксии обусловлена генетическим фоном, состоянием здоровья, физической подготовкой и адаптационным резервом, а также эпигенетическими факторами.

Транскрипционный фактор HIF, активирующийся в ответ на недостаток кислорода, регулирует экспрессию нескольких тысяч генов. В 90% злокачественных новообразований наблюдается гипоксия, которая приводит к активации HIF. В процессах инициации, промоции и прогрессии опухолей активация HIF способствует изменениям метаболизма клеток, адгезии, стимулирует ангиогенез, инвазию и метастазирование. В клетках практически всех опухолей человека разного гистогенетического типа выявлено повышенное содержание белков семейства HIF. В настоящее время предлагаются подходы к терапии опухолей, основанные на ингибировании HIF. Однако ингибиторы HIF, как правило, оказывают системное действие на организм. Кроме того, при их применении не учитывается исходная устойчивость организма к гипоксии, а также исходный уровень активности HIF и других генов, регулирующих ответ на гипоксическое воздействие, что снижает эффективность лекарственных средств и увеличивает вероятность нежелательных побочных эффектов.

Окислительный стресс и активация HIF регулируют как опухолевые, так и воспалительные процессы. HIF контролирует метаболизм и транскрипцию различных генов в иммунных клетках и их функциональную активность. Развитие воспалительных реакций связано с высокой потребностью в энергии и, следовательно, в кислороде, а также с нарушением кровотока в сосудах микроциркуляторного русла, сопровождающегося тканевой гипоксией. Промотор гена *HIF1A* имеет сайт связывания NF-κB, что при воспалительных заболеваниях приводит к активации экспрессии как генов, регулирующих ответ на гипоксию, так и генов, кодирующих провоспалительные молекулы.

Хроническое воспаление, в свою очередь, также взаимосвязано с развитием опухолей. Установлено, что около 25% случаев злокачественных опухолей развивается на фоне хронического воспаления, однако точные механизмы этой взаимосвязи остаются недостаточно изученными. Известно, что развитие воспалительных и опухолевых процессов сопровождается активацией сходных сигнальных путей (HIF, NF-κB, VEGF, STAT3, ERK, MMPs и др.), контролирующих пролиферацию клеток, миграцию и ангиогенез, в которых участвуют факторы роста, провоспалительные цитокины и проангиогенные факторы. Связанное с опухолью воспаление имеет последствия не только для ближайшего местного микроокружения, но и способствует высвобождению в кровоток различных молекул, которые инициируют и поддерживают воспаление на системном уровне. Индуцированный опухолью СВО является неблагоприятным прогностическим признаком для онкологических пациентов. Таким образом, процессы гипоксии, воспаления и онкогенеза тесно взаимосвязаны.

Полученные ранее данные свидетельствуют о том, что животные с разной устойчивостью к гипоксии имеют различные адаптационные возможности и предрасположенность к развитию воспалительных заболеваний: у НУ животных после гипоксической нагрузки повышается содержание маркера окислительного стресса 8-изопростана, что сопряжено с повреждением клеточных мембран и увеличением уровня TGF-β. Окислительный стресс играет ключевую роль в развитии опухолей. По-видимому, организмы с разной устойчивостью к гипоксии могут быть в разной степени предрасположены к развитию опухолевых заболеваний, что, вероятно, во многом обусловлено различным уровнем окислительного стресса и степенью антиоксидантной защиты. При индуцированном липополисахаридом СВО более высокая экспрессия *Hif1a* у НУ крыс Вистар сопровождается повышением экспрессии *Nfkb* и более тяжелым течением воспаления. Учитывая роль HIF в регуляции множества генов, ответственных за различные процессы в организме, очевидно, что более высокая исходная активность HIF-1α у НУ организмов может влиять как на процессы воспаления, так и онкогенеза, а также на эффективность терапии различных видов злокачественных опухолей. В литературе отсутствуют данные об особенностях опухолевого процесса у животных с высокой и низкой исходной устойчивостью к гипоксии.

Несмотря на ведущую роль гипоксии практически на всех этапах формирования опухолей, индивидуальная исходная устойчивость к недостатку кислорода до сих пор не рассматривается в качестве фактора инициации и прогрессии опухолевого роста. Различная предрасположенность людей к развитию опухолей разных типов может быть обусловлена не только внешними и генетическими факторами, высотой проживания, возрастом, полом, но и определяться индивидуальной устойчивостью к гипоксии. В связи с этим необходимы дальнейшие исследования в этой области.

Существующие способы оценки исходной устойчивости организма к гипоксии предполагают только непосредственное воздействие условий недостатка кислорода, т.е. *in vivo*. При таких способах оценки у лабораторных животных, как правило, используют сублетальную гипоксическую нагрузку, которая может приводить к альтеративным и воспалительным изменениям во внутренних органах. Данный способ определения устойчивости к гипоксии в барокамере является инвазивным, кроме того, для нивелирования эффекта острого гипоксического воздействия на организм необходим интервал в один месяц до включения животных в эксперимент. В последние годы увеличивается популярность основанной на повышении устойчивости к недостатку кислорода гипокситерапии для профилактики обострения многих заболеваний, их лечения и реабилитации пациентов. Однако до сих пор не разработаны доступные способы определения индивидуальной устойчивости к гипоксии, позволяющие прогнозировать терапевтическую эффективность гипокситерапии, а также неблагоприятные реакции организма. Поэтому актуальной задачей является разработка способов определения устойчивости организма к гипоксии, основанных на использовании чувствительных лабораторных методов.

Таким образом, гипоксия и воспаление определяют темпы инициации и прогрессии опухолей. Несмотря на ведущую роль локальной гипоксии практически на всех этапах развития опухолей, индивидуальную исходную устойчивость к недостатку кислорода до сих пор не рассматривают в качестве фактора предрасположенности к инициации опухолевого роста и не учитывают при разработке лекарственных средств, направленных на коррекцию гипоксии в опухолях. Вероятно, темпы инициации и прогрессии опухолей у организмов с разной исходной устойчивостью к гипоксии различаются. Поэтому исследование клеточных и молекулярно-биологических механизмов взаимосвязи воспаления, опухолевого процесса и устойчивости к гипоксии позволит определить мишени для разработки новых методов персонализированной эффективной терапии злокачественных опухолей, особенно сопряженных с развитием воспаления. Кроме того, в настоящее время не разработаны способы определения устойчивости к гипоксии без воздействия недостатка кислорода на организм. Необходима разработка способов определения индивидуальной устойчивости к недостатку кислорода без гипоксического воздействия.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объекты исследования

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). Экспериментальные исследования проведены в период с 2016 по 2024 гг. Подробные сведения об использованных в экспериментах животных представлены в табл. 2.1.

При поступлении в виварий НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского» животных помещали на двухнедельный карантин, 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).

Все эксперименты выполнены в соответствии с актуальными требованиями к содержанию и проведению манипуляций с лабораторными животными. 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 (Animal Research Reporting of *In Vivo* Experiments) 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.) и Локального этического комитета ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского» (Протокол №11 от 20 декабря 2024 г.). Животные были случайно разделены на контрольные и экспериментальные группы. При проведении экспериментальных исследований учитывали биологические ритмы (Portaluppi et al., 2010; Джалилова и соавт., 2017).

Таблица 2.1

Характеристика экспериментальных животных, использованных в работе

Пол, вид, линия	**Общее количество**	**Число животных, включенных в исследование (без СУ)**	**Возраст на момент включения в исследование**	**Масса тела на момент включения в исследование, г**	**Экспериментальное исследование**
Самцы, крысы Вистар	96	69	2 сут	8-10	Взаимосвязь между устойчивостью к гипоксии, окислительным стрессом и продукцией провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в разные периоды постнатального онтогенеза у самцов крыс Вистар
			10 сут	20-25	
			10-12 недель	240-280	
			72 недели	450-600	
	60	37	10-12 недель	240-280	Морфологические, иммуногистохимические и молекулярно-биологические особенности прогрессии глиобластомы 101.8 у ВУ и НУ самцов крыс Вистар
	170	79	10-12 недель	240-280	Молекулярно-биологические особенности макрофагов и уровень продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов у ВУ и НУ самцов крыс Вистар
	160	62	10-12 недель	240-280	Разработка способов *ex vivo* оценки устойчивости к недостатку кислорода самцов крыс Вистар без сублетального гипоксического воздействия в барокамере

Таблица 2.1 (продолжение)

Характеристика экспериментальных животных, использованных в работе

Пол, вид, линия	**Общее число животных**	**Число животных, включенных в исследование (без СУ)**	**Возраст на момент включения в эксперимент**	**Масса тела на момент включения в исследование, г**	**Экспериментальное исследование**
Самцы, мыши C57Bl/6	80	44	8-10 недель	20-22	Морфологическая характеристика язвенного и воспалительного процессов в ободочной кишке и морфофункциональные особенности иммунной системы при остром колите у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6
	64	40	8-10 недель	20-22	Морфологическая характеристика язвенного и воспалительного процессов в ободочной кишке и морфофункциональные особенности иммунной системы при хроническом колите у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6
	150	80	8-10 недель	20-22	Морфологическая характеристика, молекулярно-биологические и иммунологические особенности колоректального рака у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6
	92	70	8-10 недель	20-22	Морфологические и молекулярно-биологические особенности прогрессии карциномы легких Льюис у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6
Общее количество животных	**872**	**481**			

Для определения устойчивости животных к гипобарической гипоксии во всех экспериментах использовали вентилируемую барокамеру с манометром ТВ5 («Росма», Россия) и вакуумным насосом 6MYT80A4 («Smem», Италия), конструкция которой по техническим характеристикам соответствует требованиям, представленным в работах (Березовский, 1978; Агаджанян и соавт., 1999; Лукьянова и Кирова, 2011; Jain et al., 2013; Kurhaluk et al., 2019; Belosludtsev et al., 2020). «Подъем» животных на «высоту» осуществляли со скоростью 80 м/с. В помещении, где проводили исследование, поддерживали температуру +20-22°С. Определение устойчивости животных к гипоксии (рис. 2.1) проводили однократно по «времени жизни» на критической «высоте» до появления признаков асфиксии – нарушения дыхания и принятия бокового положения. Для крыс Вистар критическая «высота» составила 11 500 м или 157 мм рт. ст., 20,9 кПа (соответствует примерно 4% O_2) (Агаджанян и соавт., 1999; Грек и соавт., 2007; Безруков и соавт., 2012; Kirova et al., 2013; Tregub et al., 2013), а для мышей С57Bl/6 – 10 000 м или 198,3 мм рт.ст., 26,4 кПа (соответствует примерно 5,5% O_2) (Зиновьев и соавт., 1988; Vedunova et al., 2014).

Рис. 2.1. Определение устойчивости к гипоксии самцов крыс Вистар и мышей С57Bl/6 в барокамере

По результатам определения устойчивости к гипоксии животных разделяли на три группы – ВУ, СУ и НУ. К ВУ относили крыс Вистар, «время жизни» которых на «высоте» 11 500 м было более 240 с и мышей С57Bl/6, «время жизни» которых на «высоте» 10 000 м было более 10 мин. К НУ относили крыс Вистар, «время жизни» которых на «высоте» 11 500 м было менее 80 с и мышей С57Bl/6, «время жизни» которых на «высоте» 10 000 м было менее 3 мин. К СУ животным относили крыс со «временем жизни» от 80 до 240 с и мышей со «временем жизни» от 3 до 10 мин. СУ животных в экспериментах не использовали (n=391), поэтому итоговое количество животных, включенных в исследования, составило 481 (247 самцов крыс Вистар и 234 самца

мышей C57Bl/6). В связи с тем, что работа направлена на выявление группы риска развития и неблагоприятного течения опухолевого процесса, исследование проводили только на двух полярных группах животных – ВУ и НУ, а СУ были исключены. Поскольку «высота подъема» животных в барокамере является сублетальной, отмечалась их гибель: крыс Вистар – 3%, мышей C57Bl/6 – 1%. Все эксперименты проводили через один месяц после определения устойчивости животных к гипоксии в соответствии с рекомендациями Л.Д. Лукьяновой и соавт. (2009), Л.Д. Лукьяновой и Ю.И. Кировой (2011), Н.Н. Каркищенко (2017) для нивелирования возможного отрицательного воздействия на организм острого гипоксического воздействия. Крыс Вистар выводили из экспериментов передозировкой (15 мг/кг) Золетила 100 («Virbac Sante Animale», Франция), а мышей C57Bl/6 – цервикальной дислокацией.

Исследование состояло из нескольких этапов (рис. 2.2). На первом этапе определяли взаимосвязь между устойчивостью к гипоксии, окислительным стрессом и продукцией провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в разные периоды постнатального онтогенеза для выбора оптимальной возрастной группы для моделирования опухолевого процесса – по результатам данного этапа были выбраны половозрелые животные. На следующем этапе воспроизводили модели трех злокачественных опухолей – колоректального рака, глиобластомы и карциномы легких. На последнем этапе исследовали особенности макрофагов, которые являются ключевыми клетками врожденного противоопухолевого иммунитета, а также определяли лабораторные способы оценки устойчивости к гипоксии без сублетального воздействия на организм в барокамере.

Рис. 2.2. Дизайн исследования

2.2. Методы исследования

2.2.1. Исследование взаимосвязи между устойчивостью к гипоксии, окислительным стрессом и продукцией провоспалительных и противовоспалительных цитокинов у новорожденных, препубертатных и половозрелых самцов крыс Вистар

Исследование выполнено в осенне-зимний период 2018-2019 гг. Использовали 30 половозрелых животных (20 самок и 10 самцов) для получения потомства и формирования групп 2-сут и 10-сут крыс Вистар. Беременность длилась 21-23 сут, потомство одной самки составило 6-8 особей. По 1-2 самца из помета были включены в группы новорожденных и препубертатных крыс.

Новорожденных (возраст 2 сут), препубертатных (возраст 10 сут) и половозрелых (возраст 10-12 недель) 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 гена *Hif1a* и содержания белков HIF-1α и PHD2 в печени, так как печень является одним из высокочувствительных к гипоксии органов (Шустов и соавт., 2015; Zarubina, 2011; Kirova et al., 2013). Определяли уровень окислительного стресса и антиоксидантной защиты в крови, а также содержание белка HIF-1α в сыворотке крови. Кроме того, в связи с ограниченным объемом сыворотки крови, особенно у животных новорожденного и препубертатного периода, у второй группы крыс Вистар оценивали продукцию провоспалительных цитокинов IFN-γ, TNF-α и противовоспалительного цитокина IL-10 клетками селезенки (рис. 2.3).

Выведение животных из эксперимента и забор материала

Проводили забор крови из шейных вен у новорожденных (n=6), препубертатных (n=6) и половозрелых (n=6) крыс Вистар для биохимического исследования уровня окислительного стресса и антиоксидантной защиты в периферической крови, для иммуноферментного анализа (ИФА) получали сыворотку. Для получения сыворотки кровь центрифугировали при 200g в течение 15 мин, сыворотку аликвотировали по 200 мкл, замораживали и хранили в течение одного месяца при –70°С.

Для исследования методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени непосредственно после выведения животных из эксперимента фрагменты их печени размером от 3 до 5 мм^3 помещали в микроцентрифужную пробирку Eppendorf, содержащую 1 мл фиксатора РНК IntactRNA Reagent («Евроген», Россия), инкубировали в течение суток при +4°С и хранили при –70°С не более двух месяцев.

Для Вестерн-блоттинга фрагменты печени помещали в жидкий азот, хранили при –70°С не более двух месяцев.

Для исследования уровня продукции цитокинов извлекали селезенку.

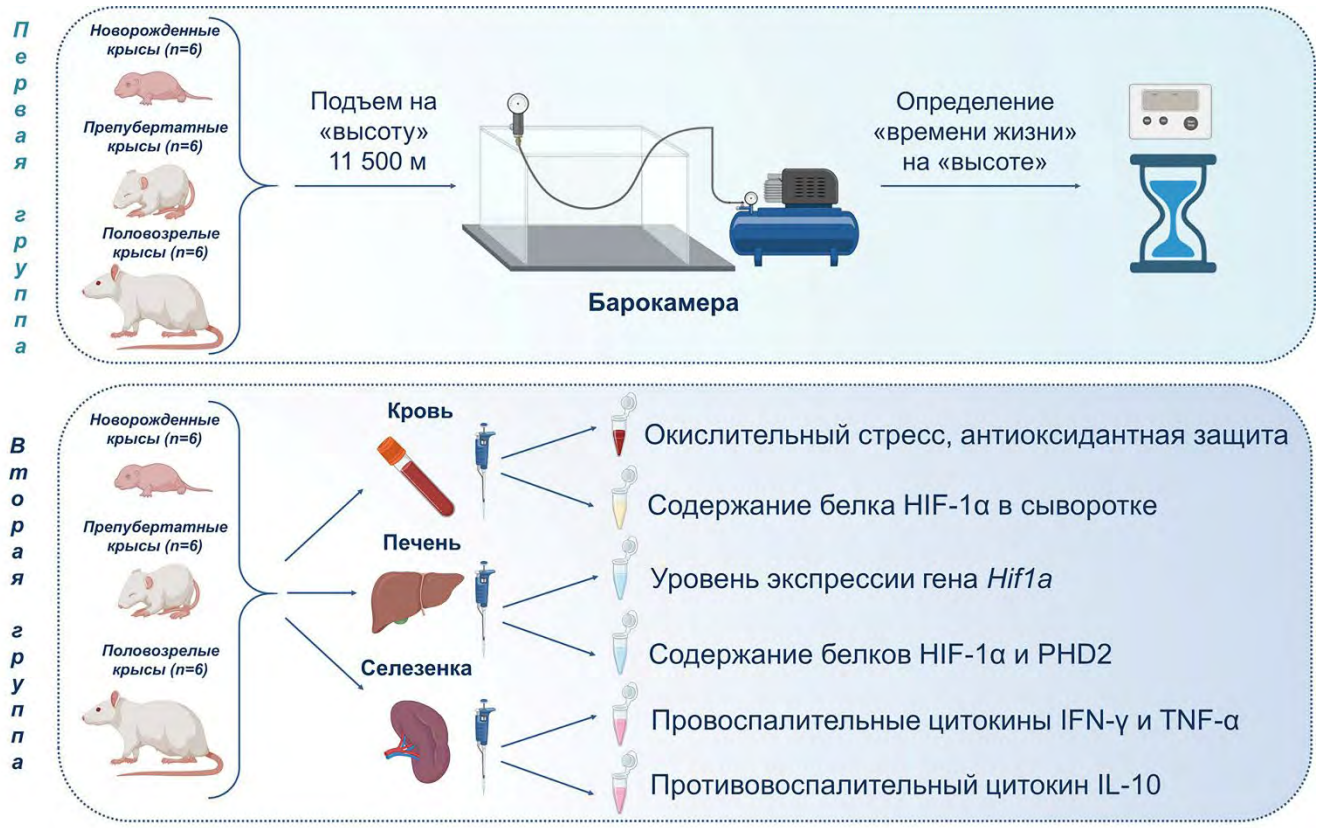


Рис. 2.3. Сравнительное исследование у новорожденных, препубертатных и половозрелых самцов крыс Вистар «времени жизни» на «высоте» (первая группа), а также относительного уровня окислительного стресса и антиоксидантной защиты в крови, содержания белка HIF-1α в сыворотке крови, уровня экспрессии гена *Hif1a* и содержания белков HIF-1α и PHD2 в печени, продукции провоспалительных цитокинов IFN-γ, TNF-α и противовоспалительного цитокина IL-10 клетками селезенки (вторая группа)

Выделение РНК из печени

Выделение тотальной РНК проводили с использованием набора RNeasy Plus Mini Kit («Qiagen», Германия) в соответствии с инструкцией. Для предотвращения деградации молекул РНК из-за действия РНКаз работы по выделению РНК выполняли в соответствии с правилами проведения молекулярно-биологических экспериментов с использованием свободного от РНКаз лабораторного пластика и обработанной ингибитором РНКаз воды. Все реагенты готовили непосредственно перед использованием. С помощью гомогенизатора TissueLyser LT («Qiagen», Германия) образцы ткани печени массой около 10 мг гомогенизировали в прилагаемом буфере Buffer RLT Plus с 1% β-меркаптоэтанола 4 мин при 40 Гц. Затем в центрифуге Eppendorf Minispin Plus («Eppendorf», Германия) гомогенаты центрифугировали в течение 3 мин при 9500g, супернатанты переносили в пробирки gDNA Eliminator для удаления геномной ДНК. Образцы центрифугировали 30 с при 8000g, к осадку добавляли равный объем 70% этилового спирта, тщательно перемешивали. Образцы переносили в пробирки RNeasy Spin Column, центрифугировали 30 с при 8000g, добавляли буфер Buffer RW1, центрифугировали 30 с при 8000g, добавляли буфер Buffer RPE, центрифугировали 30 с при 8000g. Добавляли буфер Buffer

RPE, центрифугировали 2 мин при 8000g, затем при 9500g для высушивания, добавляли 40 мкл стерильной воды, свободной от РНКаз, и центрифугировали 1 мин при 8000g. Полученную РНК хранили при –70˚С. С помощью прибора Nanodrop («Thermo Fisher Scientific», США) оценивали чистоту (соотношение поглощения раствора при длинах волн 260/280) и концентрацию полученной РНК (по поглощению раствора при 260 нм).

Постановка обратной транскрипции

Обратную транскрипцию для получения комплементарной ДНК (кДНК) проводили с помощью набора MMLV RT Kit («Евроген», Россия) в соответствии с инструкцией. К 6 мкл РНК добавляли 2 мкл случайного декануклеотидного праймера (Random dN) и 1 мкл стерильной воды, свободной от РНКаз, в термостате «Термит» («ДНК-технология», Россия) нагревали при +70°С в течение 2 мин для расплавления вторичных структур РНК, затем хранили при +4°С. Реакционная смесь для обратной транскрипции состояла из 4 мкл 5Х буфера для синтеза первой цепи (280 мМ Трис-HCl, 375 мМ KCl, 30 мМ $MgCl_2$, pH 8,7), 2 мкл 10 мМ смеси дезоксинуклеотидов dNTP, 2 мкл 20 мМ раствора дитиотреитола DTT и 2 мкл стерильной воды, свободной от РНКаз. Непосредственно перед реакцией в смесь вносили 1 мкл MMLV ревертазы (Moloney Murine Leukemia Virus, обратная транскриптаза вируса лейкемии мышей Молони) и добавляли к смеси РНК, декануклеотидного праймера и воды. Пробирки нагревали в термостате «Гном» («ДНК-технология», Россия) при +39°С в течение 60 мин, затем при +70°С 10 мин в термостате «Термит» («ДНК-технология», Россия). Синтезированную кДНК разбавляли стерильной водой, свободной от РНКаз до конечного объема 40 мкл. Полученные библиотеки кДНК замораживали и хранили при –70°С не более двух месяцев.

Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

Экспрессию гена *Hif1a* в печени у новорожденных, препубертатных и половозрелых крыс Вистар оценивали методом ПЦР в режиме реального времени относительно уровня экспрессии гена β_2-микроглобулина *B2m* на Real-Time амплификаторе DTprime («ДНК-Технология», Россия). В качестве эндогенного контроля был выбран ген *B2m,* который считается наиболее подходящим референсным геном для проведения ПЦР в печени (Wang и Xu, 2010; Ahlawat et al., 2024; Souza et al., 2024).

Для дизайна праймеров использовали on-line программу Primer-BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi, США) в соответствии с общепринятыми требованиями. GC-соотношение, температуру плавления, способность к формированию шпилек и димеров определяли с помощью OligoAnalyzer™ Tool (https://www.idtdna.com/, США). Использовали праймеры, синтезированные фирмой «Евроген» (табл. 2.2).

Таблица 2.2

Последовательности использованных для ПЦР праймеров («Евроген», Россия)

Праймер	**Направление последовательности**	**Последовательность (5’ к 3’)**	**NCBI Ref Seq**	**Определяемый ген**
B2m	Прямая	CTCGCTCGGTGACCGTGAT	NM_012512.2	*Rattus norvegicus* beta-2 microglobulin (*B2m*), мРНК
	Обратная	GGACAGATCTGACATCTCGA		
Hif1a	Прямая	GAGCCTTAACCTATCTGTCA	NM_024359.2	*Rattus norvegicus* hypoxia inducible factor 1 subunit alpha (*Hif1a*), мРНК
	Обратная	CACAATCGTAACTGGTCAGC		

Для постановки ПЦР в соответствии с инструкцией использовали смесь qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Россия), содержащую HS Taq ДНК-полимеразу, флуоресцентный интеркалирующий краситель SYBR Green I, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов, ионы Mg^{2+}, а также реакционный буфер. Проба состояла из 1 мкл раствора кДНК, 1 мкл раствора праймеров (прямого и обратного), 18 мкл воды и 5 мкл смеси qPCRmix-HS SYBR. Общий объем смеси составлял 25 мкл. Реакцию проводили в двух повторах. Использовали режим амплификации, представленный в табл. 2.3.

Таблица 2.3

Режим амплификации

Стадия	**Количество циклов**	**Температура**	**Время инкубации**	**Детекция**
Предварительная денатурация	1	95°C	5 мин	
Денатурация	40	94°C	10 с	Детекция SYBR Green I
Отжиг		60-62°C	10 с	
Элонгация		72°C	20 с	

Уровни относительной экспрессии искомых генов по отношению к референсному гену определяли с помощью метода M.W. Pfaffl (2001) и выражали в условных единицах. Относительную концентрацию мРНК указанных генов рассчитывали методом прямого сравнения данных по формуле: $\mathbf{[A]_0/[B]_0} = \boldsymbol{E}^{-\Delta C(T)}$, где $\mathbf{[A]_0}$ – начальная концентрация мРНК гена в ПЦР-смеси, $\mathbf{[B]_0}$ – начальная концентрация мРНК *B2m* в ПЦР-смеси, $\boldsymbol{E}$ – эффективность реакции (принимали равной 1,98), $\boldsymbol{\Delta C(T)}$ – разность пороговых циклов *B2m* и искомого гена.

Вестерн-блоттинг

Для анализа относительного содержания белков HIF-1α и PHD2 в печени у новорожденных, препубертатных и половозрелых крыс Вистар был использован метод Вестерн-блоттинга с детекцией хемилюминесценции. Замороженные в жидком азоте образцы печени помещали в

предварительно охлажденную керамическую ступку и измельчали в жидком азоте до порошкообразного состояния. Образцы лизировали в Protein Solubilization Buffer (PSB, «Bio-Rad», США) с Complete Protease Inhibitor Cocktail («Roche», США) из расчета 50 мг ткани на 500 мкл буфера, гомогенизировали и центрифугировали 30 мин при 14000 g, +4°C. Разделение белков проводили методом электрофореза по U.K. Laemmli (1970). Для этого использовали комбинации разделяющего и концентрирующего гелей. Для приготовления гелей использовали готовый набор TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Starter Kit («Bio-Rad», США). Процент акриламида в разделяющем геле определяли в зависимости от молекулярной массы исследуемого белка: 8% – для белков более 100 кДа и 10% – для белков с массой в диапазоне от 30 до 100 кДа. Образцы прогревали в течение 5 мин при +65°C непосредственно перед нанесением. Электрофорез проводили в трис-глициновом буфере в денатурирующих условиях при напряжении 80 В в концентрирующем геле и 180 В в разделяющем геле. После завершения электрофореза гель промывали в CAPS буфере (N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid, N-циклогексил-3-аминопропанесульфоновая кислота) два раза по 5 мин. Перенос белков осуществляли на 0.45 мкм нитроцеллюлозную мембрану («Millipore», США) с помощью Trans-Blot Turbo RTA MiniLF PVDFTransfer Kit («Bio-Rad», США) при силе тока 0.35 А в течение 80 мин. После этого мембрану инкубировали в течение 5 мин в 10%-ной уксусной кислоте, а затем обратимо окрашивали 0,3%-ным раствором красителя белков Ponceau. Далее мембрану сканировали, а краситель удаляли фосфатно-солевым буфером (Phosphate Buffered Saline, PBS) (10 мМ фосфатный буфер, 137 мМ натрий хлорид, 2,7 мМ калий хлорид, pH 7.4, 0.01M, таблетки, «Хеликон», Россия). Сайты неспецифического связывания антител блокировали путем инкубации мембраны в 5%-ном обезжиренном молоке («Bio-Rad», США), приготовленном на основе TBST-буфера (Tris-Buffered Saline with Tween 20, 25 мМ Tris-HCl, pH 7,4, 150 мМ NaCl, 0,1% Tween 20), при комнатной температуре в течение 1 ч. Окрашивание первичными антителами к GAPDH (sc-25778, 1:1000; «Santa Cruz», США), HIF-1α (ab179483, 1:1000, «Abcam», Великобритания) и PHD2 (ab244389, 1:500, «Abcam», Великобритания) проводили в течение 18 ч при +4ºС на шейкер-качалке (200 об/мин). После этого мембрану промывали три раза TBST-буфером по 7 мин. В течение 1 ч при комнатной температуре проводили окрашивание антивидовыми антителами (1:5000), конъюгированными с пероксидазой хрена («Bio-Rad», США), затем трижды промывали TBST-буфером по 7 мин. С использованием набора Novex ECL («Invitrogen», «Thermo Fisher Scientific», США) осуществляли проявку мембраны в гель-документирующей станции ChemiDoc XRS+ («Bio-Rad», США), время экспозиции составило 60, 120 или 600 с в зависимости от исследуемого белка. Интенсивность хемилюминесценции HIF-1α и PHD2 анализировали с помощью программного обеспечения ImageLab («BioRad», США), сигнал исследуемых белков нормировали на соответствующий сигнал белка «домашнего

хозяйства» GAPDH («Bio-Rad», США), который, как нами показано (Dzhalilova et al., 2022), оптимален для изучения печени у животных разных возрастов.

Биохимическое исследование

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

Выраженность окислительного повреждения (тест FORT) оценивали по выделению АФК с использованием колориметрической регистрации. Метод основан на способности переходных металлов катализировать расщепление гидропероксидов с образованием свободных радикалов. Эти радикалы затем захватываются аминопроизводными $CrNH_2$. Амин взаимодействует со свободными радикалами с образованием окрашенного стабильного продукта, определяемого фотометрически при длине волны 505 нм. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна количеству радикалов и концентрации гидропероксидов, и, соответственно, окислительному статусу образца. Тест FORT позволяет эффективно измерять уровни АФК в крови (Găman et al., 2020). 20 мкл крови помещали в пробирку с реагентом FORT R2, переносили смесь в пробирку с реагентом FORT R1, центрифугировали 1 мин при 600g и помещали кювету в анализатор.

Оценка общей антиоксидантной способности (тест FORD) основана на использовании предварительно образованных радикалов и снижении абсорбции, которое пропорционально концентрации антиоксидантов (водорастворимого аналога α-токоферола) в крови (Palmieri и Sblendorio, 2007; Pavlatou et al., 2009; Găman et al., 2020). Реагент S2 смешивали с 50 мкл реагента S3 в кювете C1, помещали в прибор. 50 мкл крови помещали в кювету с реагентом S1, центрифугировали 1 мин при 600g, отбирали супернатант в кювету C1, помещали в анализатор.

Выделение клеток селезенки и их культивирование

Для исследования продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов клетки селезенки крыс Вистар выделяли с помощью гомогенизатора Поттера. Выделенные клетки центрифугировали в среде 199 («ПанЭко», Россия) в течение 10 мин при 100g. Лизис эритроцитов вызывали осмотическим шоком путем инкубации с 1 мл дистиллированной воды в течение 10 с. Количество жизнеспособных ядросодержащих клеток в 1 мл суспензии определяли в камере Горяева с помощью окрашивания трипановым синим («ПанЭко», Россия). Жизнеспособность клеток составляла 97-98%. Среда для культивирования клеток селезенки (Lin et al., 2015) состояла из RPMI (Roswell Park Memorial Institute)-1640 («ПанЭко», Россия) с 5% инактивированной телячьей фетальной сыворотки («Biosera», Мексика), 2 мМ глутамина («ПанЭко», Россия) и 50 мкг/мл гентамицина («ПанЭко», Россия). Для индукции синтеза и секреции цитокинов суспензию клеток селезенки в концентрации 1×10^6/мл культивировали 18 ч

в 1 мл полной ростовой среды с добавлением Конканавалина А (КонА) («ПанЭко», Россия) в конечной концентрации 5 мкг/мл в 24-луночных культуральных планшетах в CO_2-инкубаторе при +37°С и 5% CO_2 («Sanyo», Япония). По окончании инкубации отбирали супернатанты, которые хранили в течение одного месяца при температуре –70°С.

Иммуноферментный анализ

Методом ИФА определяли продукцию провоспалительных цитокинов IFN-γ, TNF-α и противовоспалительного цитокина IL-10 («eBioscience», США) клетками селезенки, а также содержание белка HIF-1α («Cloud-Clone Corp.», Китай) в сыворотке крови. Анализ проводили согласно инструкциям производителей. Для определения интенсивности цветовой реакции использовали микропланшетный ИФА-анализатор ANTHOS 2010 («Anthos Labtec Instruments», Австрия).

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

Исследование проведено в осенне-зимние периоды 2020-2021 и 2021-2022 гг. Устойчивость к гипоксии половозрелых (n=30, возраст 10-12 недель) и старых (n=30, 72 недели) крыс Вистар определяли в барокамере на «высоте» 11 500 м (рис. 2.4). Из-за отсутствия четких критериев для оценки возраста лабораторных животных возрастная периодизация варьирует в работах разных авторов (Абрашова и соавт., 2013; Котеров и соавт., 2018). Возрастные группы животных были выбраны с учетом рекомендаций и анатомо-физиологических особенностей животных, интенсивности их роста и поведенческих реакций (Абрашова и соавт., 2013; Косырева, 2018; Pétervári et al., 2010; Teixeira et al., 2017). Показано, что в возрасте 18 месяцев у крыс наблюдаются изменения различных показателей, характерные и для животных возраста 24-26 месяцев, а также начинаются когнитивные изменения, при этом у них меньше вероятность возникновения спонтанных опухолей и других возраст-ассоциированных заболеваний (Roth et al., 1993; Pétervári et al., 2010; Yu et al., 2017). Группа старых крыс характеризовалась изменением шерстного покрова, появлением коричневого налета на зубах, стиранием их режущих поверхностей, снижением двигательной активности, что соответствует данным литературы (Абрашова и соавт., 2013).

Проводили исследование (рис. 2.4) относительного уровня экспрессии генов *Hif1a*, *Nfkb* и *Vegf* в печени, так как печень является одним из высокочувствительных к гипоксии органов (Шустов и соавт., 2015; Zarubina, 2011; Kirova et al., 2013). Определяли содержание белка HIF-1α в сыворотке крови. В связи с тем, что легкие в физиологических условиях являются депо нейтрофилов и показано, что в ответ на гипоксию происходит миграция нейтрофилов в просвет

альвеол через межальвеолярные перегородки (Rossaint и Zarbock, 2013; Montgomery et al., 2017), оценивали число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках.

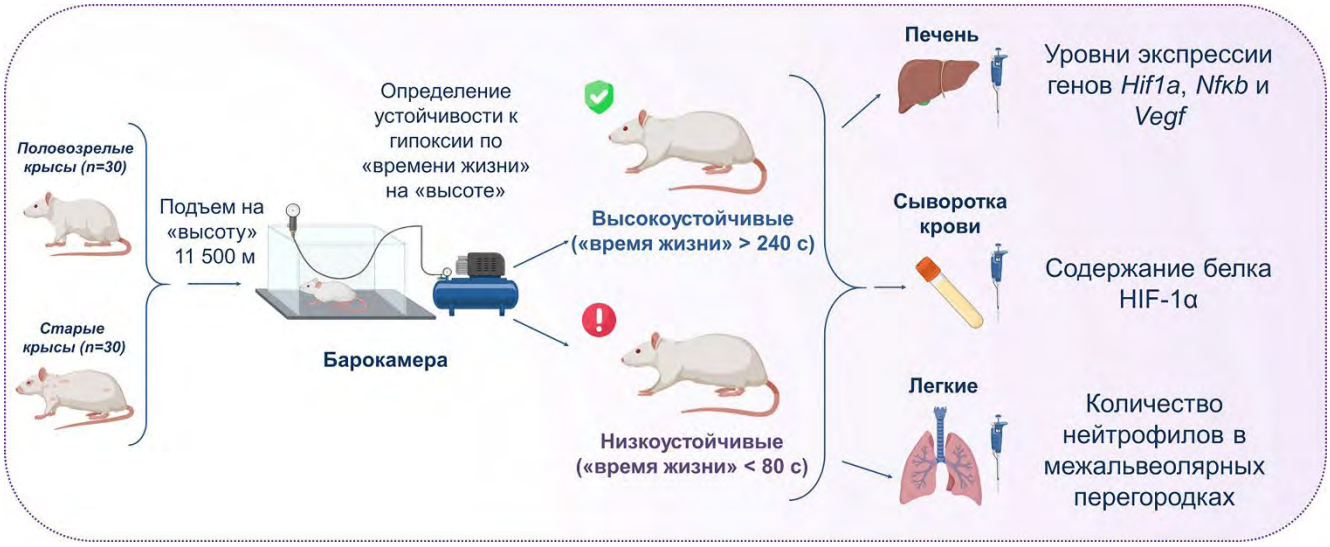


Рис. 2.4. Сравнительное исследование уровней экспрессии генов *Hif1a*, *Nfkb* и *Vegf* в печени, содержания белка HIF-1α в сыворотке крови и количества нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у ВУ и НУ половозрелых и старых крыс Вистар

Выведение животных из эксперимента и забор материала

Проводили забор крови из шейных вен, для ИФА получали сыворотку, для ПЦР исследования – фрагменты печени по методикам, подробно охарактеризованным в разделе 2.2.1.

Для гистологического исследования у половозрелых и старых ВУ и НУ крыс Вистар выделяли правое легкое и фиксировали его в жидкости Карнуа (60 мл этанола, 30 мл хлороформа, 10 мл ледяной уксусной кислоты) в течение 2 ч.

Гистологическое и морфометрическое исследования

После фиксации в жидкости Карнуа и гистологической проводки по спиртам восходящей концентрации (70°, 80°, 96°, 100°) и хлороформу в гистологическом процессоре Tissue-Tek VIP5Jr («Sakura», США), правые легкие половозрелых и старых ВУ и НУ крыс Вистар заливали в гистомикс на модульной системе заливки Tissue-Tek TEC («Sakura», США), изготавливали гистологические срезы толщиной 5-8 мкм на ротационном микротоме Microm HM340E («Thermo Scientific», США). Полученные препараты окрашивали гематоксилином и эозином («БиоВитрум», Россия). На гистологических препаратах легких (х400) с помощью микроскопа Leica DM2500 («Leica Microsystems», Германия) подсчитывали количество нейтрофилов в межальвеолярных перегородках в стандартном поле зрения (25 000 мкм^2). Поля зрения со структурами респираторного отдела легких выбирали случайно. Проводили фотодокументирование гистологических препаратов с помощью микроскопа Axioplan 2 Imaging («Carl Zeiss», Германия).

Выделение РНК, постановка обратной транскрипции и полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

Выделение РНК, постановку обратной транскрипции и ПЦР в режиме реального времени проводили по методике, подробно охарактеризованной в разделе 2.2.1, оценивали экспрессию генов *Hif1a*, *Nfκb* и *Vegf* в печени. В качестве эндогенного контроля был выбран ген *B2m,* который считается наиболее подходящим референсным геном для проведения ПЦР в печени (Wang и Xu, 2010; Ahlawat et al., 2024; Souza et al., 2024). Использовали праймеры, синтезированные фирмой «Евроген» (табл. 2.4 Приложения 2).

Иммуноферментный анализ

Методом ИФА у половозрелых и старых ВУ и НУ животных оценивали содержание белка HIF-1α в сыворотке крови («FineTest», Китай). Анализ проводили согласно инструкции производителя. Для определения интенсивности цветовой реакции использовали микропланшетный ИФА-анализатор ANTHOS 2010 («Anthos Labtec Instruments», Австрия).

2.2.3. Моделирование острого и хронического язвенного колита у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6

Модель ЯК, индуцированного заменой питьевой воды на 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). Поэтому в этой части работы использовали мышей C57Bl/6. При поступлении в виварий мышей помещали на двухнедельный карантин, проводили дегельминтизацию препаратом «Пирантел» (суспензия, 250 мг/50 мл, «Oxford Laboratories Pvt. Ltd.», Индия). Препарат вводили перорально шприцем-дозатором из расчета 1 мкл/г массы тела, двукратно, с перерывом на 10 сут.

Моделирование острого и хронического язвенного колита

Исследования проведены в осенне-зимние периоды 2016-2017 и 2017-2018 гг. Через один месяц после определения устойчивости мышей к гипоксии моделировали острый и хронический ЯК. Для индукции острого колита по I. Okayasu и соавт. (1990) (рис. 2.5) 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). ДСН растворяли в кипяченой воде, раствор заменяли ежедневно. По данным Н.А. Золотовой (2017) и Е.А. Постоваловой (2018) каждая мышь в сутки потребляет 4,2-5,1 мл раствора, таким образом, суммарная доза ДСН за 5 сут индукции составила 0,21-0,26 г/мышь. Через 5 сут раствор ДСН заменяли на питьевую воду на 2 сут. ВУ (n=6) и НУ (n=6) мыши контрольных групп в течение всего эксперимента (7 сут) потребляли питьевую воду. Животных выводили из эксперимента путем цервикальной дислокации через 7 сут после начала потребления ДСН. Перед индукцией острого колита, на 3-и

сут и при выведении из эксперимента животных взвешивали. Отслеживали изменения массы тела, гибель мышей, клинические проявления острого колита, проводили измерение длины ободочной кишки, морфологическое и морфометрическое исследование ободочной кишки, а также тимуса и селезенки. Кроме того, определяли субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови.

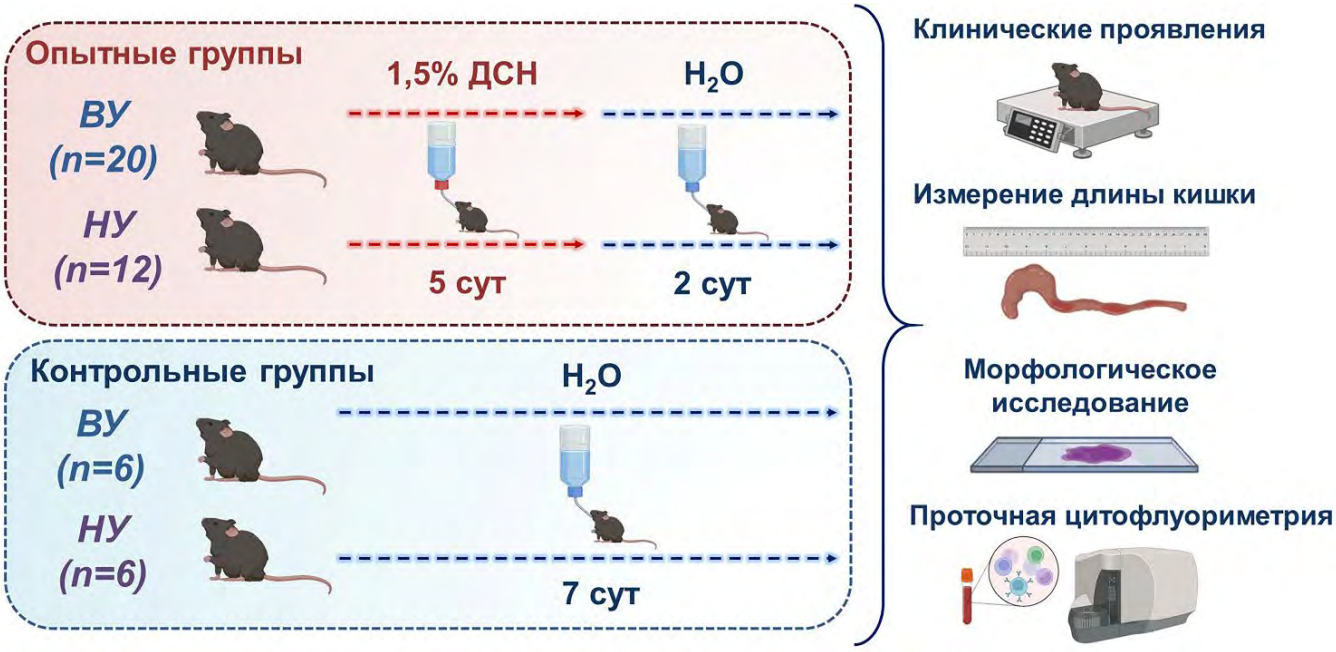


Рис. 2.5. Схема моделирования острого колита у ВУ и НУ мышей C57Bl/6 (по I. Okayasu и соавт., 1990)

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 в течение 1-4-х сут эксперимента, питьевая вода в течение 7 сут, ДСН в течение 12-14-х сут, питьевая вода в течение 7 сут, и ДСН в течение 22-26-х сут, затем питьевая вода в течение 34 сут (рис. 2.6). ВУ (n=5) и НУ (n=6) мыши контрольных групп в течение всего эксперимента (60 сут) потребляли питьевую воду. Животных выводили из эксперимента путем цервикальной дислокации через 60 сут после начала потребления ДСН. Перед индукцией хронического колита, до и после каждого периода потребления ДСН, а также при выведении из эксперимента животных взвешивали. Отслеживали изменения массы тела, гибель мышей, клинические проявления хронического колита, проводили измерение длины ободочной кишки, морфологическое и морфометрическое исследование ободочной кишки, а также тимуса и селезенки. Кроме того, определяли субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови.

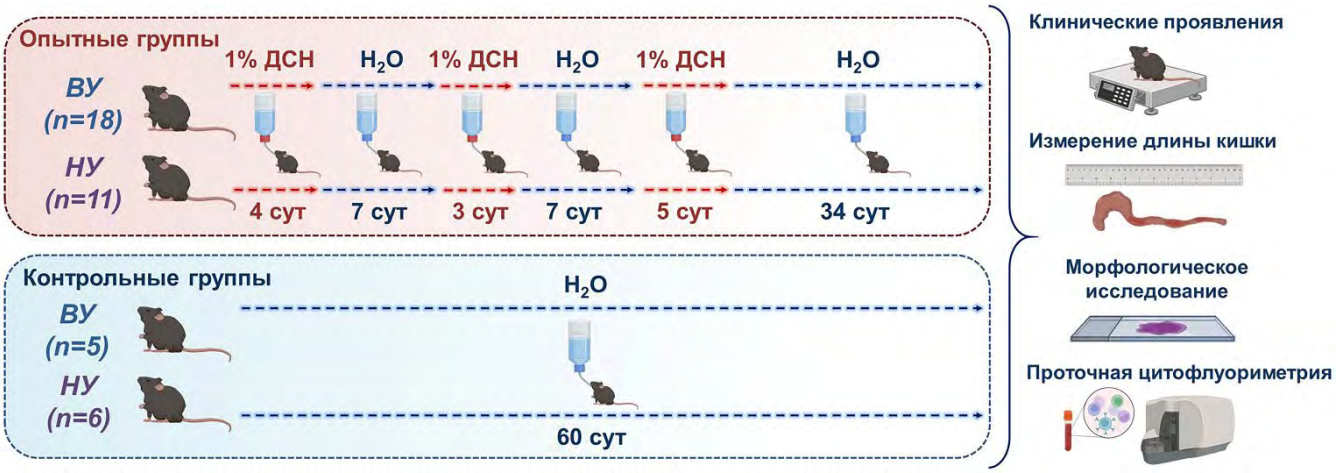


Рис. 2.6. Схема моделирования хронического колита у ВУ и НУ мышей C57Bl/6 (по S. Melgar и соавт., 2005)

Полуколичественная оценка клинических проявлений колита

В ходе экспериментов по моделированию острого и хронического ЯК оценивали общее состояние животных, их двигательную активность (интенсивность передвижения по клетке) и состояние шерстного покрова (блестящий/тусклый, гладкий/взъерошенный). Оценивали выраженность клинических проявлений острого и хронического ЯК методом полуколичественной оценки: 0 баллов – отсутствие проявлений; 1 балл – наличие диареи; 2 балла – наличие диареи с примесью крови.

Выведение животных из эксперимента и забор материала

Для гистологического исследования ободочную кишку мышей извлекали из брюшной полости, измеряли ее длину от илеоцекального угла до прямой кишки, затем вскрывали по брыжейке, промывали PBS и расправляли на фильтре «Millipore» (США). Ободочную кишку разделяли на три отдела (проксимальный, медиальный и дистальный) и фиксировали в жидкости Буэна (пикриновая кислота, формалин, ледяная уксусная кислота в соотношении 15:5:1) в течение 24 ч. Тимус и селезенку извлекали и помещали в жидкость Буэна на 24 ч.

Для анализа субпопуляционного состава лимфоцитов кровь забирали из шейных вен в пробирки с антикоагулянтом – этилендиаминтетрауксусной кислотой (К3-ЭДТА).

Гистологическое и морфометрическое исследования

После фиксации осуществляли гистологическую проводку и изготовление срезов аналогично охарактеризованному в разделе 2.2.2.

Для оценки выраженности язвенного и воспалительного процессов при остром и хроническом колите окрашенные гематоксилином и эозином гистологические препараты трех отделов ободочной кишки мышей фотографировали (x100) на протяжении всей длины на микроскопе Leica DM2500 («Leica Microsystems», Австрия). В программе ImageScope M («Leica Microsystems», Австрия) полученные фотографии каждого среза объединяли в панорамы, на

которых с помощью этой же программы измеряли протяженность язв, воспалительного инфильтрата в базальной части собственной пластинки слизистой оболочки (СПСО), а также длину мышечной пластинки. Распространенность язвенных и воспалительных изменений рассчитывали в процентах от длины мышечной пластинки слизистой оболочки.

На окрашенных гематоксилином и эозином гистологических срезах под световым микроскопом Leica DM2000 («Leica Microsystems», Германия) оценивали (х200 и 400) объемную плотность структурно-функциональных зон тимуса и селезенки методом точечного счета с использованием окулярной сетки Г.Г. Автандилова (1973). В гистологических срезах тимуса в 5 полях зрения (х200) оценивали объемные доли коркового и мозгового вещества долек, на всем срезе (х400) подсчитывали количество тимических телец, состоящих из 3-5, 5 и более эпителиальных клеток, с отложениями кератогиалина и тимические тельца в виде кистоподобных полостей. В гистологических срезах селезенки оценивали объемные доли красной и белой пульпы, периартериолярных лимфоидных муфт (ПАЛМ), светлых центров и маргинальных зон лимфоидных узелков.

Проточная цитофлуориметрия

Анализ субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови ВУ и НУ мышей контрольных групп, при остром и хроническом колите проводили на проточном цитофлуориметре Cytomics FC 500 («Beckman Coulter», США). Абсолютное количество лимфоцитов в крови оценивали с помощью автоматического гематологического анализатора Mindray BC-2800Vet (Китай).

Для иммунофенотипического анализа основных субпопуляций лимфоцитов периферической крови использовали антитела («eBioscience», США), конъюгированные с флуорофорами PE (Phycoerythrin, фикоэритрин), PE-Cy5, PE-Cy7 (Phycoerythrin-Cyanine 5, 7, фикоэритрин-цианин 5, 7), FITC (Fluorescein Isothiocyanate, флуоресцеин изотиоцианат): anti-Mouse CD45 (общий лейкоцитарный маркер), anti-Mouse CD3 (маркер Т-лимфоцитов), anti-Mouse CD4 (маркер Т-хелперов), anti-Mouse CD8 (маркер цитотоксических Т-лимфоцитов), anti-Mouse CD19 (маркер В-лимфоцитов), anti-Mouse/Rat FOXP3 (маркер регуляторных Т-лимфоцитов) (табл. 2.5). К пробиркам со 100 мкл крови добавляли антитела: CD3e-FITC 1 мкл (0,5 мг/мл), CD19-PE 0,6 мкл (0,2 мг/мл), CD8a-PE-Cy7 1 мкл (0,2 мг/мл), CD4-PE-Cy5 0,5 мкл (0,2 мг/мл), CD4-FITC 0,5 мкл (0,5 мг/мл), CD25-PE 0,5 мкл (0,2 мг/мл), FOXP3-PE-Cy5 0,5 мкл (0,2 мг/мл). Пробирки инкубировали в течение 30 мин в темноте. Лизис эритроцитов в образцах цельной крови с ЭДТА проводили с помощью раствора OptiLyse C Lysis Solution («Beckman Coulter», США). После отмывки осадок разводили в 500 мкл PBS. Для выявления субпопуляции регуляторных Т-лимфоцитов в цельной крови мышей использовали набор Regulatory T Cell Staining Kit («eBioscience», США), Flow Cytometry Staining Buffer Solution, Permeabilization Buffer

и раствор для фиксации и пермеабилизации. В качестве изотипического контроля использовали антитела IgG2a+ (0,2 мг/мл).

На основании данных по прямому FSC (Forward Scatter, прямое светорассеяние) и боковому SSC (Side Scatter, боковое светорассеяние) светорассеянию выделяли жизнеспособные клетки и анализировали интенсивность флуоресценции красителей только в выделенной популяции клеток. Процентное содержание Т-лимфоцитов, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов в периферической крови вычисляли по отношению к абсолютному количеству лимфоцитов; процентное содержание регуляторных Т-лимфоцитов – по отношению к абсолютному количеству Т-хелперов.

Таблица 2.5

Использованные антитела и выявляемые ими клетки

Антитела	**Система визуализации**	**Тип клеток**
CD3e+CD4+	FITC, PE-Cy5	Т-хелперы
CD3e+CD8a+	FITC, PE-Cy7	Цитотоксические Т-лимфоциты
CD3e-CD19+	FITC, PE	В-лимфоциты
CD4+CD25+FOXP3+	FITC, PE, PE-Cy5	Регуляторные Т-лимфоциты
CD4+CD25+IgG2a+	FITC, PE, PE-Cy5	Изотипический контроль для FOXP3+

2.2.4. Моделирование колит-ассоциированного КРР у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6

Исследование проведено в осенне-зимние периоды 2021-2022 и 2022-2023 гг. В первой части исследования использовали мышей C57Bl/6 (n=80), через один месяц после определения устойчивости к гипоксии ВУ (n=20) и НУ (n=13) животным опытных групп моделировали КРР (рис. 2.7) путем внутрибрюшинного введения АОМ (Azoxymethan 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 мышам опытных групп питьевую воду заменяли на 1%-ый ДСН с молекулярной массой 40 кДа («AppliChem», Германия) 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 в течение 14 сут, затем – 0,5%-ый ДСН 5 сут. Животных выводили из эксперимента путем цервикальной дислокации через 16 сут после последней замены ДСН на питьевую воду у мышей опытных групп, 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 в течение 70 сут они потребляли питьевую воду. Перед индукцией КРР, до и после каждого периода потребления ДСН, а также при выведении из эксперимента животных взвешивали.

В течение экспериментов по моделированию колит-ассоциированного КРР оценивали общее состояние животных, их двигательную активность, состояние шерстного покрова, наблюдали за характером стула. Анализировали динамику массы тела, частоту развития и

площадь опухолей, проводили морфологическое исследование проксимального, медиального и дистального отдела ободочной кишки и брыжеечных лимфатических узлов (БЛУ), клинический анализ крови, определяли число эндокринных клеток и содержание бокаловидных клеток в слизистой оболочке дистального отдела ободочной кишки.

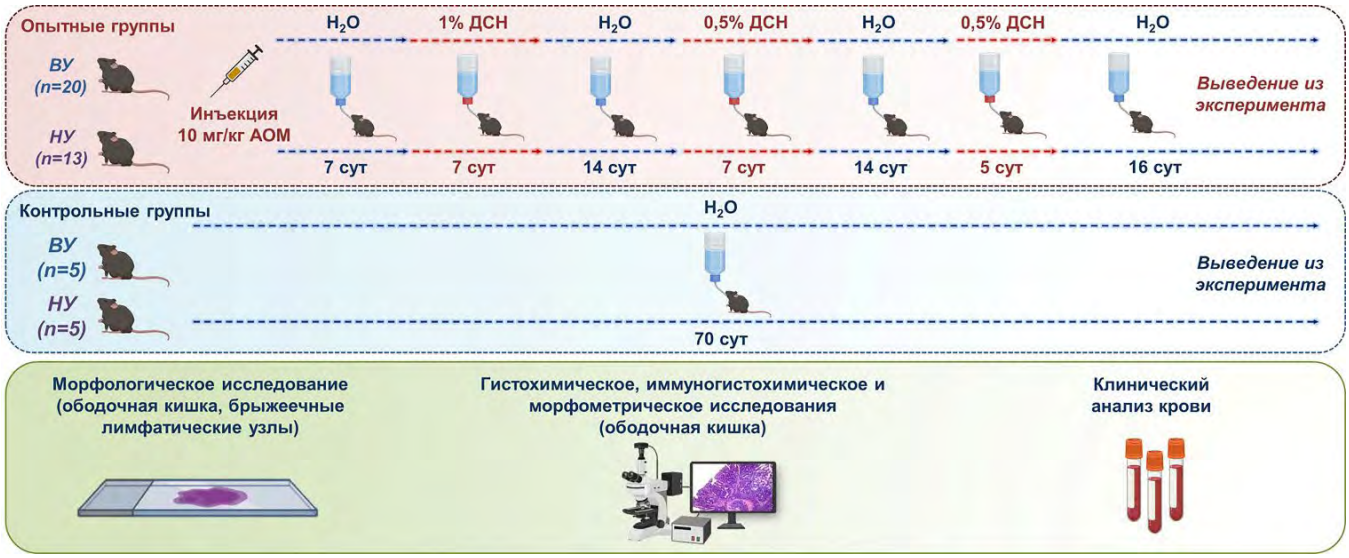


Рис. 2.7. Схема моделирования колит-ассоциированного КРР у ВУ и НУ мышей C57Bl/6 в течение 70 сут (по H. Martínez-Gregorio и соавт., 2022)

Выведение животных из эксперимента и забор материала

Для гистологического, гистохимического и ИГХ исследований ободочной кишки мышей ее извлекали из брюшной полости, вскрывали аналогично способу, подробно охарактеризованному в разделе 2.2.3, разделяли на три отдела – проксимальный, медиальный и дистальный, фиксировали в 10%-ном нейтральном забуференном формалине («Биовитрум», Россия) в течение 24 ч. Забирали БЛУ и фиксировали в 10%-ном нейтральном забуференном формалине в течение 24 ч.

Для клинического анализа кровь забирали из шейных вен в пробирки с антикоагулянтом (K3-ЭДТА).

Гистологическое и морфометрическое исследование

Для морфологического и морфометрического исследования ободочную кишку после проводки по спиртам (раздел 2.2.2) заливали в парафин, готовили ступенчато-серийные гистологические срезы (от 8 до 12 срезов) с шагом 200 мкм, окрашивали их гематоксилином и эозином. Для оценки площади опухолей дистального отдела ободочной кишки фотографировали не менее 4 ступенчато-серийных гистологических срезов (x50), окрашенных гематоксилином и эозином, на микроскопе Axioplan 2 Imaging («Carl Zeiss», Германия). В программе Adobe Photoshop CS6 («Adobe», США) обводили границы опухолей (рис. 2.8). Далее в программе Image-

Pro Plus 6.0 («Media Cybernetics», США) определяли площадь выделенных опухолей, рассчитывали среднюю площадь опухолей для каждой мыши.

Рис. 2.8. Методика выделения зон опухоли для последующего измерения площади в программе Adobe Photoshop CS6 («Adobe», США)

С целью оценки наличия метастазов проводили морфологическое исследование БЛУ на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином.

Гистохимическое и морфометрическое исследования

Для выявления бокаловидных клеток в слизистой оболочке ободочной кишки проводили окрашивание срезов альциановым синим при pH 1.0 по Моури («HistoLine», Россия). Фотографировали участки препарата (x200) с опухолевыми изменениями и без них на микроскопе Axioplan 2 Imaging («Carl Zeiss», Германия). В программе ImageJ (Research Services Branch of the National Institute of Mental Health, США) проводили бинаризацию снимков, устанавливая порог так, чтобы выделенными оказывались только бокаловидные клетки. 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.

Иммуногистохимическое и морфометрическое исследования

Для выявления эндокринных клеток в ободочной кишке проводили ИГХ исследование с использованием антител (Rabbit Anti-Mouse Polyclonal Anti-Chromogranin A antibody, ab15160,

«Abcam», Великобритания) к хромогранину А, который является их маркером (Facer et al., 1985). Вторичные антитела с флуоресцентной меткой Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (A11008, «Invitrogen», США) наносили на срезы, инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре во влажной камере. Для оценки числа эндокринных клеток на микроскопе Axioplan 2 Imaging («Carl Zeiss», Германия) фотографировали (х100) участки препаратов ободочной кишки вне опухолей и с опухолями. В программе ImageJ (Research Services Branch of the National Institute of Mental Health, США) измеряли площадь выделенного участка слизистой оболочки и подсчитывали число флуоресцирующих клеток на выделенном участке. Рассчитывали число хромогранин А-положительных клеток на мкм^2 площади слизистой оболочки.

Клинический анализ крови

В крови определяли число эритроцитов и лейкоцитов, абсолютное и относительное количество лимфоцитов, гранулоцитов и моноцитов, а также содержание гемоглобина с помощью автоматического гематологического анализатора Mindray BC-2800Vet (Китай). На основе показателей анализа крови рассчитывали индексы воспалительного ответа – соотношение лимфоцитов к моноцитам LMR и соотношение нейтрофилов к лимфоцитам NLR, а также SIRI – нейтрофилы×моноциты/лимфоциты (Pacheco-Barcia et al., 2020; Nøst et al., 2021; Kim et al., 2022).

Во второй части исследования использовали мышей C57Bl/6 (n=70), срок после введения АОМ был увеличен в два раза, до 140 сут. Через один месяц после определения устойчивости к гипоксии ВУ (n=17) и НУ (n=10) животным опытных групп моделировали КРР (рис. 2.9) путем внутрибрюшинного введения АОМ в дозе 10 мг/кг (Suzuki et al., 2015; Tanimura et al., 2021; Deng et al., 2022). Через 7 сут после инъекции АОМ мышам 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 в течение 14 сут, затем – 0,5%-ый ДСН 5 сут. Животных выводили из эксперимента путем цервикальной дислокации 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 в течение 140 сут они потребляли питьевую воду. Перед индукцией КРР, до и после каждого периода потребления ДСН, а также при выведении из эксперимента животных взвешивали.

В течение экспериментов по моделированию колит-ассоциированного КРР оценивали общее состояние животных, их двигательную активность, состояние шерстного покрова, наблюдали за характером стула. Анализировали динамику массы тела, частоту развития и площадь опухолей, проводили морфологическое исследование ободочной кишки, БЛУ, печени и

легких, а также морфологическое и морфометрическое исследование ободочной кишки, тимуса и селезенки. Проводили ПЦР в режиме реального времени, проточную цитофлуориметрию, ИФА, клинический анализ крови, гистохимическое и ИГХ исследование дистального отдела ободочной кишки.

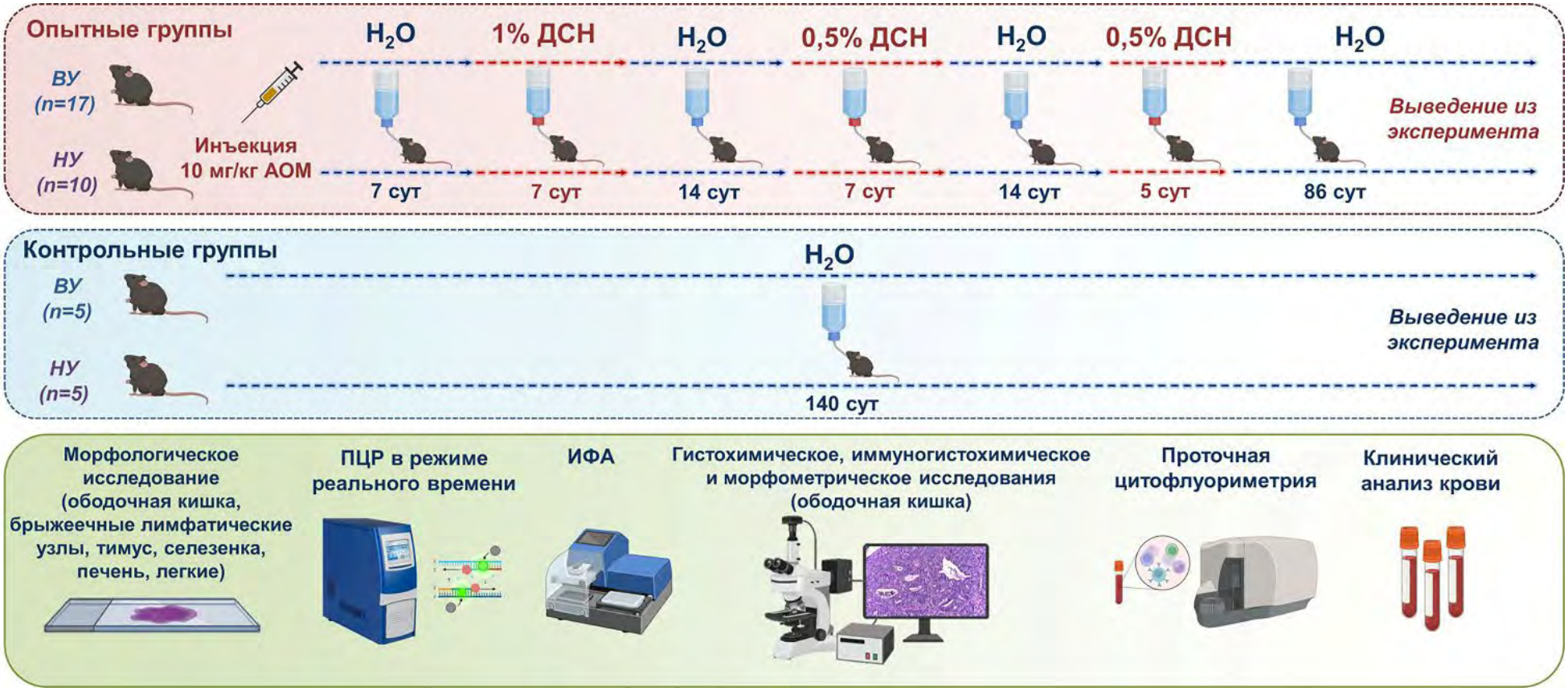


Рис. 2.9. Схема моделирования колит-ассоциированного КРР у ВУ и НУ мышей C57Bl/6 в течение 140 сут (по Y. Tanimura и соавт., 2021)

Выведение животных из эксперимента и забор материала

Для гистологического, гистохимического и ИГХ исследований ободочной кишки мышей ее извлекали из брюшной полости, вскрывали аналогично способу, подробно охарактеризованному в разделе 2.2.3., разделяли на три отдела – проксимальный, медиальный и дистальный, фиксировали в 10%-ном нейтральном забуференном формалине («Биовитрум», Россия) в течение 24 ч. Забирали БЛУ и фиксировали в 10%-ном нейтральном забуференном формалине («Биовитрум», Россия) в течение 24 ч. Тимус и селезенку извлекали и помещали в жидкость Буэна на 24 ч. Для оценки наличия метастазов забирали печень в жидкость Буэна и легкие в жидкость Карнуа.

Для клинического анализа и проточной цитофлуориметрии кровь забирали из шейных вен в пробирки с антикоагулянтом (К3-ЭДТА). Для получения сыворотки кровь забирали из шейных вен по протоколу, подробно охарактеризованному в разделе 2.2.1.

Для проточной цитофлуориметрии выделение клеток из БЛУ проводили с помощью гомогенизатора Поттера (Winter et al., 2019), а из дистального отдела ободочной кишки с помощью ферментативной обработки фрагментов ткани (Weigmann et al., 2007).

Для ПЦР исследования под контролем бинокуляра (х7) выделяли фрагменты ткани опухоли (участки полиповидных новообразований, которые значительно возвышались над поверхностью слизистой оболочки, и слегка приподнятые над поверхностью слизистой оболочки участки розового цвета, поверхность которых была зернистой) и перитуморальной зоны (фрагменты кишки на расстоянии 1 см от опухоли (Коса et al., 2024)), помещали в микроцентрифужные пробирки Eppendorf, содержащие 1 мл фиксатора РНК IntactRNA Reagent («Евроген», Россия), инкубировали в течение 24 ч при +4℃ и хранили при –70℃ не более двух месяцев.

Гистологическое и морфометрическое исследования

Гистологическое и морфометрическое исследования ободочной кишки проводили аналогично способу, подробно охарактеризованному выше в данном разделе для 70 сут после введения АОМ. С целью выявления метастазов проводили морфологическое исследование препаратов БЛУ, печени и легких, окрашенных гематоксилином и эозином.

Гистологическое и морфометрическое исследование тимуса и селезенки проводили аналогично разделу 2.2.3.

Гистохимическое исследование

При прогрессии злокачественных опухолей у большинства пациентов развивается анемия, связанная с опухолевым ростом (Natalucci et al., 2021). В основе ее патогенеза лежит воспалительная активация макрофагов, которая сопровождается увеличением синтеза провоспалительных цитокинов, в том числе IL-6. Провоспалительные цитокины активируют сигнальный путь JAK/STAT3 и индуцируют экспрессию гена и продукцию гепсидина – белка,

регулирующего всасывание и депонирование железа в кишке, его рециркуляцию и мобилизацию из печени (Macciò et al., 2015). Гепсидин связывается с белком-экспортером ферропортином и блокирует выход железа из эпителиальных клеток кишки, что приводит к снижению эффективности эритропоэза, а также накоплению железосодержащего пигмента гемосидерина в опухоли. Для анализа накопления железосодержащего пигмента гемосидерина в опухолях парафиновые срезы дистального отдела ободочной кишки окрашивали по Перлсу с контрастированием 3,3′-диаминобензидином (DAB) и H_2O_2 (Meguro et al., 2003). Для этого срезы дистального отдела ободочной кишки депарафинировали, инкубировали в растворе (pH 0.5-0.6), содержащем 1% HCl и 1% ферроцианида калия, и промывали дистиллированной водой. Затем их обрабатывали смесью 0,3% H_2O_2 и 25% метанола, содержащей 0.01 M NaN_3, в течение 30 мин и контрастировали 0,025% DAB и 0,005% H_2O_2 в 0.1 M фосфатном буфере (pH 7.4) в течение 5 мин. После промывки в дистиллированной воде срезы докрашивали эозином.

Иммуногистохимическое исследование

Проводили ИГХ исследование дистального отдела ободочной кишки с использованием антител к EGFR (EGFR Rabbit pAb, A11577, «Abclonal», Китай). Депарафинировали гистологические срезы в трех сменах ксилола и спиртах нисходящей концентрации, затем с помощью кипячения в цитратном буфере (pH 6.0, 10 мМ цитрата натрия, 0,05% Tween 20) в течение 15 мин в микроволновой печи (мощность 800W) проводили восстановление эпитопов антигенов. После остывания срезы дважды промывали в растворе PBS в течение 20 мин. Эндогенную пероксидазу инактивировали 3%-ным раствором H_2O_2 в течение 10 мин, отмывали в двух сменах PBS. Использовали коммерческий раствор синтетического полимера, сцепленного с пероксидазой хрена – N-Histofine Simple Stain Mouse MAX PO (R) («Nichirei Bioscience Inc.», Япония) в качестве вторичных антител. Связывание антител выявляли с помощью набора N-Histofine DAB-2V («Nichirei Bioscience Inc.», Япония).

Выделение РНК, постановка обратной транскрипции и полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

Для исследования взаимосвязи устойчивости к гипоксии, инициации и прогрессии колит-ассоциированного КРР и воспаления оценивали экспрессию генов, регулирующих ответ на гипоксию – *Hif1a*, *Epas1*, *Hif3a, Vegf,* воспаление – *Nfkb*, *Il1b*, *Il6*, *Tnfa*, *Il10*, *Tgfb,* клеточный цикл и апоптоз – *Trp53*, *Pten*, *Cmet, Egf*, *Egfr*, *Pcna*, *Mki67*, *Bax, Bcl2,* а также генов, кодирующих компоненты эпителиального барьера – *Muc1*, *Muc13*, *Cldn2* и *Cldn7* в дистальном отделе ободочной кишки (фрагменты опухоли и ткани кишки из перитуморальной зоны) методом ПЦР в режиме реального времени относительно уровня экспрессии *Gapdh*.

Выделение РНК и последующую обратную транскрипцию, необходимую для проведения ПЦР, проводили с использованием коммерческих наборов RNA Solo («Евроген», Россия) и MMLV RT Kit (Евроген», Россия), соответственно.

С помощью гомогенизатора TissueLyser LT («Qiagen», Германия) образцы тканей массой около 10 мг гомогенизировали в лизирующем буфере, состоящем из 200 мкл прилагаемого к набору раствора А и 2 мкл β-меркаптоэтанола в течение 4 мин при 50 Гц. Затем гомогенат ткани в лизирующем растворе инкубировали в течение 7 мин при +56°С, центрифугировали 4 мин при 11000g. По окончании центрифугирования к супернатанту добавляли по 100 мкл раствора В, прилагаемого к набору, вортексировали, центрифугировали 10 мин при тех же условиях. Супернатант переносили в новую пробирку, добавляли 1000 мкл раствора С, прилагаемого к набору, вортексировали. После центрифугирования смеси в течение 10 мин, отбирали супернатант, добавляли 700 мкл промывочного раствора, центрифугировали пробирку в течение 5 мин, удаляли остатки жидкости, после чего в течение 2 мин при +37°С высушивали осадок. К высушенному осадку добавляли раствор ДНКазы в количестве 50 мкл (42 мкл воды, свободной от РНКаз, 5 мкл реакционного буфера и 3 мкл ДНКазы rDSN – рекомбинантной дуплекс-специфической нуклеазы), пипетировали осадок, инкубировали в течение 10 мин при +37°С. После инкубации наносили смесь на колонки и центрифугировали с раствором С, а затем с промывочным раствором – дважды переносили колонку в чистую пробирку и вносили 700 мкл промывочного раствора, центрифугировали 15 с. В третий раз центрифугировали в течение 1 мин, наносили на колонку 50 мкл воды, свободной от РНКаз, и центрифугировали для получения выделенной и очищенной РНК. Оценку чистоты и концентрации выделенной РНК проводили на приборе NanoPhotometer N60/N50 («Implen», Германия). Образцы хранили при –70°С.

Обратную транскрипцию тотальной РНК с использованием набора MMLV RT Kit («Евроген», Россия), ПЦР в режиме реального времени с использованием qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Россия) и анализ результатов проводили по методикам, подробно охарактеризованным в разделе 2.2.1. Использовали праймеры, синтезированные фирмой «Евроген» (Россия), представленные в табл. 2.6 Приложения 5, в качестве референсного гена был выбран *Gapdh* (Kozera и Rapacz, 2013).

Выделение клеток из ободочной кишки и брыжеечных лимфатических узлов

По методике B. Weigmann и соавт. (2007), в основе которой лежит ферментативная обработка фрагментов ткани диспазой и коллагеназой с последующей фильтрацией клеток через 100 мкм и 40 мкм клеточные фильтры, проводили выделение клеток из дистального отдела ободочной кишки. Фрагменты дистального отдела ободочной кишки инкубировали в растворе культуральной среды 199 с солями Хэнкса, глутамином («ПанЭко», Россия), ЭДТА и DTT (Dithiothreitol, «Sigma Aldrich», США), затем в культуральной среде 199 с солями Хэнкса и

глутамином («ПанЭко», Россия), содержащей коллагеназу Д («Roche», Швейцария), выделенную из *Clostridium histolyticum*, диспазу 2 («Roche», Швейцария), полученную из *Bacillus polymyxa*, ДНКазу 1 («Thermo Scientific», США).

Выделение клеток из БЛУ проводили с помощью гомогенизатора Поттера (Winter et al., 2019).

Количество клеток определяли на счетчике клеток TC20 Cell Counter («Bio-Rad», США).

Клинический анализ крови

В крови определяли число эритроцитов и лейкоцитов, абсолютное и относительное количество лимфоцитов, гранулоцитов и моноцитов, содержание гемоглобина, а также эритроцитарные индексы (средний объем эритроцита – MCV (Mean Corpuscular Volume), среднее содержание гемоглобина в эритроците – MCH (Mean Corpuscular Hemoglobin)) на автоматическом гематологическом анализаторе Mindray BC-2800Vet (Китай). На основе показателей анализа крови рассчитывали индексы CBO – LMR и NLR, а также SIRI (Pacheco-Barcia et al., 2020; Nøst et al., 2021; Kim et al., 2022; Yang et al., 2025).

Проточная цитофлуориметрия

Методом проточной цитофлуориметрии на приборе Cytomics FC 500 («Beckman Coulter», США) определяли субпопуляционный состав клеток периферической крови, опухолей дистального отдела ободочной кишки и БЛУ. Для анализа клеток использовали антитела, конъюгированные с флуорофорами PE, PE-Cy5, PE-Cy7, FITC, 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) фирмы «eBioscience» (США). Гейтирование лимфоцитов и моноцитов осуществляли по их морфологии по FSC и SSC, так как использовали свежий материал без фиксации, после получения материала и до проведения исследования на проточном цитофлуориметре проходило не более 4-6 ч, клетки постоянно находились при комнатной температуре, а также проводили полное лизирование эритроцитов (Esgalhado et al., 2020). Лизис эритроцитов в образцах цельной крови осуществляли с помощью раствора OptiLyse C Lysis Solution («Beckman Coulter», США) в течение 10 мин в темноте при комнатной температуре. Пробы для исследования внутриклеточных маркеров обрабатывали с помощью коммерческого набора для фиксации и пермеабилизации клеток IntraPrep Permeabilization Reagent («Beckman Coulter», США) согласно инструкции производителя.

Иммуноферментный анализ

Методом ИФА определяли содержание СРБ и HIF-1α в сыворотке крови с использованием высокочувствительных наборов «Cloud-Clone Corp.» (Китай) и «FineTest» (Китай)

соответственно, по протоколам производителей. Интенсивность цветовой реакции определяли на микропланшетном ИФА-анализаторе ANTHOS 2010 («Anthos Labtec Instruments», Австрия).

2.2.5. Морфологические, иммуногистохимические и молекулярно-биологические особенности прогрессии глиобластомы 101.8 у ВУ и НУ самцов крыс Вистар

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 у экспериментальных животных модель глиобластомы 101.8 – злокачественной диффузной глиомы головного мозга, полученной в Уникальной научной установке «Коллекция экспериментальных опухолей нервной системы и нейральных опухолевых клеточных линий» в НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына путем интракраниального введения крысам Вистар 7,12-диметилбенз[а]антрацена (ДМБА) в головной мозг (Яблоновская и Спрышкова, 1967). Тканевые фрагменты опухоли хранят в жидком азоте, опухоль поддерживают методом интракраниальных пассажей крысам Вистар (Авцын и соавт., 1993; Халанский и Кондакова, 2013). Воспроизводимость опухоли составляет 95-100%.

Данное исследование проведено в осенне-зимний период 2021-2022 гг. Через один месяц после определения устойчивости к гипоксии ВУ (n=13) и НУ (n=24) крыс Вистар наркотизировали внутрибрюшинным введением 10 мг/кг Золетила 100 («Virbac Sante Animale», Франция) и 10 мг/кг ксилазина, кожу головы обрабатывали 70%-ым этиловым спиртом и 5%-ым спиртовым раствором йода. Кожу теменной области головы крыс обрабатывали 1%-ым раствором гидроксиметилхиноксилиндиоксида (Диоксидин, «Новосибхимфарм», Россия) и справа от срединной линии делали продольный разрез длиной 10 мм. В правой теменной кости черепа стоматологическим бором диаметром 1,5 мм делали отверстие на расстоянии 2 мм от сагиттального шва (*Sutura sagittalis*) и 2 мм каудально от венечного шва (*Sutura coronalis*). С соблюдением правил асептики и антисептики проводили трансплантацию выделенной ткани опухоли (1×10^6 опухолевых клеток) на глубину 4 мм от поверхности кости, что соответствует области полосатого тела (Steiniger et al., 2004). Для закрытия разреза кожи головы использовали хирургический клей Turbo 2000 Kleber Universal («Boldt&Co», Германия).

По данным T. Hekmatara 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. На 14-15 сут после трансплантации глиобластомы 101.8 у максимального числа животных развиваются опухоли достаточного для сравнения их объемов размера (Gelperina et al., 2010; Wohlfart et al., 2011; Alekseeva et al., 2023). Чтобы выявить различия в динамике развития опухолей у животных с

разной устойчивостью к гипоксии крысы были случайным образом распределены на две подгруппы. ВУ (n=7) и НУ (n=13) крыс Вистар первой подгруппы выводили из эксперимента на 11-е сут после трансплантации глиобластомы 101.8, а ВУ (n=6) и НУ (n=11) животных второй подгруппы – на 15-е сут (рис. 2.10).

Оценивали гибель животных, выраженность клинических проявлений, изменения массы тела, проводили морфологическое и морфометрическое исследование опухолей, а также ИГХ исследование пролиферативной активности опухолевых клеток. Оценивали абсолютное число визуализируемых кровеносных сосудов и площадь некрозов в опухолях. Определяли содержание HIF-1α, а также провоспалительных цитокинов IL-1β и TNF-α в сыворотке крови.

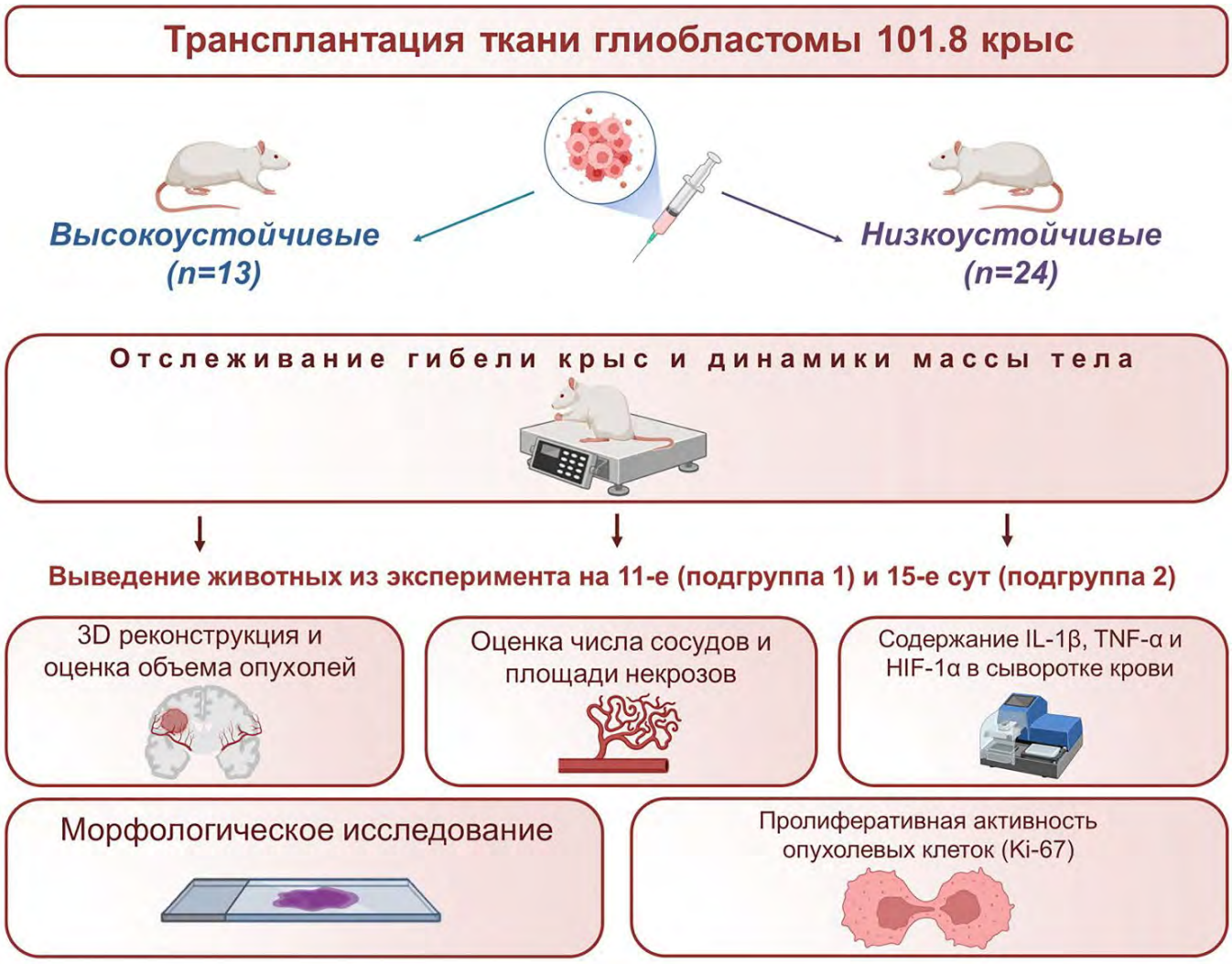


Рис. 2.10. Схема моделирования глиобластомы 101.8 у ВУ и НУ крыс Вистар

Оценка гибели, клинических проявлений и динамики массы тела

В течение исследования регистрировали развитие клинических проявлений заболевания (вялость, уменьшение двигательной активности, взъерошенность шерстного покрова, парез и паралич конечностей) и гибель животных. Измерение массы тела проводили в начале эксперимента – перед трансплантацией глиобластомы (0 сут), за день до выведения из

эксперимента (10-е сут для первой подгруппы и 14-е для второй подгруппы), животным из второй подгруппы дополнительно измеряли массу тела на 10-е сут после трансплантации глиобластомы.

Выведение из эксперимента и забор материала

Головной мозг извлекали и фиксировали в 10%-ном нейтральном забуференном формалине («Биовитрум», Россия) в течение 48 ч.

Проводили забор крови из шейных вен, для ИФА получали сыворотку по методике, охарактеризованной в 2.2.1.

Гистологическое и морфометрическое исследования, 3D реконструкция опухолей

Изготавливали ступенчато-серийные фронтальные гистологические срезы головного мозга толщиной 4-5 мкм с шагом 200 мкм и окрашивали их гематоксилином и эозином («Биовитрум», Россия). На планшетном сканере получали электронные копии изображений гистологических срезов с разрешением 1200 dpi. На основе сканированных изображений ступенчато-серийных гистологических срезов (от 16 до 65 срезов) с помощью программного обеспечения Image-Pro Premiere 3D («Media Cybernetics», США) получали 3D изображения опухолей головного мозга. Количественную оценку размеров опухолей проводили по методике В.А. Мхитарова и соавт. (2015): вычисляли размер вокселя (Vx) по формуле: $Vx = X \times Y \times Z$, где X и Y – размер пикселя в мкм, а Z – шаг между срезами (толщина среза + расстояние до следующего среза в мкм).

На гистологических препаратах головного мозга методом точечного счета подсчитывали абсолютное число визуализируемых кровеносных сосудов в опухоли (х200). Площадь некрозов в опухоли оценивали с помощью программы ImageScope M («Leica Microsystems», Австрия) в интерактивном режиме с использованием камеры Leica DFC290 («Leica Microsystems», Австрия). Измерения проводили на всей площади гистологического среза, результаты выражали в мкм^2.

Иммуногистохимическое исследование

Предметные стекла с парафиновыми срезами головного мозга помещали в термостат (+37°С) на ночь для расплавления парафина, затем срезы депарафинировали в трех сменах 100% ксилола (по 10 мин), регидратировали в серии этиловых спиртов убывающей концентрации (100%, 70%, 50%) по 10 мин в каждом, промывали в дистиллированной воде в течение 2 мин. С помощью кипячения гистологических срезов в цитратном буфере (pH 6.0, 10 мМ цитрата натрия, 0,05% Tween 20) в течение 15 мин в микроволновой печи (мощность 800W) проводили восстановление эпитопов антигенов. После остывания срезы дважды промывали в растворе PBS в течение 20 мин. Неспецифическое связывание блокировали 0,1%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина в PBS в течение 20 мин. Реакцию с первичными антителами к маркеру пролиферации белку Ki-67 (Rabbit Polyclonal Anti-Ki67 antibody, ab15580, «Abcam», Великобритания) в концентрации 1:200 проводили во влажной камере при +4°С в течение ночи. Отмывали в двух сменах PBS по 5 мин. В качестве контроля реакции использовали срезы без

первичных антител. Добавляли вторичные антитела с флуоресцентной меткой Goat Anti-Rabbit IgG H&L Alexa Fluor 488 (ab150077, «Abcam», Великобритания) в концентрации 1:200, инкубировали в течение 1 ч во влажной камере при комнатной температуре в темноте. Отмывали в двух сменах PBS по 5 мин. Ядра окрашивали DAPI («Sigma-Aldrich», США) в течение 10 мин во влажной камере при комнатной температуре в темноте. Отмывали в двух сменах PBS по 5 мин. Срезы заключали в смесь глицерина и PBS. С помощью флуоресцентного микроскопа Axioplan 2 Imaging («Carl Zeiss», Германия) в двух каналах (длина волны возбуждения 488 нм и 358 нм) получали цифровые изображения периферических зон опухолей, в которых отсутствовали некрозы и кровоизлияния (пять полей зрения, х200). В программе ImageJ (Research Services Branch of the National Institute of Mental Health, США) объединяли снимки с двух каналов. Подсчитывали общее число ядер опухолевых клеток и число ядер, содержащих Ki-67. Рассчитывали процент Ki-67-положительных опухолевых клеток по отношению к общему числу опухолевых клеток.

Иммуноферментный анализ

Методом ИФА определяли содержание в сыворотке крови провоспалительных цитокинов IL-1β и TNF-α («Cloud-Clone Corp.», Китай), а также HIF-1α («FineTest», Китай) в соответствии с инструкциями производителей. Для определения интенсивности цветовой реакции использовали микропланшетный ИФА-анализатор ANTHOS 2010 («Anthos Labtec Instruments», Австрия).

2.2.6. Морфологические и молекулярно-биологические особенности прогрессии карциномы легких Льюис у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6

Данное исследование проведено в осенне-зимний период 2023-2024 гг. Карцинома легких Льюис (LLC) является одной из наиболее воспроизводимых моделей метастазирования (Skurikhin et al., 2024) и изначально получена у мышей C57Bl/6, поэтому в этой части работы использовали мышей C57Bl/6. ВУ (n=30) и НУ (n=27) животным опытных групп под золетиловым наркозом (5 мг/кг Золетил 100, «Virbac Sante Animale», Франция) проводили введение клеток карциномы легких Льюис (LLC1, из коллекции CLS – «Cell Line Service», Эппельхайм, Германия). Суспензию опухолевых клеток вводили подкожно, в область правой подмышечной впадины, в количестве 5×10^6 клеток в 100 мкл PBS (Skurikhin et al., 2024). Масса тела животных на момент трансплантации опухолевых клеток составляла 22-26 г. ВУ (n=8) и НУ (n=5) мышам контрольных групп подкожно вводили физиологический раствор. ВУ (n=12) и НУ (n=12) животных первой подгруппы выводили из эксперимента на 21-е сут после введения опухолевых клеток, а ВУ (n=14) и НУ (n=12) мышей второй подгруппы – на 28-е сут. ВУ (n=8) и НУ (n=5) животных контрольных групп выводили из эксперимента на 28-е сут после введения мышам опытных групп опухолевых клеток (рис. 2.11). Сроки выведения из эксперимента были

выбраны в соответствии с литературными данными (Chou et al., 2012; Suzuki et al., 2014; Wu et al., 2020), а также данными предварительных экспериментов, для выявления метастазов в легких и сравнительной оценки их площади у ВУ и НУ мышей.

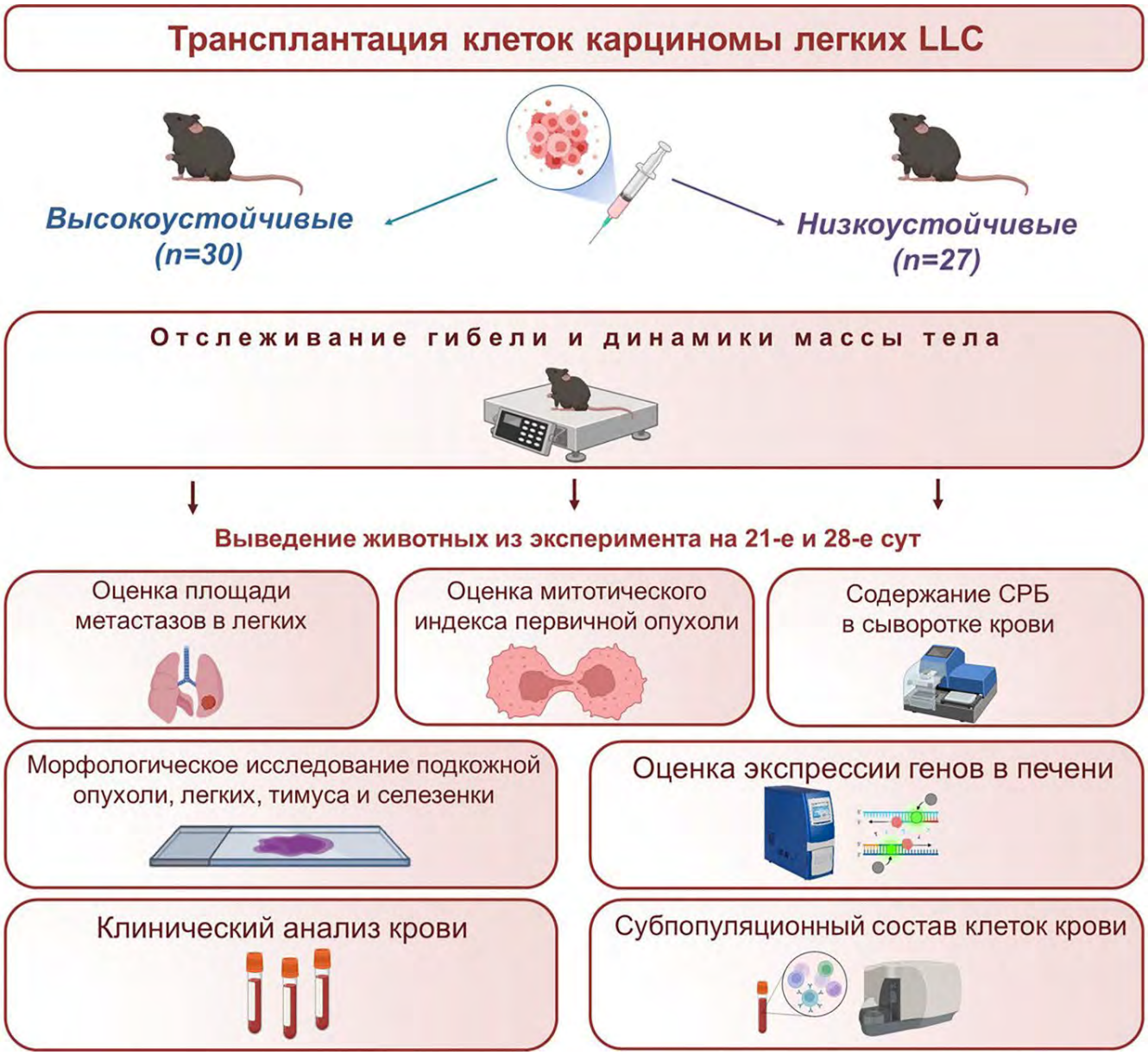


Рис. 2.11. Схема моделирования карциномы легких у ВУ и НУ мышей C57Bl/6

В ходе эксперимента отслеживали изменение массы тела и гибель животных. Оценивали массу и объем опухолей, пролиферативную активность опухолевых клеток, площадь метастазов в легких, проводили клинический анализ крови, морфологическое исследование подкожных опухолей, легких, тимуса и селезенки, определяли содержание СРБ в сыворотке крови, экспрессию генов *Hif1a*, *Nfkb*, *Tnfa, Il1b* и *Tgfb* в печени, субпопуляционный состав клеток периферической крови.

Культивирование клеток карциномы легких

Перед культивированием клетки размораживали в CO_2-инкубаторе при 5% CO_2 и +37°С. Для удаления диметилсульфоксида (ДМСО) проводили центрифугирование при 200g в течение 3 мин, удаляли супернатант и добавляли к клеткам 1 мл культуральной среды RPMI (RPMI-1640 Medium, «Thermo Fisher Scientific», США) с 50 ед/мл пенициллина («ПанЭко», Россия). Клетки ресуспендировали, повторно центрифугировали в течение 7 мин. В данном режиме клетки центрифугировали дважды, после каждого центрифугирования удаляли супернатант, добавляли 1 мл среды и ресуспендировали клетки. После последнего центрифугирования отбирали супернатант и ресуспендировали клетки в 200 мкл среды. В культуральные флаконы с площадью поверхности 25 $см^2$ добавляли 5 мл полной культуральной среды RPMI-1640 (с фетальной телячьей сывороткой «HiMedia Laboratories Pvt. Limited», Индия), после чего добавляли 100 мкл клеток LLC. Клетки LLC культивировали в CO_2-инкубаторе (при 5% CO_2 и +37°С) в течение 1-2 сут.

Для отделения клеток от поверхности пластика их обрабатывали раствором 0,25% трипсина и Версена («ПанЭко», Россия). Перед работой растворы разогревали до +37°С, после чего в стерильной пробирке готовили раствор из трипсина и Версена, смешивая их в соотношении 1:1. Из культуральных флаконов отбирали среду, добавляли 4 мл раствора трипсина и Версена на флакон, после чего инкубировали в течение 5 мин при +37°С и с помощью микроскопа оценивали состояние и количество ошаренных клеток. Раствор, содержащий снятые клетки, переносили в пробирку объемом 15 мл, центрифугировали в течение 7 мин при 1000 об/мин. По завершении центрифугирования супернатант удаляли, а к клеткам добавляли 300 мкл PBS для приготовления суспензии, которую в дальнейшем использовали для инъекции клеток LLC животным. Подсчет и оценку жизнеспособности клеток с помощью окрашивания трипановым синим («ПанЭко», Россия) проводили в камере Горяева. Жизнеспособность клеток составляла 96-98%.

Трансплантация клеток карциномы легких мышам C57Bl/6

Клетки в суспензии, полученные после культивирования, разводили раствором PBS для получения необходимой для инъекции концентрации: 5 млн клеток карциномы легких Льюис в 100 мкл PBS. Перед перевивкой опухолевых клеток ВУ и НУ экспериментальным животным, проводили у мышей три пассажа опухолевых клеток, так как это позволяет увеличить вероятность метастазирования в легкие (Cai et al., 2008). Для 1-3 пассажей инъекцию клеток LLC мышам проводили подкожно, в мягкие ткани боковой области живота, под золетиловым наркозом (5 мг/кг Золетил 100, «Virbac Sante Animale», Франция). При достижении первичными подкожными опухолями размера 1 $см^3$, животных умерщвляли путем цервикальной дислокации, выделяли опухоли (Zhao et al., 2018; Reichard и Asosingh, 2019), помещали их в диссоциирующую среду (1 мг/мл коллагеназы II («Gibco», «Thermo Fisher», США), 10 мкл $CaCl_2$ в концентрации 10

мг/мл, 1% фетальной телячьей сыворотки («HiMedia Laboratories Pvt. Limited», Индия)) и перевивали мышам. Введение опухолевых клеток также осуществляли подкожно, в мягкие ткани боковой области живота, в количестве 5 млн клеток LLC в 100 мкл PBS.

После трех пассажей опухолевых клеток у мышей, выделяли подкожные опухоли, отделяя их от окружающих тканей при помощи пинцета и ножниц, после чего помещали в пробирку с культуральной средой RPMI-1640. Готовили суспензию одиночных клеток: опухолевую ткань измельчали в небольшом количестве питательной среды, дожидались осаждения кусочков ткани, после чего удаляли супернатант. Готовили диссоциирующую среду. На 3 мл раствора PBS: 1 мг/мл коллагеназы II (всего – 3 мг) («Gibco», «Thermo Fisher», США), 10 мкл $CaCl_2$ (концентрация 10 мг/мл), 1% фетальной телячьей сыворотки («HiMedia Laboratories Pvt. Limited», Индия). В пробирку с измельченной тканью добавляли диссоциирующую среду. Инкубировали клетки с диссоциирующей средой в термостате при +37°С в течение 40 мин, перемешивая суспензию каждые 10 мин. По завершении инкубации клетки пипетировали, пропускали суспензию клеток через фильтр с размером ячейки 40 мкм, фильтр периодически промывали раствором PBS. Перемещали клетки в пробирку объемом 15 мл. Используя PBS, доводили количество жидкости в пробирке до 14 мл, после чего добавляли 500 мкл сыворотки для инактивации ферментов. Дважды центрифугировали суспензию при 1000 об/мин в течение 10 мин. После приготовления суспензии клеток из ткани опухоли проводили оценку жизнеспособности клеток с помощью окрашивания трипановым синим («ПанЭко», Россия), а также подсчет клеток в камере Горяева для последующего получения необходимой концентрации клеток LLC для последующего введения экспериментальным животным. Жизнеспособность клеток составляла 96-98%. Трансплантацию клеток карциномы Льюис экспериментальным ВУ и НУ мышам проводили после механического измельчения ткани опухоли в питательной среде и фильтрации измельченной ткани через фильтр с размером ячейки 40 мкм.

Выведение животных из эксперимента, забор материала

Для гистологического исследования извлекали подкожный опухолевый узел, правое и левое легкие, печень, тимус и селезенку. Измеряли массу и объем подкожного опухолевого узла. Подкожный опухолевый узел фиксировали в 10%-ном нейтральном забуференном формалине («Биовитрум», Россия) в течение 72 ч, легкие – в жидкости Карнуа в течение 2 ч, печень, тимус и селезенку – в жидкости Буэна в течение 24 ч.

Для клинического анализа и проточной цитофлуориметрии кровь забирали из шейных вен в пробирки с антикоагулянтом (К3-ЭДТА). Для ИФА получали сыворотку, для ПЦР исследования – фрагменты печени по методикам, подробно охарактеризованным в разделе 2.2.1.

Гистологическое и морфометрическое исследования

После фиксации осуществляли гистологическую проводку и изготовление срезов аналогично способу, охарактеризованному в разделе 2.2.2. Для исследования площади метастазов готовили ступенчато-серийные гистологические срезы легких (от 8 до 12 срезов) с шагом 200 мкм, окрашивали их гематоксилином и эозином. Гистологическое и морфометрическое исследования тимуса осуществляли аналогично способу, охарактеризованному в разделе 2.2.3, проводили гистологическое исследование селезенки.

В препаратах первичного опухолевого узла определяли митотический индекс опухолевых клеток – оценивали количество митозов на тысячу клеток (‰) при х1000. В соответствии с рекомендациями Е.Ф. Лушникова и А.Ю. Абросимова (2001), подсчет митозов проводили в периферических зонах опухоли на расстоянии от зон некроза и кровоизлияний.

У животных, в легких которых были выявлены метастазы, проводили подсчет их площади в программе ImageJ (Research Services Branch of the National Institute of Mental Health, США) на ступенчато-серийных гистологических срезах. Измерения проводили во всех полях зрения (х50), где были обнаружены метастазы, после чего вычисляли общую площадь метастазов в мкм^2.

Выделение РНК, постановка обратной транскрипции и полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

Фиксацию фрагментов печени, выделение РНК, обратную транскрипцию, ПЦР в режиме реального времени и обработку результатов проводили по методике, подробно охарактеризованной в разделе 2.2.1, с использованием *Gapdh* в качестве референсного гена (Kozera и Rapacz, 2013). Определяли уровни экспрессии генов *Hif1a*, *Nfkb*, *Tnfa, Il1b* и *Tgfb*. Использовали праймеры, синтезированные фирмой «Евроген» (Россия), представленные в табл. 2.6 Приложения 5.

Клинический анализ крови

Клинический анализ крови проводили аналогично охарактеризованному в разделе 2.2.4.

Проточная цитофлуориметрия

Проводили анализ субпопуляционного состава клеток периферической крови мышей методом проточной цитофлуориметрии на приборе Cytomics FC 500 («Beckman Coulter», США).

Для анализа субпопуляционного состава клеток периферической крови методом проточной цитометрии применяли антитела («eBioscience», США), конъюгированные с флуорофорами PE, PE-Cy5, PE-Cy7 и FITC, к CD3e-CD19+ (B-лимфоциты), CD3e+CD4+ (Т-хелперы), CD3e+CD8a+ (цитотоксические Т-лимфоциты), CD3e-NK1.1+ (NK клетки), CD11b+ (моноциты). Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток крови антителами проводили аналогично методике, подробно охарактеризованной в разделах 2.2.3 и 2.2.4.

Иммуноферментный анализ

Методом ИФА определяли содержание СРБ в сыворотке крови мышей с использованием набора «Cloud-Clone Corp.» (Китай) согласно инструкции производителя. Для определения интенсивности цветовой реакции использовали микропланшетный фотометр AMR-100 («Allsheng», Китай).

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

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

Для этой части работы в качестве экспериментальных животных были выбраны крысы Вистар (n=50), так как при работе с ними возможно проводить забор достаточного количества крови из хвостовой вены, при этом взятие крови можно повторить несколько раз с интервалом в 2-4 недели (Васильева и соавт., 2022; Петрова, 2024). Исследование проведено в осенне-зимние периоды 2022-2023 и 2023-2024 гг.

У ВУ (n=12) и НУ (n=13) животных выделяли моноциты периферической крови, получали неактивированные и активированные ЛПС макрофаги (рис. 2.12). Оценивали иммунофенотип макрофагов с помощью проточной цитофлуориметрии, экспрессию генов *Tnfa, Il1b, Il6, Il10, Tgfb, Nos2, Hif1a, Epas1* и *Vegf* относительно *Gapdh* методом ПЦР в режиме реального времени, содержание белков VEGF, iNOS, хемокинового рецептора CCR7 (C-C Chemokine Receptor type 7) и HGF относительно GAPDH методом Вестерн-блоттинга, содержание HIF-1α в культуральной жидкости методом ИФА.

Выделение моноцитов периферической крови

Через один месяц после определения устойчивости к гипоксии у ВУ и НУ крыс Вистар под золетиловым наркозом (5 мг/кг Золетил 100, «Virbac Sante Animale», Франция) проводили забор 2 мл крови из хвостовой вены для получения культуры макрофагов. Кровь смешивали с раствором Хенкса («ПанЭко», Россия), содержащим 1000 МЕ/мл гепарина («Синтез», Россия) в соотношении 1:1. Фракцию мононуклеарных клеток крови крыс выделяли методом градиентного центрифугирования с Фиколлом плотностью 1.09 («ПанЭко», Россия) при 400g и +4°С в течение 30 мин (Jaatinen и Laine, 2007; Pösel et al., 2012; Lokhonina et al., 2019). Клетки дважды отмывали раствором Хенкса («ПанЭко», Россия) при 350g и +4°С в течение 20 мин. Число клеток и их жизнеспособность оценивали с помощью окрашивания трипановым синим («ПанЭко», Россия) и счетчика клеток TC20 Cell Counter («Bio-Rad», США). Жизнеспособность клеток составила 95-97%.

Рис. 2.12. Схема исследования молекулярно-биологических особенностей макрофагов у ВУ и НУ крыс Вистар

Культивирование макрофагов

Полученные клетки помещали в культуральную среду RPMI-1640 («ПанЭко», Россия) с 10% фетальной телячьей сыворотки («PAA Lab», Австрия), 1% пенициллина-стрептомицина («ПанЭко», Россия) и 50 нг/мл фактора роста макрофагов MCSF (Macrophage Colony Stimulating Factor, «Cloud-Clone Corp.», Китай), и культивировали в условиях CO_2-инкубатора при 5% CO_2 и +37°C. Через 24 ч культуральную среду заменяли на аналогичную новую и таким образом удаляли не прикрепившиеся клетки, проводили инкубацию клеток в течение 24 ч для получения культуры неактивированных макрофагов. Макрофаги отделяли от культурального флакона с помощью скребка для клеток («NEST», Китай). Число клеток и их жизнеспособность оценивали с помощью окрашивания трипановым синим («ПанЭко», Россия) и счетчика клеток TC20 Cell Counter («Bio-Rad», США). Жизнеспособность клеток составила 95-97%.

Активация макрофагов липополисахаридом in vitro

Для активации макрофагов по провоспалительному фенотипу через 24 ч после получения моноцитов среду заменяли на аналогичную новую и добавляли в нее ЛПС *E. coli* O26:B6 («Sigma-Aldrich», США) в конечной концентрации 50 нг/мл, рекомендованной S. Raza и соавт. (2014), S. Mommert и соавт. (2020), K. Wang и соавт. (2023) для провоспалительной активации макрофагов. Клетки культивировали в условиях CO_2 инкубатора (+37°C, 5% CO_2) в течение 24 ч. Макрофаги отделяли от поверхности культурального флакона с помощью скребка для клеток («NEST», Китай), центрифугировали при 350g в течение 10 мин, ресуспендировали в 1 мл PBS («Miltenyi Biotec», Германия). Число клеток и их жизнеспособность оценивали с помощью окрашивания

трипановым синим («ПанЭко», Россия) и счетчика клеток TC20 Cell Counter («Bio-Rad», США). Жизнеспособность клеток составила 95-97%.

Проточная цитофлуориметрия

Методом проточной цитофлуориметрии оценивали иммунофенотип неактивированных и активированных ЛПС макрофагов ВУ и НУ крыс Вистар. Использовали следующие маркеры: CD11b – интегрин альфа-М, маркер макрофагов костномозгового происхождения; CD68 – общий пан-макрофагальный маркер; CD86 – костимулятор Т-лимфоцитов, маркер М1 макрофагов и CD163 – трансмембранный белок-регулятор острой фазы, опосредующий эндоцитоз гаптоглобин-гемоглобиновых комплексов, маркер М2 макрофагов (Ельчанинов и Фатхудинов, 2023). После отделения от поверхности культурального флакона и подсчета числа клеток неактивированные и активированные ЛПС макрофаги центрифугировали при 350g в течение 10 мин, ресуспендировали 1×10^5 клеток в 100 мкл PBS («Miltenyi Biotec», Германия). Использовали антитела CD11b-PE («Miltenyi Biotec», Германия), CD68-PEVio770 («Miltenyi Biotec», Германия), CD86-VioBrightFITC («Miltenyi Biotec», Германия) и CD163-PE («Thermo Fisher», США). Анализ проводили на проточном цитофлуориметре Cytomics FC 500 с использованием программного обеспечения «CXP» («Beckman Coulter», США).

Выделение РНК, постановка обратной транскрипции и полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

После отделения от поверхности культурального флакона и подсчета числа клеток неактивированные и активированные ЛПС макрофаги центрифугировали при 350g в течение 10 мин, полученные осадки клеток фиксировали в RNAlater RNA Stabilization Reagent («Qiagen», Германия) и хранили при +4°C в течение 24 ч, затем замораживали и хранили при –70°C. Тотальную РНК выделяли с помощью RNeasy Plus Mini Kit («Qiagen», Германия) в соответствии с протоколом производителя как было охарактеризовано в разделе 2.2.1 с учетом материала для исследования – суспензии клеток. Чистоту (соотношение поглощения раствора при длинах волн 260/280) и концентрацию полученной РНК (по поглощению раствора при 260 нм) определяли с помощью прибора Nanodrop («Thermo Fisher Scientific», США). Обратную транскрипцию, ПЦР в режиме реального времени и анализ результатов проводили по методике, подробно охарактеризованной в разделе 2.2.1, с использованием *Gapdh* в качестве референсного гена (Kozera и Rapacz, 2013; Ren et al., 2022). Использовали праймеры, синтезированные фирмой «Евроген» (Россия) (табл. 2.7 Приложения 8).

Вестерн-блоттинг

Для проведения Вестерн-блоттинга неактивированные и активированные ЛПС макрофаги ВУ и НУ крыс Вистар лизировали в 100 мкл Protein Solubilization Buffer (PSB, «Biorad», США) с Protease Inhibitor Cocktail («Roche», США) и центрифугировали 30 мин при 14000g, +4°C.

Разделение белков проводили методом электрофореза по U.K. Laemmli (1970). Перенос белков осуществляли на 0.45 мкм нитроцеллюлозную мембрану («Millipore», США) с помощью Trans-Blot Turbo RTA MiniLF PVDF Transfer Kit («Bio-Rad», США). Сайты неспецифического связывания антител блокировали путем инкубации мембраны с EveryBlot Blocking Buffer («Bio-Rad», США) при комнатной температуре в течение 30 мин, затем проводили инкубацию с первичными антителами к iNOS (ab15323, 1:1000, «Abcam», Великобритания), HGF (sc-13087, 1:500, «Santa Cruz», США), VEGF (ab46154, 1:1000, «Abcam», Великобритания), CCR7 (ab32527, 1:1000, «Abcam», Великобритания) и GAPDH (sc-25778, 1:1000, «Santa Cruz», США) в течение 18 ч при +4°C на шейкер-качалке (200 об/мин). В течение 1 ч при комнатной температуре проводили окрашивание антивидовыми антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена («Bio-Rad», США). С использованием набора Novex ECL («Thermo Fisher Scientific», США) в гель-документирующей станции ChemiDoc XRS+ («Bio-Rad», США) осуществляли проявку мембраны. С помощью программного обеспечения ImageLab («Bio-Rad», США) анализировали интенсивность хемилюминесценции белков по сравнению с референсным белком GAPDH («Bio-Rad», США).

Иммуноферментный анализ

Культуральную жидкость неактивированных и активированных ЛПС макрофагов замораживали и хранили при –70°C не более одного месяца. Методом ИФА в культуральной жидкости неактивированных и активированных ЛПС макрофагов ВУ и НУ крыс Вистар определяли содержание HIF-1α («FineTest», Китай) в соответствии с инструкцией производителя. Для определения интенсивности цветовой реакции использовали микропланшетный ИФА-анализатор ANTHOS 2010 («Anthos Labtec Instruments», Австрия).

Оценка фагоцитарной активности моноцитов крови

Фагоцитарная активность моноцитов является важным показателем их функционального состояния. Активированные моноциты являются мощными эффекторами и запускают механизмы каскадных реакций, обеспечивающих развитие воспаления. Моноциты одними из первых мобилизуются в очаг воспаления, и от их фагоцитарной активности зависит элиминация возбудителя (Kolenchukova et al., 2020). По данным литературы гипоксическое воздействие способствует повышению фагоцитарной активности лейкоцитов (Wang и Liu, 2009). Позднее было показано, что *in vitro* воздействие гипоксии (0,5-3% O_2) в течение суток не влияет на фагоцитарную активность нейтрофилов здоровых добровольцев (Talla et al., 2019). При этом повышение фагоцитарной активности моноцитов в условиях гипоксии показано многими авторами (Anand et al., 2007; Martins et al., 2020). Поэтому мы исследовали различия фагоцитарной активности моноцитов у ВУ и НУ крыс Вистар (n=60) через один месяц после определения устойчивости к гипоксии в условиях *in vivo* и *ex vivo* недостатка кислорода.

Для моделирования гипоксического состояния (рис. 2.13, I) *in vivo* первую группу ВУ (n=6) и НУ (n=10) животных помещали в барокамеру на высоту 5000 м на 1 ч, затем проводили забор крови из хвостовой вены под золетиловым наркозом (5 мг/кг Золетил 100, «Virbac Sante Animale», Франция). Для моделирования гипоксического состояния *ex vivo* у второй группы ВУ (n=6) и НУ (n=10) крыс Вистар под золетиловым наркозом (5 мг/кг) получали 1 мл крови из хвостовой вены в пробирку с 15 МЕ/мл гепарина («Славянская аптека», Россия) и инкубировали 300 мкл крови в 4-луночных планшетах в течение 1 ч при +37°С в гипоксической камере для клеток при содержании 1% O_2, которое создавалось путем замещения воздуха азотом под контролем газоанализатора ПКГ-4 В («Эксис», Россия). В качестве контроля использовали кровь крыс Вистар, которую инкубировали в условиях нормоксии в CO_2-инкубаторе при 5% CO_2 и +37°С в течение 1 ч. Проводили оценку фагоцитарной активности моноцитов периферической крови в условиях нормоксии, после *in vivo* и *ex vivo* гипоксического воздействия методом проточной цитофлуориметрии с помощью набора IngoFlowEx kit («Exbio Diagnostics», Чехия).

Оценка спонтанной и стимулированной продукции цитокинов

В настоящее время широкое распространение получил метод оценки способности клеток крови к секреции цитокинов *ex vivo* (Дружинина и соавт., 2009). Активация клеток крови *ex vivo* является перспективным подходом для исследования иммунных реакций и воспроизводит условия, наиболее близкие к условиям *in vivo* (Chick et al., 2024; Müller et al., 2024). Например, стимуляция ЛПС клеток крови *ex vivo* приводит к продукции IL-1β (Tran et al., 2019; Chick et al., 2024; Müller et al., 2024).

Задачей следующих экспериментов было исследовать спонтанную и стимулированную воспалительными стимулами продукцию цитокинов клетками крови *ex vivo*. Клетки крови стимулировали комплексным митогеном – ЛПС *E. coli*, фитогемагглютинином (ФГА) и КонА. ФГА – лектин, полученный из красной фасоли (*Phaseolus vulgaris*), который обладает мощной клеточно-агглютинирующей и митогенной активностью, связывается с мембранами Т-лимфоцитов и стимулирует их метаболическую активность и пролиферацию (Movafagh et al., 2011). ЛПС активирует TLR4 на поверхности гранулоцитов, моноцитов и В-лимфоцитов (Kang et al., 2018; Lee et al., 2019). КонА – это лектин семян растения фасоли (*Canavalia ensiformis*), некаталитический белок, который обратимо связывает специфические углеводы (мономеры и олигомеры маннозы и глюкозы) с высокой специфичностью и умеренным сродством. Он действует как митоген, который активирует преимущественно Т-лимфоциты и вызывает продукцию ими цитокинов (Nonis et al., 2021; Lee et al., 2023). Таким образом, комплекс активаторов является митогеном, стимулирующим продукцию цитокинов лейкоцитами крови. Концентрации комплекса соответствуют таковым в тест-системе «Цитокин-Стимул-Бест» («Вектор-Бест», Россия), которая используется в клинической лабораторной практике для

исследования продукции цитокинов клетками крови у человека для оценки функционального состояния иммунной системы в физиологических условиях и при различных заболеваниях (Дружинина и соавт., 2009; Гольдерова и соавт., 2012; Kosyreva et al., 2023).

Через один месяц после гипоксического воздействия в барокамере у ВУ (n=6) и НУ (n=10) крыс Вистар (рис. 2.13, II) под золетиловым наркозом (5 мг/кг Золетил 100, «Virbac Sante Animale», Франция) проводили забор 1 мл крови из хвостовой вены в пробирку с 15 МЕ/мл гепарина («Славянская аптека», Россия). Из 1 мл крови отбирали две пробы по 100 мкл, в обе пробы добавляли 900 мкл культуральной среды DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) с L-глутамином, 5 мг/мл глюкозы и 100 мкг/мл гентамицина («ПанЭко», Россия) и 5% инактивированной телячьей фетальной сыворотки («Biosera», Мексика), во вторую пробу дополнительно добавляли ЛПС *E. coli*, ФГА и КонА в конечных концентрациях в 1 мл 2 мкг, 4 мкг и 4 мкг, соответственно («Sigma», США). Обе пробы инкубировали в течение 24 ч при 21% O_2, 5% CO_2 и +37°С. В культуральной жидкости методом ИФА с помощью наборов фирмы «Invitrogen» (США) определяли содержание провоспалительного цитокина IL-1β и противовоспалительного цитокина IL-10 на микропланшетном ИФА-анализаторе ANTHOS 2010 («Anthos Labtec Instruments», Австрия).

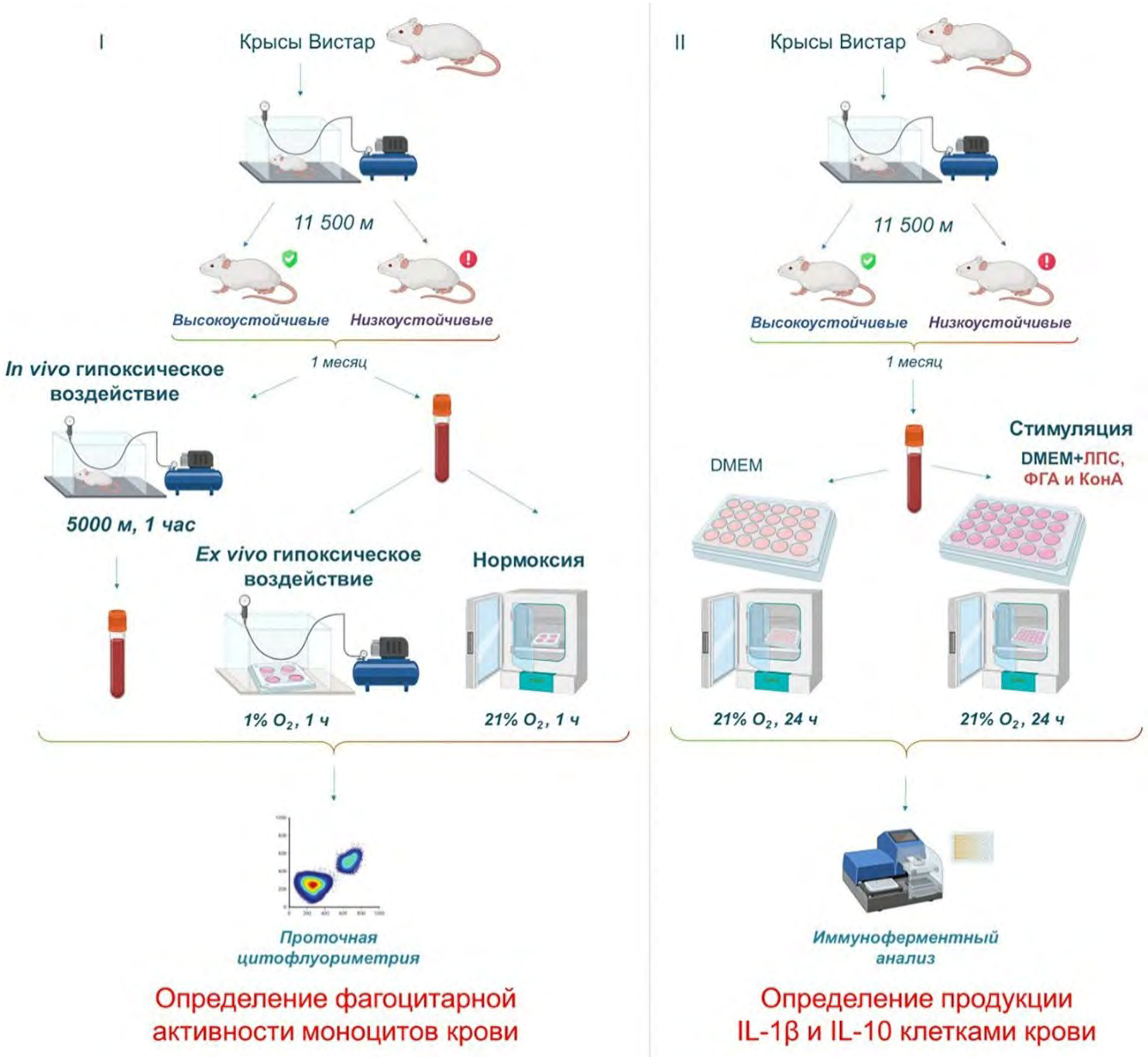


Рис. 2.13. Определение фагоцитарной активности моноцитов крови, спонтанной и стимулированной комплексным митогеном (ЛПС, ФГА и КонА) продукции IL-1β и IL-10 клетками крови у ВУ и НУ крыс Вистар

Оценка продукции цитокинов, стимулированной гипоксией и воспалением, у самцов крыс Вистар до и после сублетальной гипоксической нагрузки в барокамере

Задачей следующих экспериментов (рис. 2.14) было определить, сохраняется ли в течение одного месяца эффект на продукцию цитокинов клетками крови у животных, которых подвергали гипоксическому воздействию в барокамере на критической «высоте». У индивидуально меченых половозрелых крыс Вистар (n=60) под золетиловым наркозом (5 мг/кг Золетил 100, «Virbac Sante Animale», Франция) проводили забор 1 мл крови из хвостовой вены в пробирку с 15 МЕ/мл гепарина («Славянская аптека», Россия).

Из 1 мл крови отбирали четыре пробы по 100 мкл, первую пробу инкубировали с 900 мкл ростовой среды DMEM с L-глутамином, 1 мг/мл глюкозы и 100 мкг/мл гентамицина («ПанЭко»,

Россия) в течение 1 ч при 21% O_2, 5% CO_2 и +37°С, вторую пробу – в течение 1 ч при 1% O_2, 5% CO_2 и +37°С. В третью и четвертую пробы добавляли 900 мкл ростовой среды DMEM с L-глутамином, 5 мг/мл глюкозы и 100 мкг/мл гентамицина («ПанЭко», Россия) и 5% инактивированной телячьей фетальной сыворотки («Biosera», Мексика), в четвертую пробу дополнительно добавляли ЛПС, ФГА и КонА в конечных концентрациях в 1 мл 2 мкг, 4 мкг и 4 мкг соответственно («Sigma», США). Третью и четвертую пробы инкубировали в течение 24 ч при 21% O_2, 5% CO_2 и +37°С.

Во всех пробах определяли содержание в культуральной жидкости провоспалительного цитокина IL-1β и противовоспалительного цитокина IL-10 методом ИФА с использованием высокочувствительных наборов фирмы «Cloud-Clone Corp.» (Китай) в соответствии с протоколами производителя на микропланшетном фотометре AMR-100 («Allsheng», Китай). Через две недели после взятия крови определяли устойчивость животных к гипоксии в барокамере по «времени жизни» на «высоте» и разделяли на ВУ, СУ и НУ. Через один месяц после определения устойчивости к гипоксии у ВУ (n=10) и НУ (n=12) крыс Вистар повторяли *ex vivo* эксперимент с клетками крови и анализировали показатели спонтанной и стимулированной гипоксией и воспалением продукции цитокинов, полученные у этих животных за две недели до и через один месяц после определения устойчивости к гипоксии в барокамере.

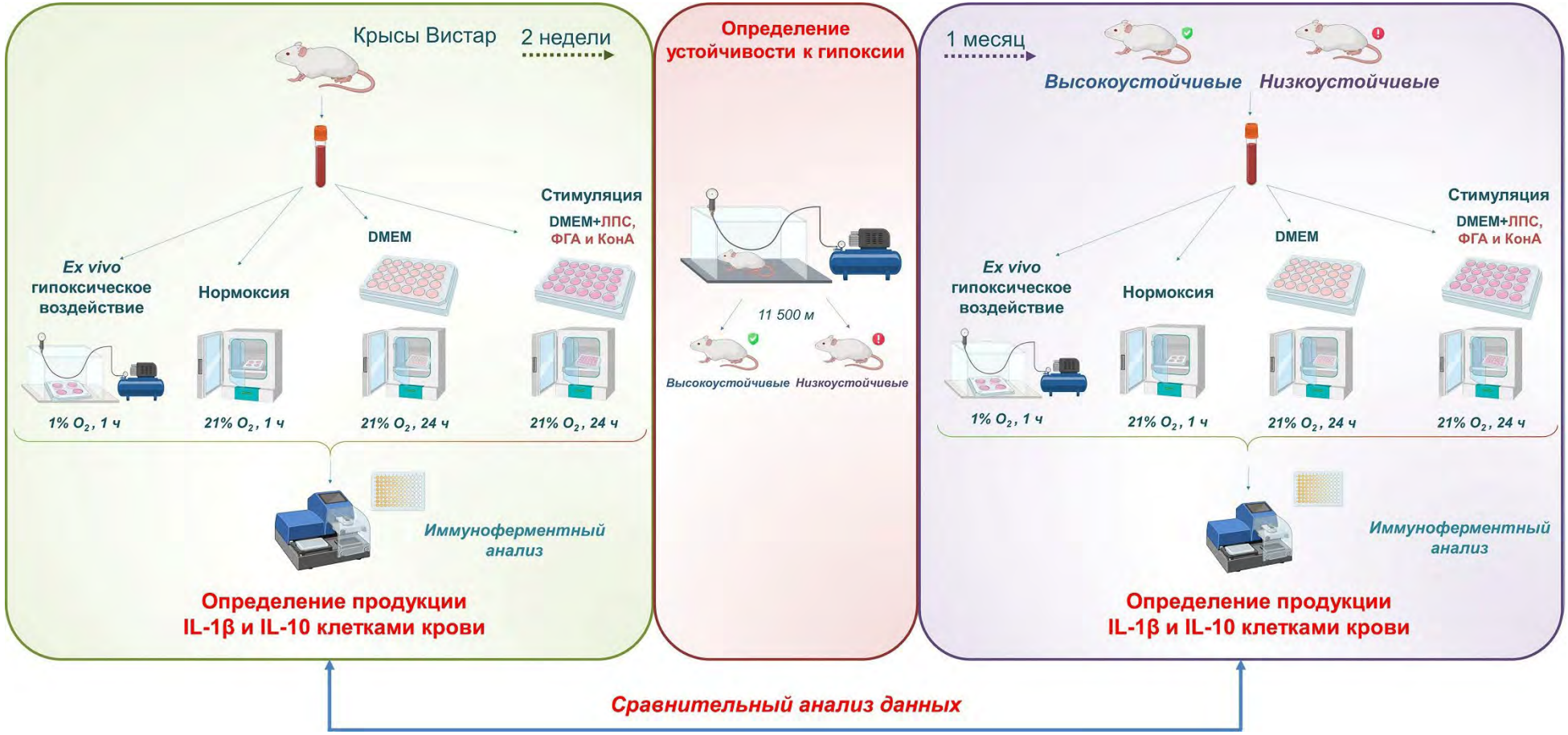


Рис. 2.14. Схема определения влияния гипоксического воздействия в барокамере на спонтанную и стимулированную гипоксическим и воспалительным стимулом *ex vivo* продукцию цитокинов клетками крови

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

В этой части работы проводили забор крови из хвостовой вены у индивидуально меченых самцов крыс Вистар, а через две недели определяли устойчивость этих животных к гипоксии в барокамере. Поскольку исследование предполагает забор крови из хвостовой вены, в данном разделе работы использовали самцов крыс Вистар (n=160). Исследование проведено в осенне-зимние периоды 2022-2023 и 2023-2024 гг. Общая схема исследований представлена на рис. 2.15 и 2.16.

Во всех экспериментах у животных под золетиловым наркозом (5 мг/кг Золетил 100, «Virbac Sante Animale», Франция) проводили забор 1 мл крови из хвостовой вены в пробирку с 15 МЕ/мл гепарина («Славянская аптека», Россия).

Определение фагоцитарной активности моноцитов

Для определения фагоцитарной активности моноцитов (рис. 2.15, I) из 1 мл крови интактных половозрелых крыс Вистар (n=60) отбирали 300 мкл и помещали в 4-луночные планшеты, инкубировали в условиях нормоксии в CO_2-инкубаторе при 5% CO_2 и +37°С в течение 1 ч. Еще 300 мкл крови этих крыс подвергали *ex vivo* гипоксическому воздействию при 1% O_2 путем инкубации при +37°С в течение 1 ч в гипоксической камере для клеток, в которой воздух был замещен азотом под контролем газоанализатора ПКГ-4 В («Эксис», Россия).

После инкубации в условиях нормоксии и гипоксии проводили оценку фагоцитарной активности моноцитов периферической крови методом проточной цитофлуориметрии с помощью набора IngoFlowEx kit («Exbio Diagnostics», Чехия) согласно инструкции производителя. Через две недели после взятия крови и оценки фагоцитарной активности моноцитов определяли устойчивость животных к гипоксии в барокамере по «времени жизни» на «высоте». У ВУ (n=7) и НУ (n=15) крыс Вистар анализировали показатели фагоцитарной активности моноцитов, полученные у этих животных за две недели до определения устойчивости к гипоксии в барокамере.

Определение продукции цитокинов IL-1β и TGF-β в условиях нормоксии и гипоксии при инкубации в течение 1 ч

Для определения спонтанной и стимулированной гипоксией продукции цитокинов (рис. 2.15, II) из 1 мл крови интактных половозрелых крыс Вистар (n=50) отбирали две пробы по 100 мкл, первую пробу инкубировали с 900 мкл ростовой среды DMEM с L-глутамином, 1 мг/мл глюкозы и 100 мкг/мл гентамицина («ПанЭко», Россия) в течение 1 ч при 21% O_2, 5% CO_2 и +37°С, вторую пробу – в течение 1 ч при 1% O_2, 5% CO_2 и +37°С.

В культуральной жидкости методом ИФА определяли содержание провоспалительного цитокина IL-1β и противовоспалительного цитокина TGF-β («Cloud-Clone Corp.», Китай) на

микропланшетном ИФА-анализаторе ANTHOS 2010 («Anthos Labtec Instruments», Австрия). Через две недели после взятия крови и оценки содержания IL-1β и TGF-β определяли устойчивость животных к гипоксии в барокамере по «времени жизни» на «высоте». У ВУ (n=13) и НУ (n=9) крыс Вистар анализировали показатели спонтанной и стимулированной гипоксией продукции IL-1β и TGF-β клетками крови, полученные у этих животных за две недели до определения устойчивости к гипоксии в барокамере.

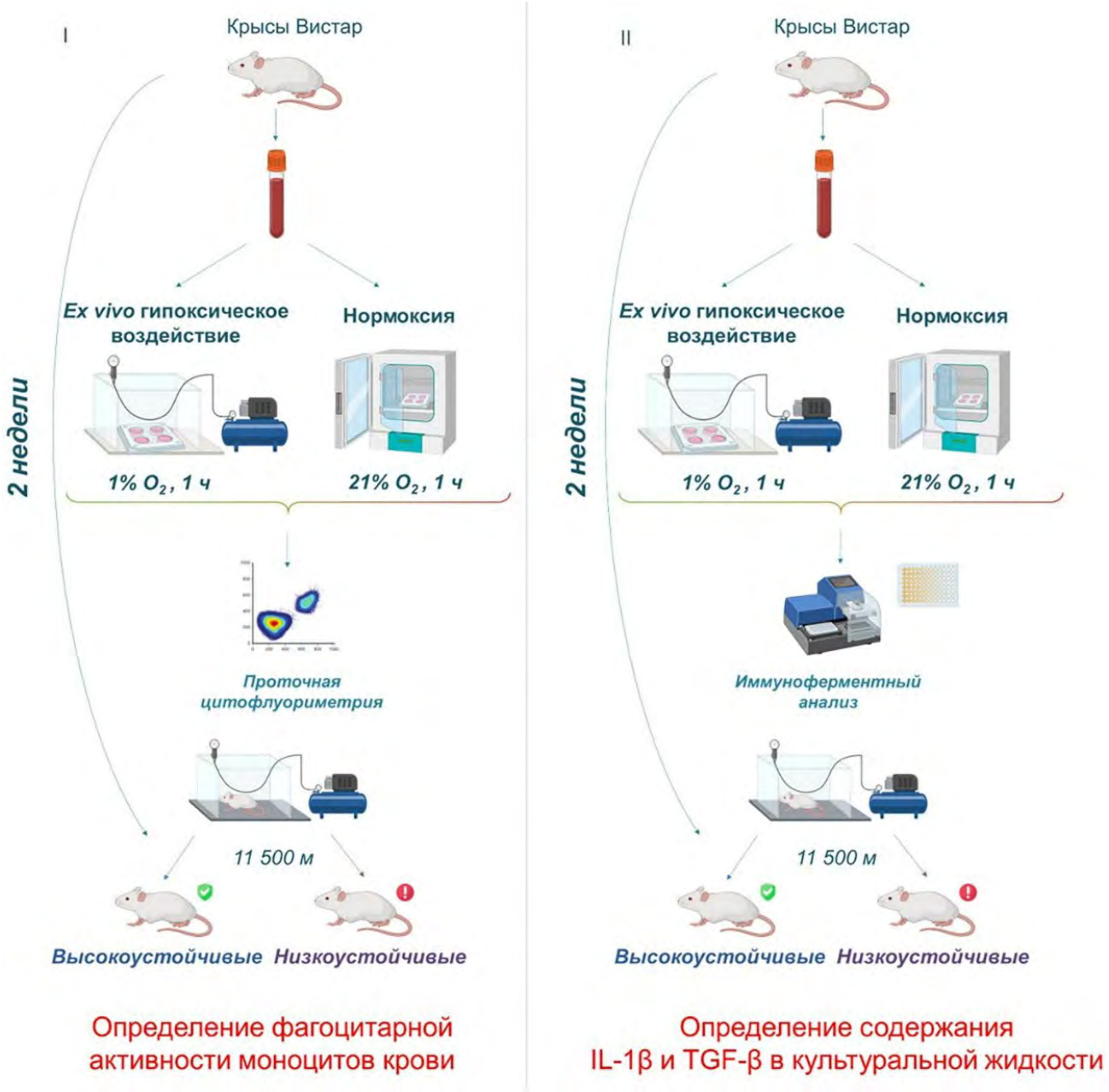


Рис. 2.15. Схема определения фагоцитарной активности моноцитов и продукции цитокинов IL-1β и TGF-β при инкубации клеток крови в течение 1 ч в условиях нормоксии и гипоксии, и последующего определения устойчивости животных к недостатку кислорода

Определение спонтанной продукции цитокинов IL-6, IL-10 и TNF-α в условиях нормоксии при инкубации в течение 24 ч

Для определения спонтанной продукции цитокинов IL-6, IL-10 и TNF-α (рис. 2.16, I) 100 мкл крови интактных половозрелых крыс Вистар (n=50) помещали в 24-луночный планшет, к ней добавляли 900 мкл полной ростовой среды DMEM с L-глутамином, 5 мг/мл глюкозы и 100 мкг/мл гентамицина («ПанЭко», Россия) и 5% инактивированной телячьей фетальной сыворотки («Biosera», Мексика). Образцы инкубировали в течение 24 ч при +37°С в CO_2-инкубаторе. Определяли содержание в культуральной жидкости IL-6, TNF-α («Cloud-Clone Corp.», Китай) и IL-10 («Invitrogen», США) методом ИФА на микропланшетном ИФА-анализаторе ANTHOS 2010 («Anthos Labtec Instruments», Австрия). Через две недели после взятия крови и оценки содержания IL-6, IL-10 и TNF-α определяли устойчивость животных к гипоксии в барокамере по «времени жизни» на «высоте». У ВУ (n=7) и НУ (n=11) крыс Вистар анализировали показатели спонтанной продукции IL-6, IL-10 и TNF-α клетками крови, полученные у этих животных за две недели до определения устойчивости к гипоксии в барокамере.

Определение стимулированной комплексным митогеном продукции IL-1β в условиях нормоксии при инкубации в течение 24 ч

Для определения стимулированной продукции цитокина IL-1β (рис. 2.16, II) из 1 мл крови половозрелых крыс Вистар (n=50), использованных в предыдущем эксперименте, отбирали две пробы по 100 мкл, в обе пробы добавляли 900 мкл ростовой среды DMEM с L-глутамином, 5 мг/мл глюкозы и 100 мкг/мл гентамицина («ПанЭко», Россия) и 5% инактивированной телячьей фетальной сыворотки («Biosera», Мексика), во вторую пробу дополнительно добавляли ЛПС, ФГА и КонА в конечных концентрациях в 1 мл 2 мкг, 4 мкг и 4 мкг, соответственно («Sigma», США). Обе пробы инкубировали в течение 24 ч при 21% O_2, 5% CO_2 и +37°С. В культуральной жидкости методом ИФА определяли содержание провоспалительного цитокина IL-1β («Invitrogen», США) на микропланшетном ИФА-анализаторе ANTHOS 2010 («Anthos Labtec Instruments», Австрия). Через две недели после взятия крови и оценки содержания IL-1β определяли устойчивость животных к гипоксии в барокамере по «времени жизни» на «высоте». У ВУ (n=7) и НУ (n=11) крыс Вистар анализировали показатели стимулированной ЛПС, ФГА и КонА продукции IL-1β клетками крови, полученные у этих животных за две недели до определения устойчивости к гипоксии в барокамере.

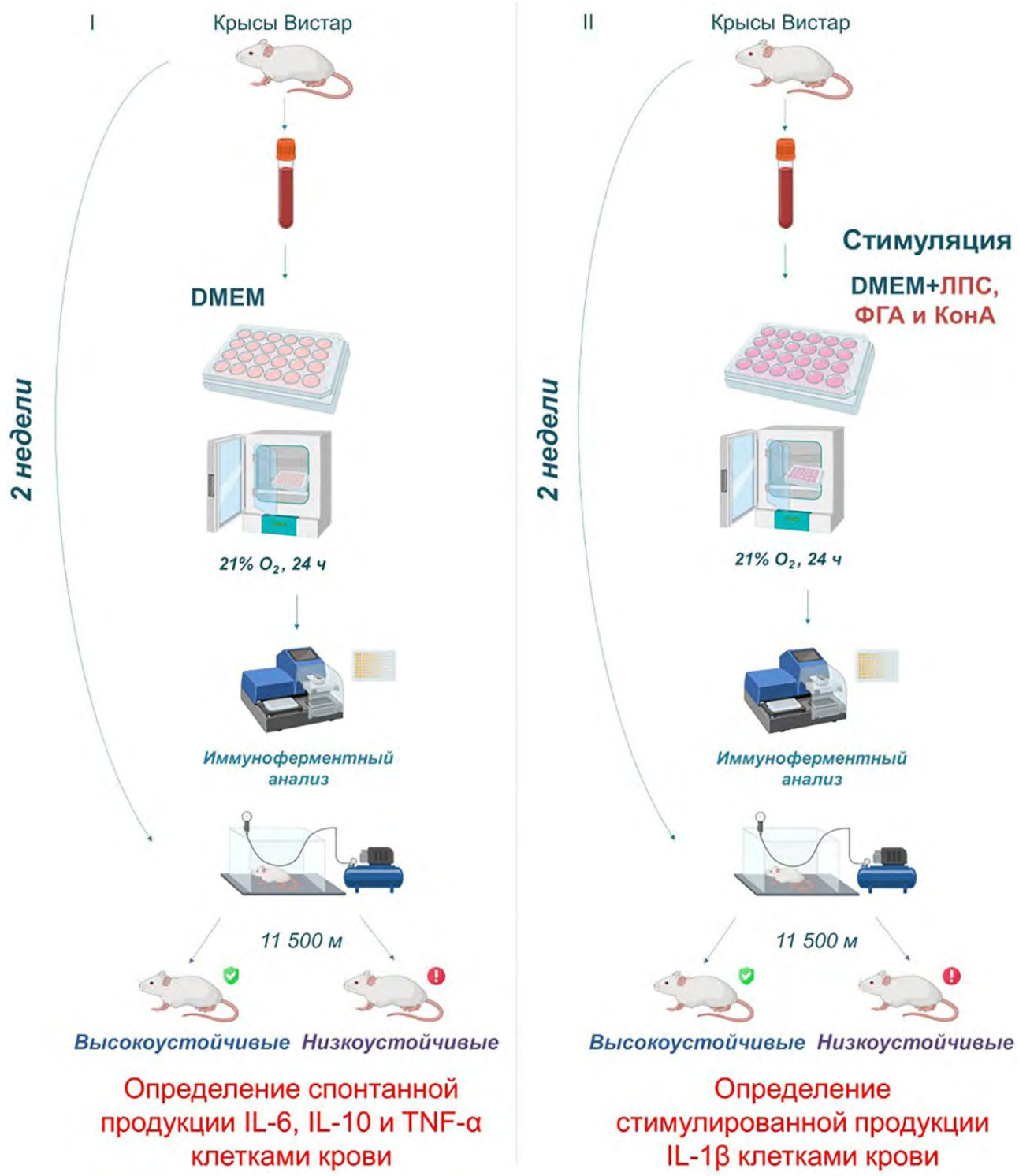


Рис. 2.16. Схема определения спонтанной продукции цитокинов IL-6, IL-10 и TNF-α в условиях нормоксии при инкубации в течение 24 ч и стимулированной комплексным митогеном (ЛПС, ФГА и КонА) продукции IL-1β в условиях нормоксии при инкубации в течение 24 ч, и последующего определения устойчивости животных к недостатку кислорода

Статистические методы

Все полученные в работе данные подвергали статистической обработке. Характер распределения показателей устанавливали с помощью теста Колмогорова-Смирнова. Поскольку по результатам теста данные были распределены ненормально, для установления достоверности

различий использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни и критерий множественного сравнения Краскела-Уоллиса (Гржибовский и соавт., 2016). Если по результатам теста Краскела-Уоллиса выявлялись различия, применяли 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) (Гланц, 1998; Мастицкий, 2009). Для анализа категориальных данных использовали точный тест Фишера.

Различия считали статистически значимыми при $p<0,05$. Показатели выражали в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (25%-75%). Данные представляли графически с изображением медианы и интерквартильного размаха в программах «Statistica 8.0» («StatSoft Inc.», США), «GraphPad Prism 8» («GraphPad Software», США) и Microsoft Office Excel 2016 («Microsoft Corporation», США).

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Раздел 1. Зависимость устойчивости к гипоксии от возраста

Задачей данного раздела работы было исследование взаимосвязи между устойчивостью к гипоксии, окислительным стрессом и балансом провоспалительных и противовоспалительных цитокинов у новорожденных, препубертатных, половозрелых и старых крыс Вистар, чтобы установить возраст, оптимальный для моделирования опухолевого процесса у животных, а также разработки способа определения устойчивости организма к гипоксии без гипоксического воздействия в барокамере.

3.1. Взаимосвязь между устойчивостью к гипоксии, окислительным стрессом и продукцией провоспалительных и противовоспалительных цитокинов у новорожденных, препубертатных и половозрелых самцов крыс Вистар[1]

Ключевую роль в развитии ответа на гипоксию играют окислительный стресс, активность HIF-1α и PHD2, которые связаны с воспалением и развитием опухолей (Mittal et al., 2014; Ranneh et al., 2017; Li et al., 2024). При гипоксии активируется продукция АФК, усиливается хемотаксис нейтрофилов, фагоцитарная активность моноцитов, меняется баланс провоспалительных и противовоспалительных реакций (Anand et al., 2007; Kammerer et al., 2020; Martins et al., 2020; Li et al., 2024), поэтому мы определяли у новорожденных, препубертатных и половозрелых животных продукцию клетками селезенки противовоспалительного цитокина IL-10, а также провоспалительных IFN-γ и TNF-α. Кроме того, оценивали уровень окислительного стресса и антиоксидантной защиты.

---

[1]При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении научных степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования (в скобках приведен импакт-фактор журнала, объем публикации в условных печатных листах/вклад автора в условных печатных листах):

1. 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: YMXEPZ. ИФ РИНЦ 0,880, RSCI (0,35/0,20) [Kosyreva 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 WoS (JIF), Q4 (0,35/0,20)]
2. **Dzhalilova D.Sh.**, Kosyreva 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 WoS (JIF), Q1 (0,65/0,50)

3.1.1. Сравнительная характеристика «времени жизни» на «высоте» у новорожденных, препубертатных и половозрелых самцов крыс Вистар

«Время жизни» до принятия бокового положения, оценка которого используется для определения устойчивости к гипоксии, на «высоте» 11 500 м у препубертатных животных было в 3,4 раза ниже по сравнению с новорожденными и в 1,9 раза – по сравнению с половозрелыми (табл. 3.1.1, рис. 3.1.1). «Время жизни» на «высоте» служит мерой оценки чувствительности животных к острой гипобарической гипоксии и характеризует способность к максимальной мобилизации защитных функций организма, ответственных за его жизнеспособность в экстремальной ситуации, несовместимой с жизнью (Лукьянова и соавт., 2009). «Время жизни» до принятия бокового положения на критической «высоте» характеризует устойчивость организма к гипоксии, таким образом, при оценке «времени жизни» животных в барокамере на «высоте» 11 500 м показано, что наименее устойчивыми к гипоксии являются препубертатные крысы Вистар.

Таблица 3.1.1

«Время жизни» на «высоте» 11 500 м в барокамере новорожденных (n=6), препубертатных (n=6) и половозрелых (n=6) крыс Вистар, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса и Данна

Группы наблюдения / **Параметр**	**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]

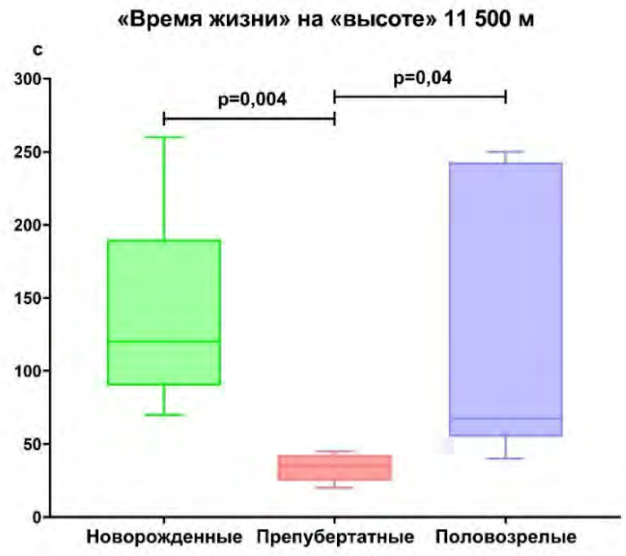


Рис. 3.1.1. «Время жизни» на «высоте» 11 500 м в барокамере новорожденных (n=6), препубертатных (n=6) и половозрелых (n=6) крыс Вистар, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса и Данна

«Время жизни» крайних по чувствительности к дефициту O_2 (ВУ и НУ) животных на критической «высоте» должно различаться в три и более раз (Березовский, 1978; Каркищенко, 2017). По нашим данным «время жизни» на «высоте» 11 500 м новорожденных и препубертатных крыс Вистар не различалось более чем в три раза, поэтому среди них нельзя выделить ВУ и НУ. Следует отметить, что у половозрелых животных, напротив, наблюдался значительный разброс показателей – можно было выделить крыс, «время жизни» которых на «высоте» составило более 240 с и менее 80 с, то есть различалось более чем в три раза. Это подтверждает данные о том, что среди половозрелых крыс Вистар на «высоте» 11 500 м можно выделить ВУ и НУ, в то время как у новорожденных и препубертатных крыс «время жизни» на данной «высоте» не различалось более чем в три раза. Так как задачей данной части работы было выявление возрастных различий в устойчивости к недостатку O_2 во взаимосвязи с окислительным стрессом и содержанием провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, мы определяли «время жизни» крыс на «высоте» 11 500 м и не разделяли половозрелых животных на ВУ и НУ.

3.1.2. Сравнительная характеристика уровня экспрессии *Hif1a* в печени, содержания белков HIF-1α и PHD2 в печени и содержания белка HIF-1α в сыворотке крови у новорожденных, препубертатных и половозрелых самцов крыс Вистар

Уровень экспрессии гена *Hif1a* в печени у новорожденных и препубертатных крыс был статистически значимо выше по сравнению с половозрелыми животными, то есть этот показатель снижался с возрастом (табл. 3.1.2, рис. 3.1.2), в то время как содержание белка HIF-1α было минимальным у новорожденных и препубертатных крыс и увеличивалось к половозрелому периоду (табл. 3.1.2, рис. 3.1.3, оригинальные мембраны Вестерн-блоттинга в Приложении 1). Содержание белка PHD2 в печени у новорожденных животных было статистически значимо выше по сравнению с препубертатными и половозрелыми крысами (табл. 3.1.2, рис. 3.1.3, оригинальные мембраны Вестерн-блоттинга в Приложении 1). Содержание белка HIF-1α в сыворотке крови было статистически значимо ниже у препубертатных животных по сравнению с новорожденными и половозрелыми (табл. 3.1.2, рис. 3.1.2).

Таблица 3.1.2

Относительный уровень экспрессии гена *Hif1a*, содержание белков HIF-1α и PHD2 в печени и содержание белка HIF-1α в сыворотке крови у новорожденных, препубертатных и половозрелых крыс Вистар, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса и Данна

Группы наблюдения / **Параметры**	**Новорожденные[1] (n=6)**	**Препубертатные[2] (n=6)**	**Половозрелые[3] (n=6)**	**p<0,05**
Уровень экспрессии гена *Hif1a* 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-1α 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-1α 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]

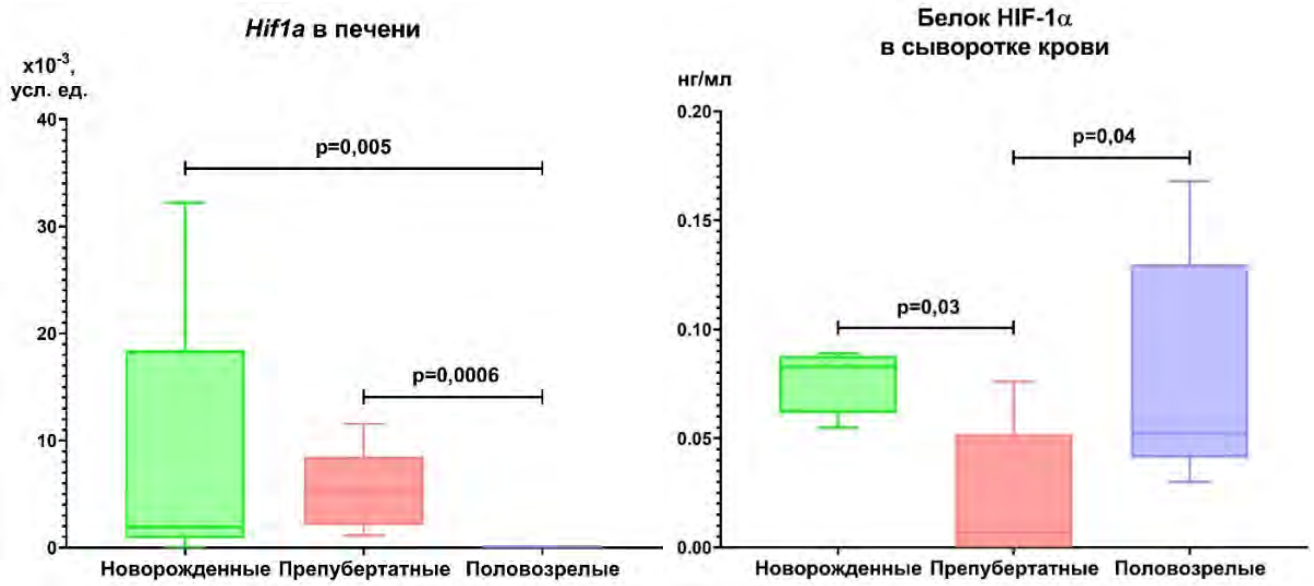


Рис. 3.1.2. Уровень экспрессии гена *Hif1a* в печени и содержание белка HIF-1α в сыворотке крови у новорожденных (n=6), препубертатных (n=6) и половозрелых (n=6) крыс Вистар, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса и Данна

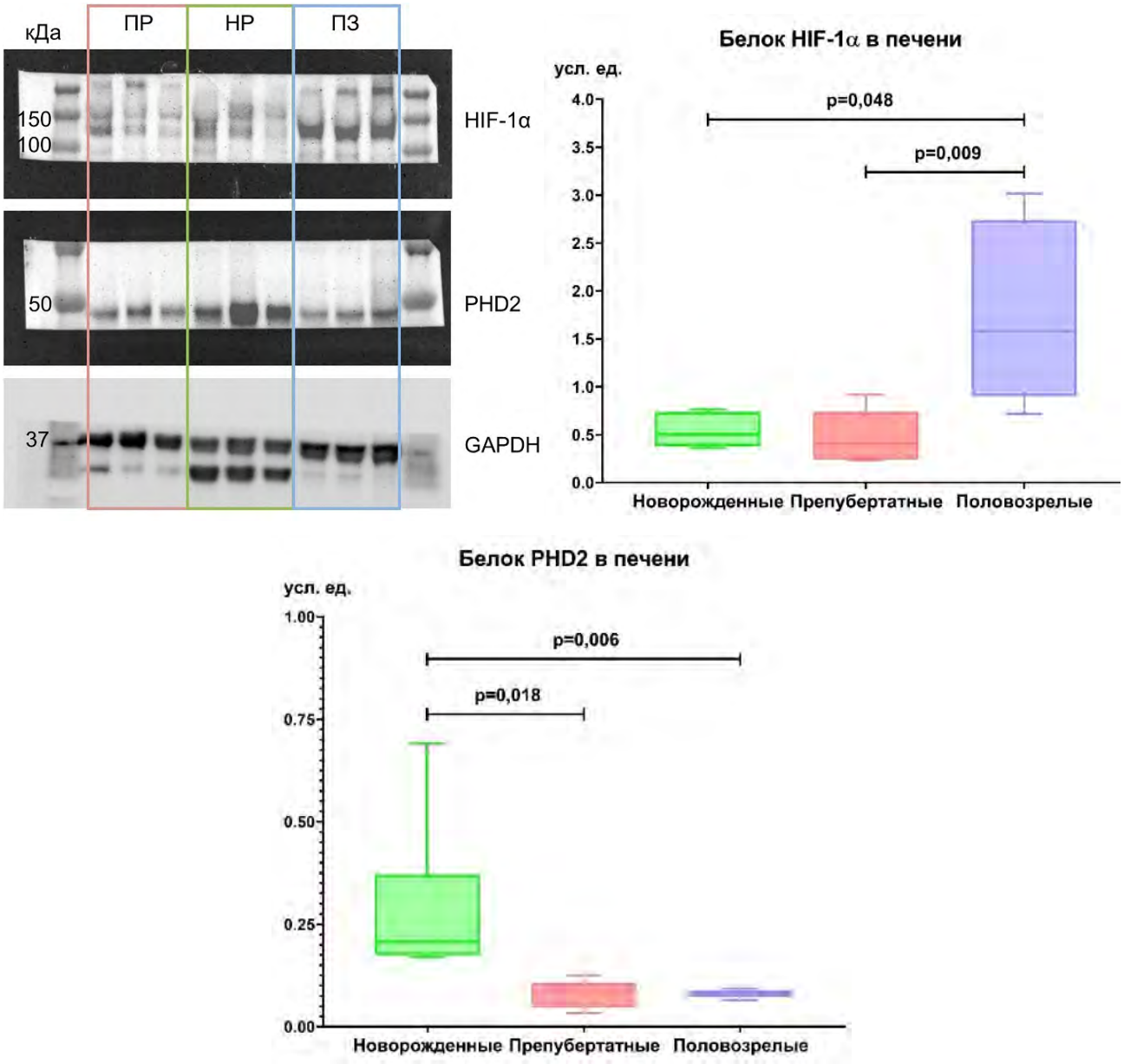


Рис. 3.1.3. Относительное содержание белков HIF-1α и PHD2 в печени у новорожденных (n=6), препубертатных (n=6) и половозрелых (n=6) крыс Вистар. Приведены репрезентативные мембраны (ПР – препубертатные, НР – новорожденные, ПЗ – половозрелые крысы) и результаты обсчета интенсивности хемилюминесценции, нормированные на сигнал GAPDH, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса и Данна

3.1.3. Сравнительная характеристика показателей свободнорадикального окисления и антиоксидантной защиты в периферической крови, продукции IL-10, IFN-γ и TNF-α клетками селезенки у новорожденных, препубертатных и половозрелых самцов крыс Вистар

Показатель свободнорадикального окисления в периферической крови, оцененный по методу FORT, был выше у половозрелых крыс и статистически значимо отличался от препубертатных. При этом не выявлено возрастных различий в уровне антиоксидантной защиты, оцененной по методу FORD (табл. 3.1.3).

Таблица 3.1.3

Показатели свободнорадикального окисления и антиоксидантной защиты в периферической крови у новорожденных (n=6), препубертатных (n=6) и половозрелых (n=6) крыс Вистар, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса и Данна

Группы наблюдения / **Параметры**	**Новорожденные[1] (n=6)**	**Препубертатные[2] (n=6)**	**Половозрелые[3] (n=6)**	**p**
Свободнорадикальное окисление, ммоль/л H_2O_2	0,61 (0,58-0,64)	0,53 (0,43-0,61)	2,40 (2,20-3,11)	$0,99^{1-2}$ $0,12^{1-3}$ **$0,008^{2-3}$**
Антиоксидантная защита, ммоль/л Trolox	1,72 (1,72-1,81)	2,02 (2,0-2,02)	1,66 (1,59-1,85)	$0,09^{1-2}$ $0,99^{1-3}$ $0,14^{2-3}$

Показано, что продукция клетками селезенки противовоспалительного цитокина IL-10 была статистически значимо выше у новорожденных и препубертатных крыс по сравнению с половозрелыми. При этом продукция провоспалительных цитокинов IFN-γ и TNF-α, напротив, была минимальной у новорожденных крыс и увеличивалась к половозрелому периоду (табл. 3.1.4).

Таблица 3.1.4

Продукция цитокинов IL-10, IFN-γ и TNF-α клетками селезенки у новорожденных (n=6), препубертатных (n=6) и половозрелых (n=6) крыс Вистар, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса и Данна

Группы наблюдения / **Цитокины, пг/мл**	**Новорожденные[1] (n=6)**	**Препубертатные[2] (n=6)**	**Половозрелые[3] (n=6)**	**p<0,05**
IL-10	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	0,0 (0,0-0,0)	20,5 (5,86-50,4)	1228,0 (205,4-2457,0)	**$0,01^{1-2}$** **$0,000003^{1-3}$** **$0,03^{2-3}$**
TNF-α	10,8 (1,4-13,5)	149,2 (69,9-281,8)	325,3 (254,0-456,0)	**$0,00004^{1-2}$** **$0,000002^{1-3}$** **$0,004^{2-3}$**

Заключение и обсуждение к 3.1

Таким образом, выявлены возрастные различия в устойчивости к недостатку кислорода самцов крыс Вистар, характеризующиеся различными уровнями экспрессии гена *Hif1a* и содержанием белков HIF-1α и PHD2 в печени, а также HIF-1α в сыворотке крови. Препубертатные животные наименее устойчивы к гипоксии, и они характеризуются минимальным «временем жизни» на критической «высоте» и наименьшим содержанием белка

HIF-1α в сыворотке крови. Установлено, что для новорожденных крыс характерен высокий уровень экспрессии гена *Hif1a* в печени, сочетающийся с низким содержанием белка HIF-1α и высоким – пролилгидроксилазы PHD2. Низкий уровень экспрессии гена *Hif1a* в печени у половозрелых крыс по сравнению с новорожденными и препубертатными при высоком содержании белка HIF-1α сочетается с низким уровнем активности PHD2. Высокое содержание белка HIF-1α как в печени, так и в сыворотке крови у половозрелых крыс, вероятно, обусловлено высокой продукцией АФК. Максимальный уровень окислительного стресса наблюдается у половозрелых животных, что сочетается с повышенной продукцией провоспалительных цитокинов IFN-γ и TNF-α, но пониженной – противовоспалительного IL-10. У препубертатных животных уровень экспрессии гена *Hif1a* в печени выше по сравнению с половозрелыми, но не отличается от такового у новорожденных крыс. При этом активность PHD2 у них статистически значимо ниже по сравнению с новорожденными крысами, но содержание белка HIF-1α в печени не отличается.

По данным литературы выявлены возрастные особенности реакции организма на острое гипоксическое воздействие. Новорожденные животные по сравнению с половозрелыми более устойчивы к недостатку кислорода (Bert, 1878; Домбровская, 1961; Колчинская, 1964; Singer, 1999; Bickler, 2004; Kosyreva et al., 2019; Dzal и Milsom, 2021; Dzhalilova et al., 2021). В пубертатном возрасте организм хуже адаптируется к изменениям pO_2 во вдыхаемом воздухе (Колчинская, 1964). По данным А.А. Корнеева и соавт. (1993) у крыс возрастом до 60 сут чувствительность к гипоксии подвержена значительным индивидуальным колебаниям, а затем достигает уровня устойчивости взрослых животных (Корнеев и соавт., 1993). Устойчивость к гипоксии может изменяться с возрастом, однако данные о возрастных различиях активности HIF и зависимых от него генов противоречивы – представлены данные как об увеличении, так и о снижении уровней экспрессии и содержания белка HIF-1α с возрастом (Kang et al., 2005; Ndubuizu et al., 2009; Dzhalilova и Makarova, 2022).

По результатам определения «времени жизни» в барокамере на критической «высоте» 11 500 м нами показано, что по сравнению с препубертатными крысами Вистар новорожденные более устойчивы к гипоксии. Это соответствует данным предыдущих исследований (Домбровская, 1961; Колчинская, 1964; Bert, 1878; Singer, 1999; Bickler, 2004; Kosyreva et al., 2019; Dzal и Milsom, 2021; Dzhalilova et al., 2021). По данным литературы низкое содержание O_2 в матке при внутриутробном развитии определяет высокую устойчивость к гипоксии плодов и новорожденных организмов (Friedman и Haddad, 1993; Bickler и Hansen, 1998; Millán et al., 2018). Высокая устойчивость к гипоксии новорожденных организмов объясняется тем, что автоматическая деятельность их дыхательного центра при недостатке кислорода может поддерживаться более древней и простой формой обмена – анаэробным расщеплением углеводов

(Дмитриева, 2006). Кроме того, у новорожденных сохраняется некоторый запас фетального гемоглобина, который может обеспечивать дыхательную функцию при пониженном pO_2 в крови. Однако решающее значение в высокой устойчивости новорожденных организмов к гипоксии имеет менее высокий уровень развития ЦНС, что наблюдается у животных ранних ступеней эволюционного развития (Рагозин и соавт., 2001; Дмитриева, 2006).

По сравнению с половозрелыми животными у новорожденных крыс Вистар в печени выявлены высокий уровень экспрессии гена Hif1α и содержание пролилгидроксилазы PHD2, однако содержание белка HIF-1α, напротив, было низким. У новорожденных животных нами установлен низкий уровень окислительного стресса. Низкий уровень окислительного стресса у новорожденных организмов согласуется с данными I. Millán и соавт. (2018). Низкий уровень окислительного стресса у новорожденных организмов может обусловливать высокую активность PHD2, так как АФК ингибируют PHD2 (Emerling et al., 2005; Salmeen и Barford, 2005). Низкое содержание белка HIF-1α может быть связано с высокой концентрацией пролилгидроксилазы PHD2, осуществляющей его деградацию. PHD2 является ключевым ферментом, реагирующим на изменения доступности O_2, который вовлечен в регуляцию содержания HIF-1α в условиях нормоксии (Berra et al., 2003; Appelhoff et al., 2004). Гидроксилирование пролиновых остатков субъединицы HIF-α – ключевой механизм негативной регуляции ее активности, поскольку он способствует протеасомной деградации HIF-α с помощью pVHL (Koyasu et al., 2018; Stothers et al., 2018). По данным литературы при подавлении активности PHD2 повышается содержание белка HIF-1α (Berra et al., 2003). Показано, что в условиях нормоксии белок HIF-1α не обнаруживается в мозге у новорожденных крыс (Lu et al., 2014), в то время как экспрессия гена *Hif1a* выше в мозге, сердце, почках и легких новорожденных мышей по сравнению с половозрелыми (Madan et al., 2002). По-видимому, в физиологических условиях у новорожденных животных уровень экспрессии гена *Hif1a* конститутивно высокий, что при возможном гипоксическом воздействии обеспечивает быстрый синтез белка. В условиях нормоксии, когда pO_2 достаточное, пролилгидроксилазы способствуют разрушению белка HIF-1α в протеасоме, его содержание снижается, а физиологические и биохимические эффекты HIF-1α не реализуются. Вероятно, для новорожденных крыс характерен высокий индукционный уровень синтеза белка HIF-1α на основе имеющейся мРНК, что в условиях гипоксии при помещении в барокамеру обеспечивает максимальное «время жизни» на «высоте» (рис. 3.1.4).

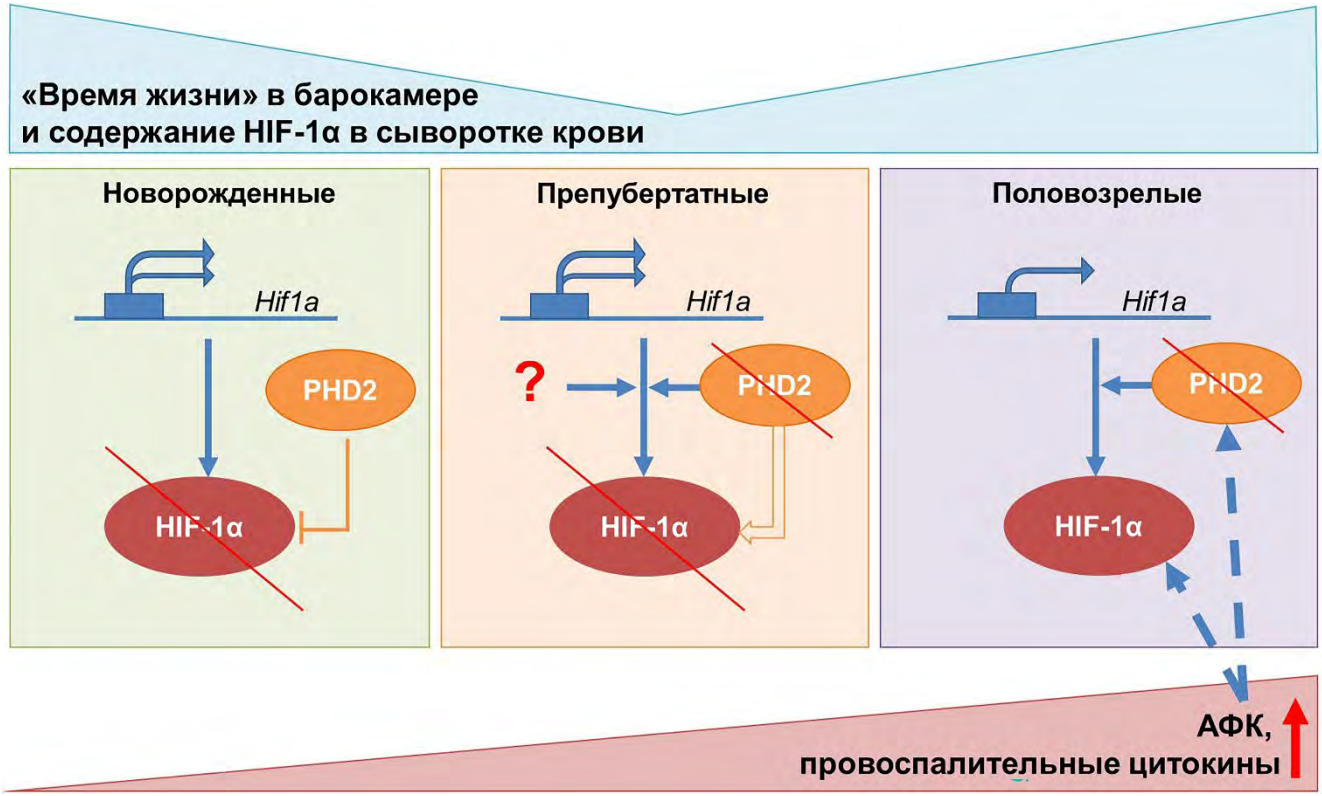


Рис. 3.1.4. Суммарные результаты исследования различий «времени жизни» в барокамере, особенностей экспрессии *Hif1a*, содержания HIF-1α и PHD2, продукции АФК и провоспалительных цитокинов у новорожденных, препубертатных и половозрелых крыс Вистар, АФК – активные формы кислорода, HIF-1α – фактор, индуцируемый гипоксией, PHD2 – пролилгидроксилаза

По сравнению с новорожденными и препубертатными крысами минимальный уровень экспрессии гена Hif1a был обнаружен в печени у половозрелых крыс, тогда как содержание белка HIF-1α, напротив, было высоким. Это может быть связано с низкой стабильностью мРНК и высокой – белка, а также действием микроРНК (Serocki et al., 2018; Silina et al., 2023), таких как miR-155 (Yang et al., 2016), miR-150 (Li et al., 2017) и miR-519c (Cha et al., 2010). Они имеют сайты связывания в 3′-нетранслируемой области HIF-1α и играют роль негативных регуляторов синтеза данной субъединицы. Наши данные согласуются с результатами R.S. Belaiba и соавт. (2007), которые показали, что в гладкомышечных клетках легочной артерии человека (PASMC, Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells) в условиях гипоксии экспрессия гена *HIF1A* увеличивалась в течение 30 мин, достигала пика через 1 ч и оставалась повышенной в течение 4 ч. При этом содержание белка HIF-1α оставалось повышенным до 8 ч (Belaiba et al., 2007).

Нами показано, что в половозрелом периоде содержание белка PHD2 в печени низкое. При этом по результатам теста свободнорадикального окисления FORT у половозрелых крыс выявлен высокий уровень окислительного стресса. По данным литературы митохондриальные АФК отрицательно регулируют активность пролилгидроксилаз. Высокие уровни АФК могут влиять на каталитический домен PHD2, снижая ее активность, или индуцировать специфические

посттрансляционные модификации, которые ингибируют PHD2, что, в конечном итоге, способствует стабилизации субъединицы HIF-α и ее транслокации в ядро (Emerling et al., 2005; Salmeen и Barford, 2005). Ранее была выявлена значительная корреляция между свободнорадикальным окислением FORT и другими показателями воспаления и окислительного стресса (Mantovani et al., 2004б; Abramson et al., 2005). Добавление экзогенной перекиси водорода или глюкозооксидазы, которая способствует продукции перекиси, приводило к стабилизации белка HIF-1α в условиях нормоксии (Chandel et al., 2000; Brunelle et al., 2005; Guzy et al., 2005). АФК и многие другие молекулы, такие как промежуточные продукты цикла Кребса, провоспалительные цитокины и др. могут индуцировать накопление HIF-α даже в условиях нормоксии – такое явление называют псевдогипоксией (Salminen et al., 2016; Hayashi et al., 2018). АФК способствуют стабилизации HIF-1α, что, в конечном итоге, приводит к активации HIF-зависимых генов (Chandel et al., 2000; Bell et al., 2007). Помимо этого, высокий уровень окислительного стресса приводит к повреждению мембран клеток и активации воспалительных реакций (Tafani et al., 2016).

Максимальный уровень продукции провоспалительных цитокинов IFN-γ и TNF-α клетками селезенки выявлен у половозрелых крыс. При этом по сравнению с новорожденными и препубертатными крысами продукция противовоспалительного цитокина IL-10 у половозрелых животных была низкой. Полученные нами данные по уровню продукции цитокинов крысами Вистар разных возрастных групп согласуются с данными А.М. Косыревой (2018), V. Wiegering и соавт. (2009), которые показали, что уровень продукции IFN-γ и TNF-α с возрастом увеличивается (Косырева, 2018; Wiegering et al., 2009). Известно, что у новорожденных снижена способность к продукции IFN-γ (Bryson et al., 1980; Wakasugi et al., 1985; Wilson et al., 1986). По данным литературы по сравнению с детьми старшего возраста новорожденные характеризуются более высокими показателями относительного числа Т-лимфоцитов, продуцирующих IL-2, и низкими – Т-лимфоцитов, продуцирующих IFN-γ (Gasparoni et al., 2003). Способность продуцировать IFN-γ у людей обычно приобретается в течение первых 3-6 месяцев после рождения (Frenkel и Bryson, 1987). Повышение с возрастом продукции АФК и гипоксия приводят к активации HIF-1α и индукции NF-κB, что способствует продукции провоспалительных цитокинов, таких как IL-1β, IL-6 и TNF-α (Cummins et al., 2006; Slaats et al., 2016; Tafani et al., 2016). Показано, что АФК могут как прямо, так и опосредованно активировать NF-κB (Lingappan, 2018). Низкий уровень экспрессии гена *Hif1a* в печени у половозрелых животных, низкое содержание пролилгидроксилазы PHD2, но высокое содержание белка HIF-1α, связаны с высокой продукцией АФК и провоспалительных цитокинов – IFN-γ и TNF-α, что подтверждает роль HIF в регуляции провоспалительных и противовоспалительных реакций у половозрелых животных (Corrado и Fontana, 2020).

Минимальное «время жизни» на критической «высоте» обнаружено у препубертатных крыс Вистар. При этом уровень экспрессии гена 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-1α – по сравнению с половозрелыми животными. Кроме того, в сыворотке крови у препубертатных крыс содержание белка HIF-1α было наименьшим по сравнению с новорожденными и половозрелыми животными. По-видимому, у препубертатных животных в регуляции деградации субъединицы HIF-1α доминирующую роль играют другие механизмы, не связанные с активностью пролилгидроксилаз, например, KLF2 – Kruppel-Like Factor 2, RACK1 – Receptor for Activated C-Kinase 1, которые влияют на взаимодействие HIF-1α с шапероном HSP90 и способствуют независимому от пролилгидроксилаз и pVHL разрушению HIF-1α в протеасоме (Liu et al., 2007; Kawanami et al., 2009). Низкая устойчивость к гипоксии и очевидно другие механизмы регуляции протеасомной деградации HIF-1α у препубертатных крыс могут определять большую частоту и тяжесть течения ЛПС-индуцированного СВО в этом возрастном периоде (Kosyreva et al., 2020; Dzhalilova et al., 2021). Известно, что развитие ЛПС-индуцированных провоспалительных реакций осуществляется через активацию NF-κB. NF-κB является транскрипционным фактором, который, как и HIF, регулирует различные группы генов, включая гены провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, рецепторов иммунных клеток и гены, отвечающие на окислительный стресс (Rastogi et al., 2023). По данным литературы одни и те же гидроксилазы, которые регулируют чувствительный к кислороду путь и способствуют убиквитин-зависимому разрушению HIF-1α, контролируют активность киназного комплекса, отвечающего за регуляцию NF-κB, и играют определяющую роль в его реакции на гипоксию (Cummins et al., 2006; Eltzschig и Carmeliet, 2011). Подавление PHD1 или 2 ингибитором приводит к активации NF-κB, напротив, избыточная активация PHD1 уменьшает его цитокин-стимулированную активность, что свидетельствует о репрессивной роли PHD1 в отношении NF-κB (Cummins et al., 2006; Rius et al., 2008).

Вероятно, препубертатный возраст с низкой устойчивостью к гипоксии является фактором риска развития и тяжелого течения воспалительных и других связанных с кислородной недостаточностью заболеваний. В этот период происходит становление иммунной, эндокринной и других систем, наблюдаются колебания уровней гормонов, что способствует снижению общей резистентности организма к стрессовым факторам, в том числе, к гипоксии. У половозрелых крыс, несмотря на повышенный уровень окислительного стресса и продукции провоспалительных цитокинов, устойчивость к гипоксии выше, а течение СВО менее тяжелое, чем у препубертатных животных (Kosyreva et al., 2020).

Структура опухолевых заболеваний у человека зависит от возраста. По данным ВОЗ наиболее распространенные виды опухолей у детей включают лейкозы, опухоли головного мозга, лимфомы и солидные опухоли, такие как нейробластома и опухоль Вильмса (World Health Organization, 2021). Причины развития злокачественных опухолей у детей недостаточно изучены. Показано, что около 10% всех детей, страдающих злокачественными опухолями, имеют предрасположенность, обусловленную генетическими факторами (Zhang et al., 2015). В отличие от половозрелых у новорожденных и препубертатных организмов менее выражено влияние накопления мутаций с возрастом, окислительного стресса и провоспалительных реакций (Kentsis, 2020). Поэтому для изучения особенностей темпов инициации и прогрессии опухолей в зависимости от устойчивости к гипоксии целесообразно использовать половозрелых животных.

Таким образом, нами показано, что исходная устойчивость к гипоксии самцов крыс Вистар зависит от возраста (Kosyreva et al., 2019; Dzhalilova et al., 2021). По сравнению с новорожденными и половозрелыми животные препубертатного периода наименее устойчивы к гипоксии и характеризуются наименьшим содержанием белка HIF-1α в сыворотке крови. Выявлен высокий уровень экспрессии гена *Hif1a* в печени у новорожденных крыс, но низкое содержание белка HIF-1α, что связано с его деградацией из-за высокого содержания пролилгидроксилазы PHD2. Низкий уровень экспрессии гена *Hif1a* в печени у половозрелых животных, низкое содержание пролилгидроксилазы PHD2, но высокое содержание белка HIF-1α, связаны с высокой продукцией АФК и провоспалительных цитокинов – TNF-α и IFN-γ. Исследование особенностей течения опухолевого процесса в зависимости от устойчивости к гипоксии следует проводить на половозрелых животных.

3.2. Сравнительная характеристика устойчивости к гипоксии, уровней экспрессии *Hif1a*, *Vegf* и *Nfkb* в печени, содержания белка HIF-1α в сыворотке крови и числа нейтрофилов в легких у половозрелых и старых самцов крыс Вистар[2]

Новорожденные и препубертатные самцы крыс Вистар на «высоте» 11 500 м не разделились на ВУ и НУ, что согласуется с данными А.З. Колчинской (1964), поэтому с целью выбора возрастного периода для моделирования опухолей было проведено сравнительное исследование уровней экспрессии *Hif1a*, *Vegf* и *Nfkb* в печени, содержания белка HIF-1α в сыворотке крови и числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у половозрелых и старых животных.

3.2.1. Сравнительная характеристика устойчивости к гипоксии у половозрелых и старых самцов крыс Вистар

По результатам определения устойчивости к гипоксии в барокамере оказалось, что среди старых крыс Вистар, как и среди половозрелых, на «высоте» 11 500 м можно выделить ВУ и НУ животных. При оценке «времени жизни» на «высоте» 11 500 м среди половозрелых крыс Вистар 33% оказались ВУ со «временем жизни» более 240 с, 30% – НУ со «временем жизни» менее 80 с, среди старых животных – 27% ВУ и 20% НУ крыс (рис. 3.2.1). В связи с тем, что работа направлена на выявление группы риска развития и неблагоприятного течения опухолевого процесса, исследование проводили только на двух полярных группах животных – ВУ и НУ, а СУ были исключены.

---

[2]При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении научных степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования (в скобках приведен импакт-фактор журнала, объем публикации в условных печатных листах/вклад автора в условных печатных листах):

1. **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 РИНЦ 0,880, RSCI (0,50/0,35) [**Dzhalilova D.Sh.**, Silina M.V., Kosyreva 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 WoS (JIF), Q4 (0,50/0,35)]
2. **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 РИНЦ 0,988, RSCI (0,50/0,35) [**Dzhalilova D.Sh.**, Silina M.V., Kosyreva 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 WoS (JIF), Q4 (0,50/0,35)]

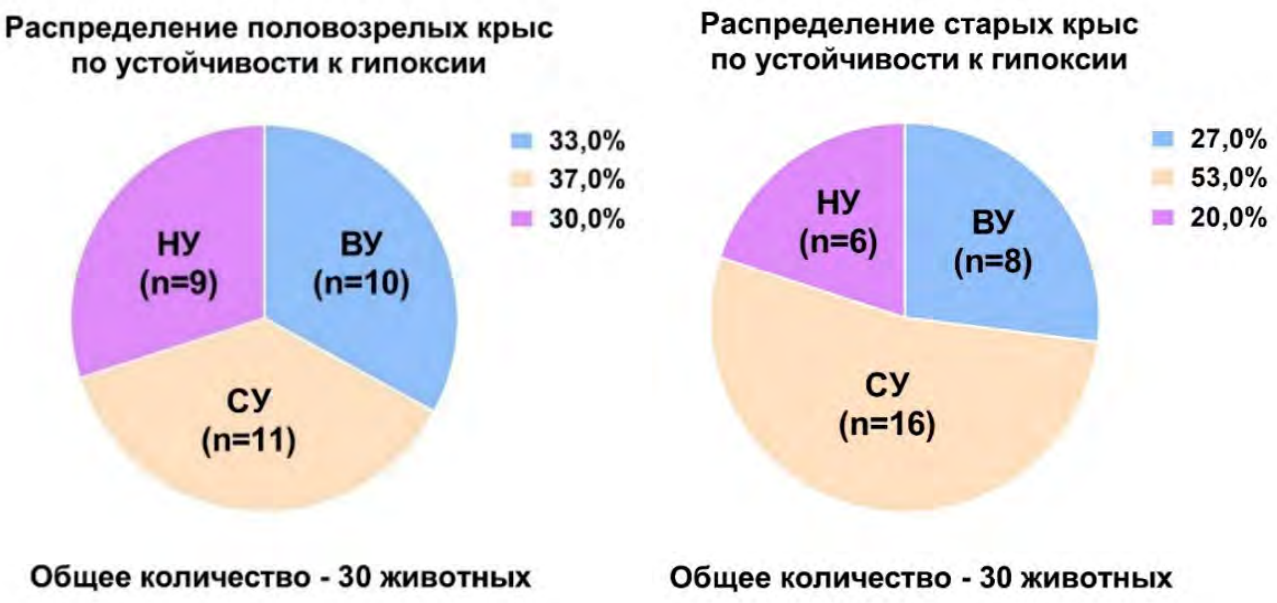


Рис. 3.2.1. Результаты разделения половозрелых и старых крыс Вистар в барокамере на критической «высоте» 11 500 м на ВУ, СУ и НУ

3.2.2. Сравнительная характеристика уровней экспрессии *Hif1a*, *Vegf* и *Nfkb* в печени, содержания белка HIF-1α в сыворотке крови у половозрелых и старых ВУ и НУ самцов крыс Вистар

В связи с тем, что печень является высокочувствительным к гипоксии органом, в ней определяли уровень экспрессии гена *Hif1a*, который был в 80 раз выше у половозрелых НУ крыс Вистар по сравнению с ВУ, однако у старых животных с разной устойчивостью к гипоксии различий не наблюдалось (табл. 3.2.1, рис. 3.2.2). При этом только у ВУ старых крыс уровень экспрессии гена *Hif1a* был выше по сравнению с половозрелыми, а у НУ – не различался. Таким образом, с возрастом уровень экспрессии гена *Hif1a* в печени повышался только у ВУ животных, а у НУ – не изменялся. Содержание белка HIF-1α в сыворотке крови не различалось у половозрелых и старых крыс с разной устойчивостью к гипоксии (табл. 3.2.1, рис. 3.2.2).

Таблица 3.2.1

Относительный уровень экспрессии генов *Hif1a*, *Vegf* и *Nfkb* в печени и содержание белка HIF-1α в сыворотке крови у половозрелых и старых ВУ и НУ крыс Вистар, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Группы наблюдения / **Параметры**	**Половозрелые**		**Старые**		**p**
	ВУ[1] (n=10)	**НУ[2] (n=9)**	**ВУ[3] (n=8)**	**НУ[4] (n=6)**	
Hif1a в печени, усл. ед., $\times 10^{-3}$	0,009 (0,001-0,029)	0,72 (0,20-0,93)	1,08 (0,73-2,29)	0,25 (0,11-1,80)	**0,01**$^{1-2}$; **0,02**$^{1-3}$ 0,94$^{2-4}$; 0,22$^{3-4}$
Vegf в печени, усл. ед., $\times 10^{-3}$	3,69 (2,14-3,69)	4,09 (3,69-7,22)	15,50 (10,36-27,16)	14,76 (4,51-25,24)	**0,03**$^{1-2}$; **0,001**$^{1-3}$ 0,11$^{2-4}$; 0,73$^{3-4}$
Nfkb в печени, усл. ед., $\times 10^{-3}$	0,047 (0,007-0,184)	0,10 (0,0009-0,203)	0,49 (0,29-0,97)	0,26 (0,08-0,60)	0,92$^{1-2}$; **0,004**$^{1-3}$ 0,06$^{2-4}$; 0,34$^{3-4}$
Белок HIF-1α в сыворотке крови, пг/мл	49,0 (41,5-100,0)	47,5 (36,0-63,5)	99,2 (14,3-400,3)	13,8 (9,7-42,6)	0,89$^{1-2}$; 0,99$^{1-3}$ 0,20$^{2-4}$; 0,34$^{3-4}$

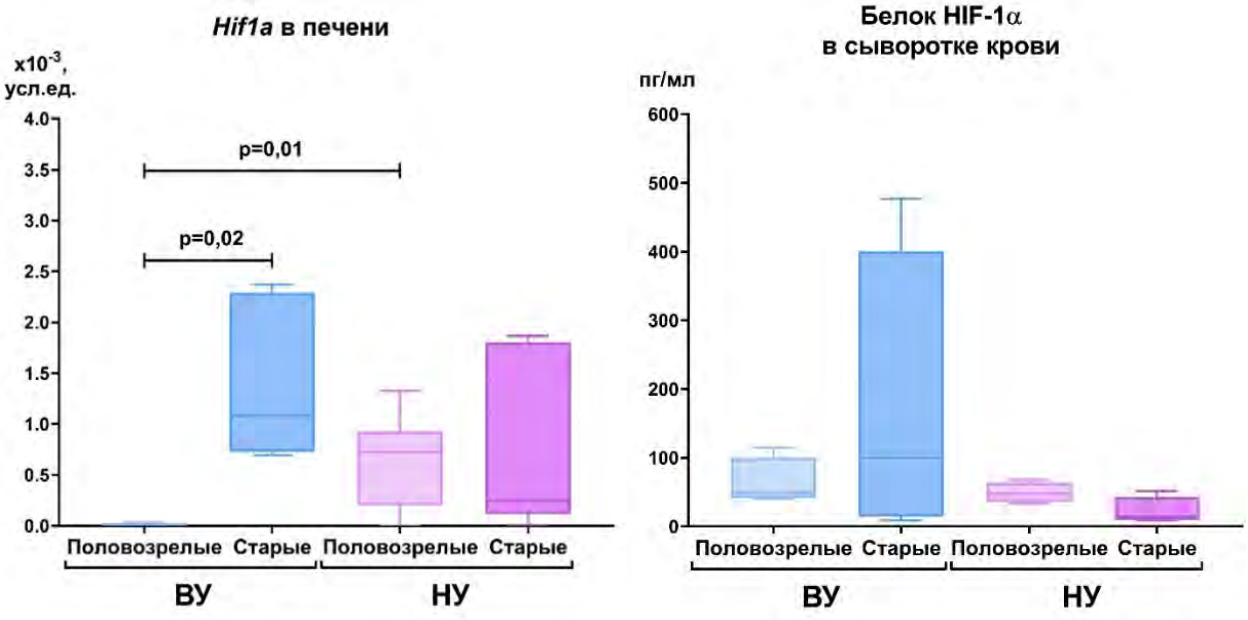


Рис. 3.2.2. Уровень экспрессии гена *Hif1a* в печени и содержание белка HIF-1α в сыворотке крови у половозрелых и старых ВУ и НУ крыс Вистар, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

У НУ половозрелых животных уровень экспрессии гена *Vegf* в печени был выше по сравнению с ВУ. При этом у ВУ старых крыс уровень экспрессии *Vegf* был выше по сравнению с половозрелыми, а у НУ – не различался (табл. 3.2.1, рис. 3.2.3).

Уровень экспрессии гена *Nfkb* в печени не различался как у половозрелых, так и у старых животных с разной устойчивостью к гипоксии, однако только у старых ВУ крыс он был статистически значимо выше по сравнению с половозрелыми (табл. 3.2.1, рис. 3.2.3). Повышение экспрессии *Hif1a, Vegf* и *Nfkb* в печени выявлено только у ВУ старых крыс по сравнению с половозрелыми, однако у ВУ и НУ старых животных различий по этим показателям не выявлено.

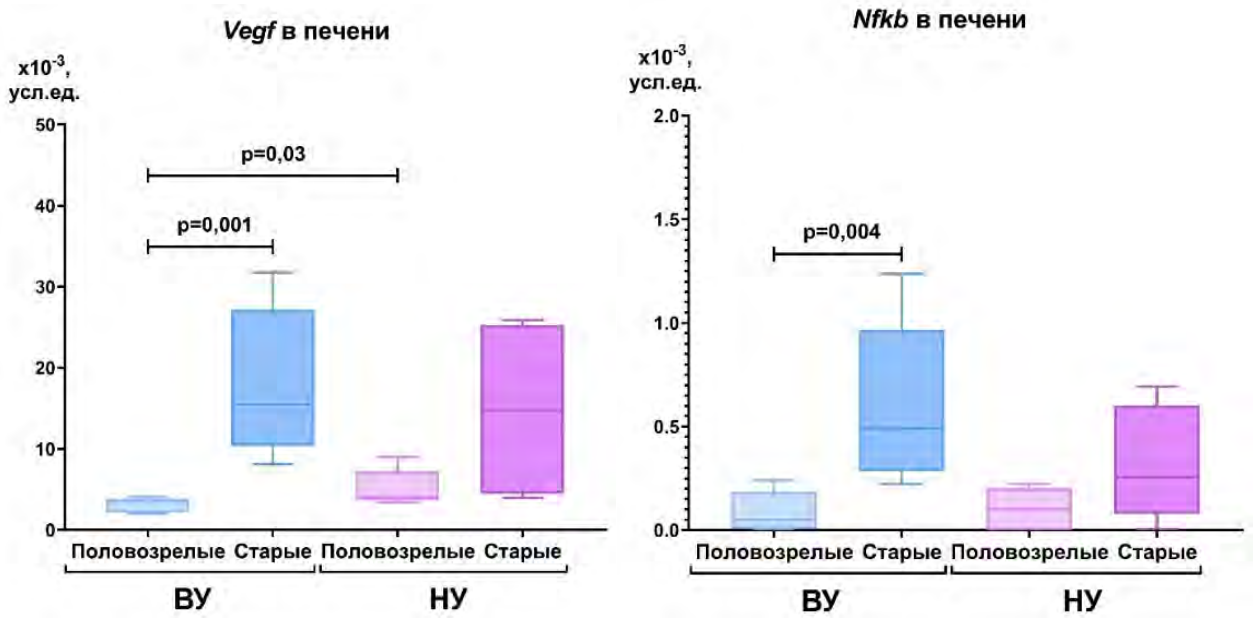


Рис. 3.2.3. Уровни экспрессии генов *Vegf* и *Nfkb* в печени у половозрелых и старых ВУ и НУ крыс Вистар, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

3.2.3. Сравнительная характеристика числа нейтрофилов в легких у половозрелых и старых ВУ и НУ самцов крыс Вистар

Легкие в физиологических условиях являются депо нейтрофилов, кроме того, в ответ на гипоксию происходит миграция нейтрофилов в просвет альвеол через межальвеолярные перегородки (Rossaint и Zarbock, 2013; Montgomery et al., 2017), поэтому в работе оценивали число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у половозрелых и старых ВУ и НУ самцов крыс Вистар.

Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких не различалось у ВУ и НУ половозрелых и старых крыс Вистар. При этом у старых крыс независимо от устойчивости к гипоксии число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких было выше по сравнению с половозрелыми (табл. 3.2.2, рис. 3.2.4, 3.2.5, 3.2.6).

Таблица 3.2.2

Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у половозрелых и старых ВУ и НУ крыс Вистар, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Группы наблюдения / Параметр	Половозрелые		Старые		p
	ВУ[1] (n=10)	НУ[2] (n=9)	ВУ[3] (n=8)	НУ[4] (n=6)	
Нейтрофилы, число клеток/25 000 мкм^2	2,3 (1,7-2,4)	1,9 (1,4-2,4)	8,4 (7,9-12,6)	9,6 (8,9-11,1)	0,52[1-2] **0,004**[1-3] **0,02**[2-4] 0,35[3-4]

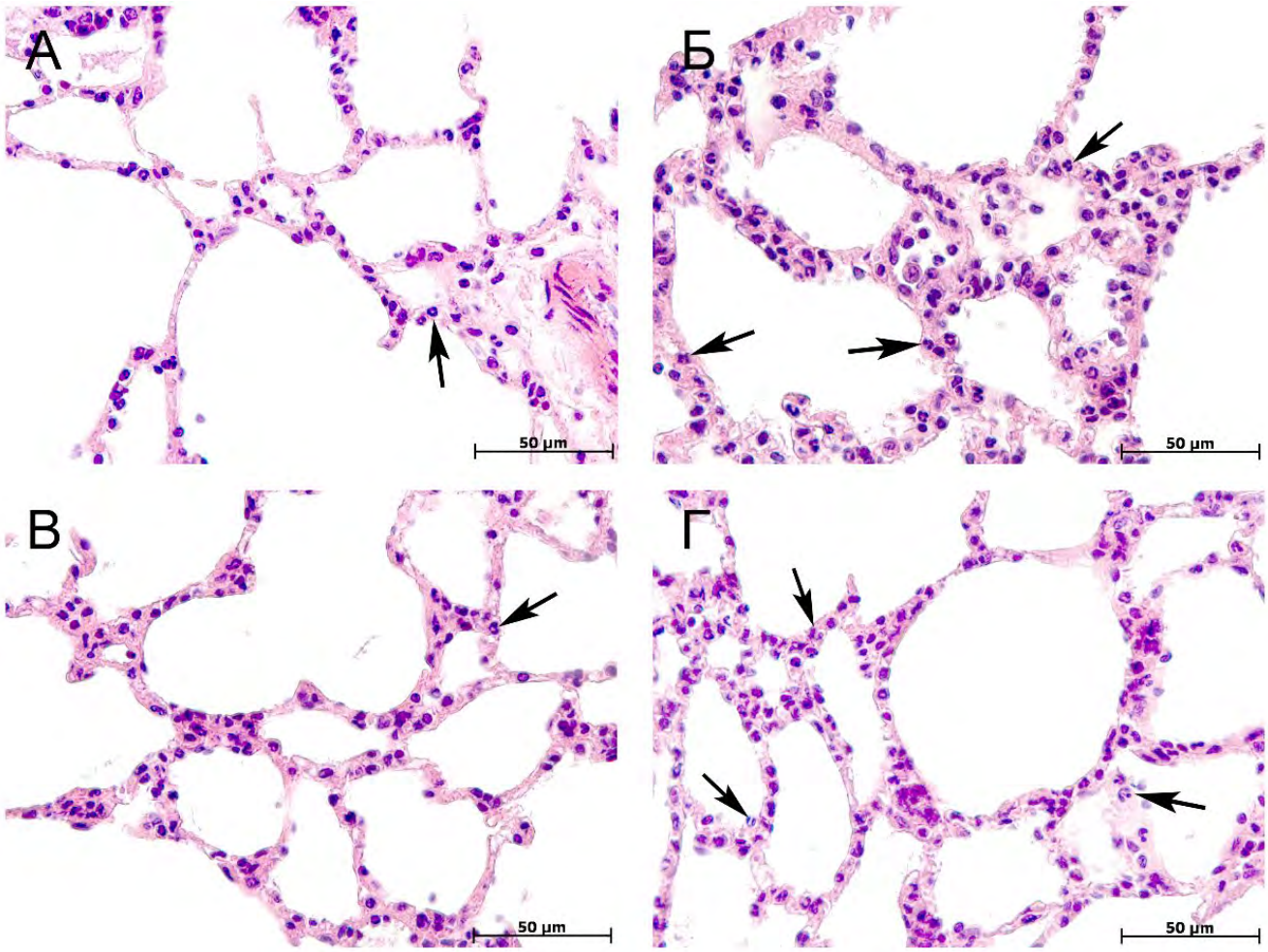


Рис. 3.2.4. Нейтрофилы (стрелки) в межальвеолярных перегородках легких у половозрелых и старых ВУ (А, Б) и НУ (В, Г) крыс Вистар. А, В – половозрелые крысы Вистар; Б, Г – старые крысы Вистар

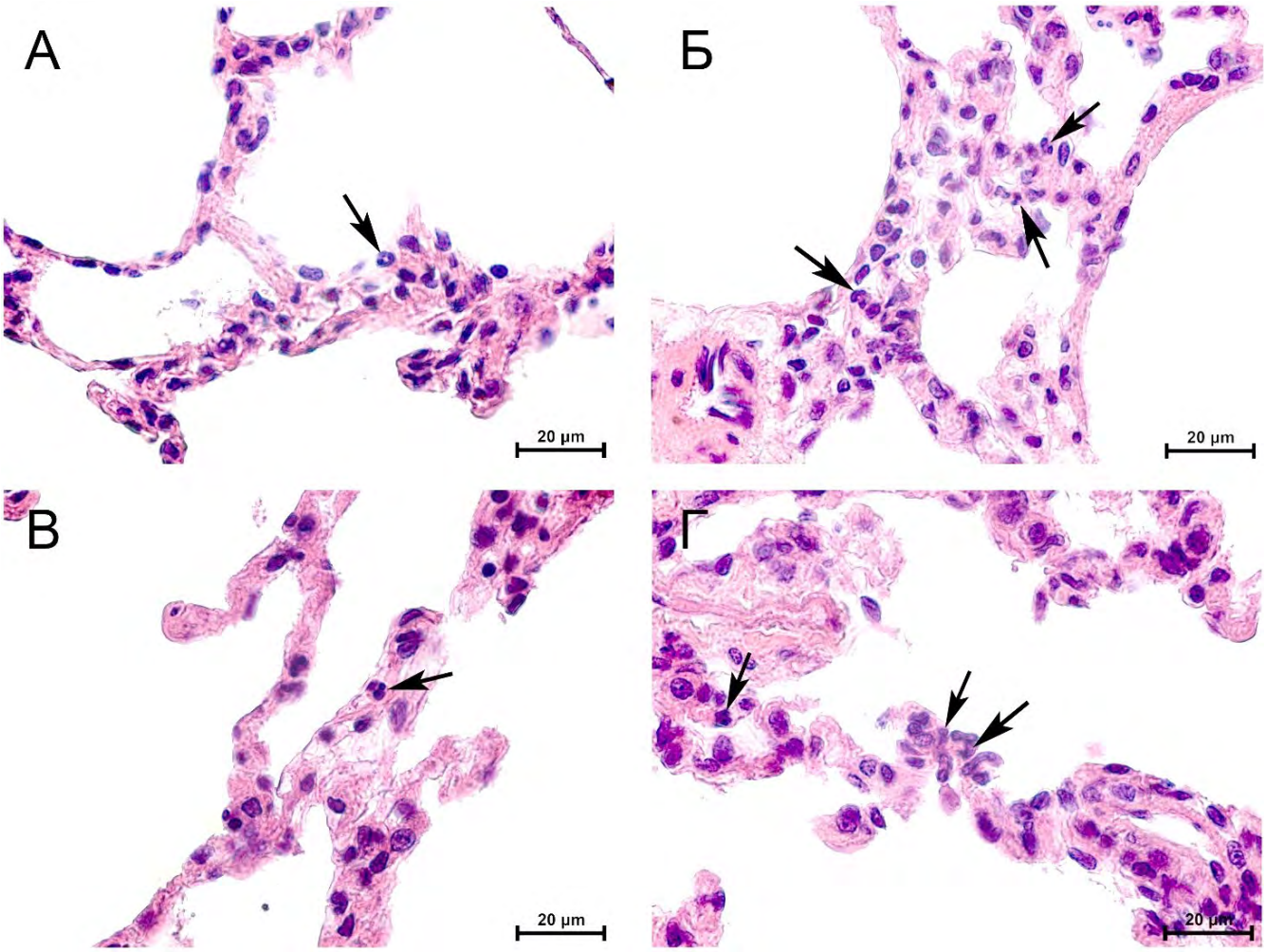


Рис. 3.2.5. Нейтрофилы (стрелки) в межальвеолярных перегородках легких у половозрелых и старых ВУ (А, Б) и НУ (В, Г) крыс Вистар. А, В – половозрелые крысы Вистар; Б, Г – старые крысы Вистар

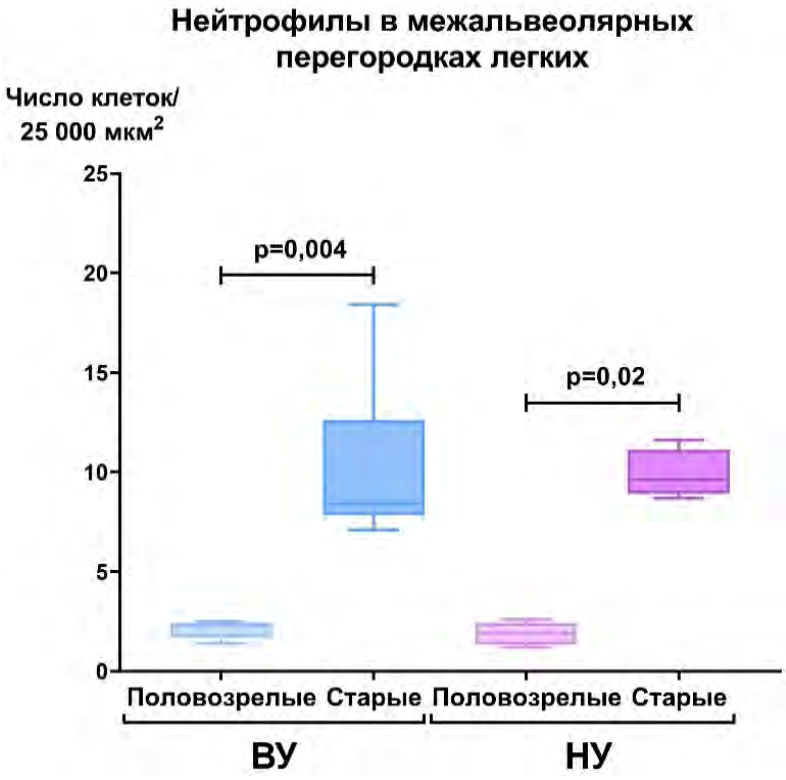


Рис. 3.2.6. Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у половозрелых и старых ВУ и НУ крыс Вистар, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Заключение и обсуждение к 3.2

По результатам определения устойчивости к гипоксии в барокамере оказалось, что среди старых самцов крыс Вистар, как и среди половозрелых, на «высоте» 11 500 м можно выделить ВУ и НУ особей, «время жизни» которых на «высоте» различалось минимум в три раза (более 240 с и менее 80 с). Показано, что у старых крыс Вистар по сравнению с половозрелыми различия изученных показателей менее выражены – уровни экспрессии генов *Hif1a* и *Vegf* в печени были выше у половозрелых НУ животных по сравнению с ВУ, однако у старых крыс с разной устойчивостью к гипоксии различий не наблюдалось. При этом только у ВУ старых крыс уровни экспрессии генов *Hif1a*, *Vegf* и *Nfkb* в печени были выше по сравнению с половозрелыми, а у НУ – не различались. Таким образом, с возрастом уровни экспрессии генов *Hif1a*, *Vegf* и *Nfkb* в печени повышались только у ВУ животных, а у НУ – не изменялись, однако у ВУ и НУ старых крыс Вистар различий по этим показателям не выявлено. Содержание белка HIF-1α в сыворотке крови не различалось у половозрелых и старых крыс с разной устойчивостью к гипоксии. Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких было выше у старых животных по сравнению с половозрелыми независимо от устойчивости к гипоксии.

Показано, что половозрелые животные на критической «высоте» делятся на ВУ, СУ и НУ, при этом «время жизни» до принятия бокового положения у ВУ и НУ организмов различается не менее чем в три раза (Каркищенко, 2017; Лукьянова, 2019; Jain et al., 2013; Kirova et al., 2013;

Dzhalilova et al., 2018, 2019a). Молекулярно-биологические особенности у двух полярных по исходной устойчивости к гипоксии групп – ВУ и НУ половозрелых животных 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., 2018, 2019a). Тем не менее, в литературе отсутствуют данные об устойчивости к недостатку кислорода старых крыс Вистар. По данным М.М. Середенко (1963) старые животные (крысы, собаки) менее устойчивы к гипоксии по сравнению с половозрелыми. Что касается человека, то данные по устойчивости людей разных возрастных периодов к острой горной болезни противоречивы. X.-G. Tang и соавт. (2014) показали, что возраст является независимым фактором риска развития острой горной болезни. Однако по другим данным возраст не играет важной роли в чувствительности к острой горной болезни (Ziaee et al., 2003; Wu et al., 2018б), а люди в возрасте старше 40-60 лет менее предрасположены к развитию острой горной болезни, чем более молодые (Honigman, 1993).

При этом известно, что с возрастом происходит увеличение числа мутаций, уровня окислительного стресса, воспаления, связанного со старением – инфламэйджинга (inflammaging), что повышает вероятность развития злокачественных опухолей. Старение является наиболее важным фактором риска опухолевых заболеваний, распространенность которых резко увеличивается с возрастом, достигая пика около 85-90 лет (Montégut et al., 2024; Siegel et al., 2024). Поэтому с целью выбора оптимального возрастного периода для изучения взаимосвязи устойчивости к недостатку кислорода и развития опухолей мы исследовали устойчивость к гипоксии половозрелых (10-12 недель) и старых (72 недели) крыс Вистар.

Полученные в работе данные о более высокой экспрессии *Hif1a* в печени у НУ половозрелых животных согласуются с литературными сведениями и нашими предыдущими результатами (Kirova et al., 2013; Dzhalilova et al., 2019a). Считается, что развитие гипоксии, а также повышение уровней АФК и провоспалительных цитокинов, наблюдающиеся при воспалении и старении (инфламэйджинг), приводят к активации HIF-1α, поэтому этот фактор играет одну из ключевых ролей в развитии возраст-ассоциированных заболеваний (Islam, 2017). С другой стороны, активация HIF-1α рассматривается как адаптивный механизм, способствующий выживанию клеток и увеличению продолжительности жизни, а гипоксическое воздействие предлагается в качестве средства для достижения долголетия (Tregub et al., 2024a; Nisar et al., 2025). Показано как увеличение, так и снижение уровней экспрессии гена и содержания белка HIF-1α с возрастом (Kang et al., 2005; Ndubuizu et al., 2009). O.I. Ndubuizu и соавт. (2009) показали, что с возрастом в ответ на гипоксию уменьшается синтез HIF-1α и зависимых белков (VEGF, GLUT-1, EPO) в коре головного мозга крыс, однако уровень

экспрессии гена, кодирующего HIF-1α, не изменяется. Однако по данным M.J. Kang и соавт. (2005) в печени крыс содержание белка HIF-1α и его ДНК-связывающая активность с возрастом увеличиваются. Противоречивость данных во многом может быть связана с различиями в исходной устойчивости организма к гипоксии, которая не учитывалась при проведении этих исследований.

Увеличение с возрастом окислительного стресса и повреждения макромолекул, вызванное повышением продуцируемых митохондриями АФК, считается одним из механизмов старения и было выявлено у широкого спектра организмов от дрожжей до человека (Pomatto и Davies, 2018). Окислительный стресс и повреждение клеточных мембран при старении приводят к активации фактора NF-κB, регулирующего воспаление, а также HIF-1α (Korbecki et al., 2021; Pham et al., 2021). Активация провоспалительного ответа в пожилом и старческом возрасте во многом определяет возникновение хронических воспалительных, опухолевых и нейродегенеративных заболеваний (Salminen et al., 2016; Kosyreva et al., 2022). По сравнению с другими возрастными группами, лица пожилого возраста более подвержены тяжелому течению инфекционных и воспалительных заболеваний, в том числе COVID-19 и сепсиса (Farshbafnadi et al., 2021). Вероятно, повышение экспрессии *Nfkb* у ВУ животных с возрастом взаимосвязано с повышением экспрессии *Hif1a,* так как известно, что эти транскрипционные факторы взаимно регулируются (Rastogi et al., 2023).

По данным литературы с возрастом в печени увеличивается содержание HIF-зависимых белков, таких как VEGF, EPO и iNOS (Kang et al., 2005). В половозрелом периоде в условиях нормоксии у НУ животных по сравнению с ВУ наблюдаются повышенные уровни экспрессии *Hif1a* и *Vegf* в печени, а с возрастом только у ВУ крыс увеличиваются уровни экспрессии *Hif1a*, *Vegf* и *Nfkb*. Это может обусловливать разную предрасположенность к развитию воспалительных заболеваний в зависимости от устойчивости к гипоксии и возраста, так как известно, что VEGF регулирует воспалительные реакции: повышает проницаемость сосудов, стимулирует пролиферацию эндотелиальных клеток и ангиогенез, хемотаксис и миграцию нейтрофилов и макрофагов. Кроме того, при воспалении гипоксия и увеличение содержания провоспалительного цитокина IL-1β способствуют синтезу VEGF путем связывания HIF-1 с HREs в промотере его гена, что приводит к повышению проницаемости сосудов и миграции иммунных клеток (El Awad et al., 2000). Тем не менее, по нашим данным число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у ВУ и НУ половозрелых и старых крыс не различалось, но было выше у старых животных по сравнению с половозрелыми.

Таким образом, с возрастом происходят изменения экспрессии генов, регулирующих ответ на гипоксию и воспаление – *Hif1a*, *Vegf* и *Nfkb* в условиях нормоксии (рис. 3.2.7). Только у старых ВУ крыс Вистар уровень их экспрессии повышается по сравнению с половозрелыми. При этом

нами также показано (Dzhalilova et al., 2023б), что через 6 ч после введения ЛПС динамика изменения экспрессии этих генов сходна у старых животных с разной устойчивостью к гипоксии, но повышение экспрессии более выражено у НУ половозрелых крыс. Через 6 ч после введения ЛПС у старых животных различия тяжести течения СВО между ВУ и НУ крысами менее выражены по сравнению с половозрелым периодом. Следовательно, для изучения особенностей опухолевого процесса, особенно на фоне воспаления, включая его локальные и системные проявления, и выявления различий между ВУ и НУ организмами, целесообразно использовать животных половозрелого периода.

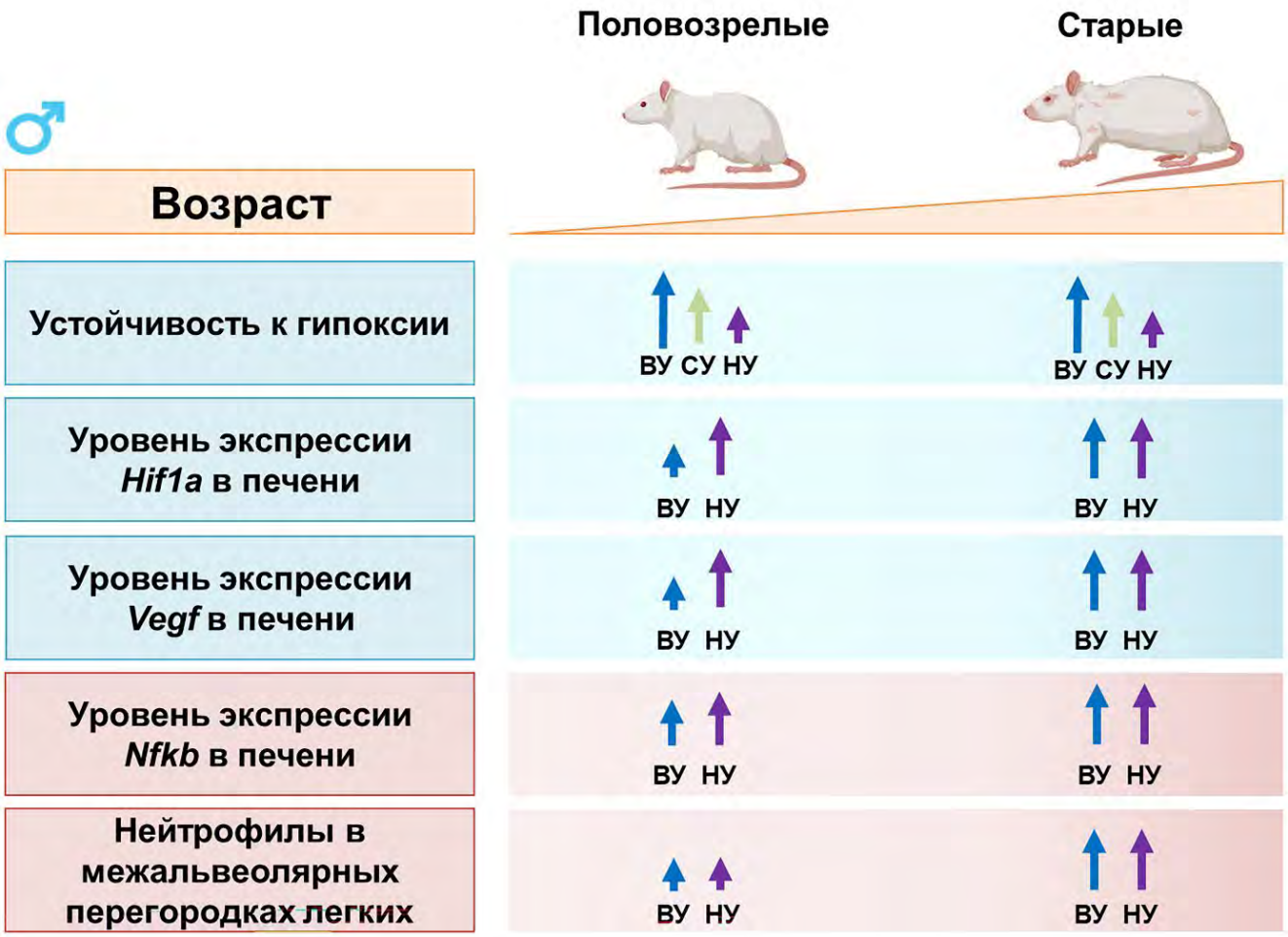


Рис. 3.2.7. Сравнительная характеристика устойчивости к гипоксии, уровней экспрессии *Hif1a*, *Vegf* и *Nfkb* в печени и числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у ВУ и НУ половозрелых и старых крыс Вистар

По данным проведенных нами исследований (Dzhalilova et al., 2021, 2023б, 2024б) показано, что новорожденные, препубертатные, половозрелые и старые самцы крыс Вистар различаются по устойчивости к гипоксии, при этом внутри групп половозрелых и старых животных можно выделить ВУ и НУ. Эти особенности сопряжены с различиями в экспрессии *Hif1a* и *Vegf* в печени у ВУ и НУ животных в условиях нормоксии в половозрелом периоде. С возрастом эти показатели изменяются у ВУ и НУ крыс неодинаково, что может вносить вклад в дальнейшие исследования.

Кроме того, различия у ВУ и НУ старых крыс менее выражены по сравнению с половозрелыми, поэтому исследование механизмов опухолевого роста в зависимости от исходной устойчивости к гипоксии и поиск неинвазивных способов ее определения целесообразно проводить у половозрелых животных.

Раздел 2. Взаимосвязь инициации и прогрессии опухолей и устойчивости к гипоксии

Существует множество экспериментальных подходов для изучения онкогенеза. Однако наиболее адекватной и высоковоспроизводимой моделью развития злокачественных опухолей от момента инициации на фоне хронического воспаления до прогрессии является модель колит-ассоциированного КРР с помощью АОМ и ДСН у мышей. Для изучения опухолевой прогрессии перспективными представляются модели наиболее злокачественных опухолей, например, глиобластомы. Однако частота метастазирования в этих моделях низкая, поэтому для изучения метастазирования наиболее адекватной моделью является перевиваемая клеточная линия карциномы легких Льюис мышей. Задачами данного раздела работы было исследование морфологических, молекулярно-биологических и иммунологических особенностей инициации опухолевого процесса на модели колит-ассоциированного КРР, а также опухолевой прогрессии и выраженности СВО на моделях глиобластомы 101.8 и карциномы легких Льюис у ВУ и НУ животных.

3.3. Морфологическая характеристика язвенного и воспалительного процессов в ободочной кишке и морфофункциональные особенности иммунной системы при остром колите у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6[3]

Наиболее широко используемой и высоковоспроизводимой моделью злокачественного опухолевого процесса на фоне хронического воспаления является модель колит-ассоциированного КРР у мышей (Li et al., 2022). ЯК – это ВЗК, которое увеличивает риск развития КРР в 2,4 раза (Jess et al., 2012). На модели ЯК, индуцированного ДСН, было 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; Mähler et al., 1998; Melgar et al., 2005).

---

[3]При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении научных степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования (в скобках приведен импакт-фактор журнала, объем публикации в условных печатных листах/вклад автора в условных печатных листах):

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 РИНЦ 0,472, RSCI (0,35/0,25)
2. **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, Scopus (SJR), Q4 (0,60/0,50)

Одним из возможных механизмов, обусловливающих индивидуальную вариабельность тяжести течения острого и хронического колита может быть устойчивость к гипоксии, так как воспаление сопровождается кислородной недостаточностью и активацией HIF-1α и NF-κB, что влияет на тяжесть течения ЯК (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. Перед моделированием КРР были проведены эксперименты по выявлению различий между ВУ и НУ мышами по тяжести течения острого и хронического колита.

По результатам определения устойчивости к гипоксии в барокамере по «времени жизни» на «высоте» 10 000 м среди половозрелых мышей C57Bl/6 32,5% оказались ВУ со «временем жизни» более 10 мин, 22,5% – НУ со «временем жизни» менее 3 мин (рис. 3.3.1).

Рис. 3.3.1. Результаты разделения половозрелых самцов мышей C57Bl/6 в барокамере на критической «высоте» 10 000 м на ВУ, СУ и НУ

3.3.1. Клинические проявления острого язвенного колита у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6

При остром колите, индуцированном 1,5%-ым ДСН, гибели как ВУ, так и НУ животных не наблюдалось. В конце эксперимента как у ВУ, так и у НУ мышей наблюдалось снижение двигательной активности – уменьшалась интенсивность передвижения животных в клетке. Кроме того, была выражена болевая поза – лапы поджаты к туловищу, наблюдался перенос тяжести тела на задние лапы, изогнутая спина, выпрямленный хвост (рис. 3.3.2).

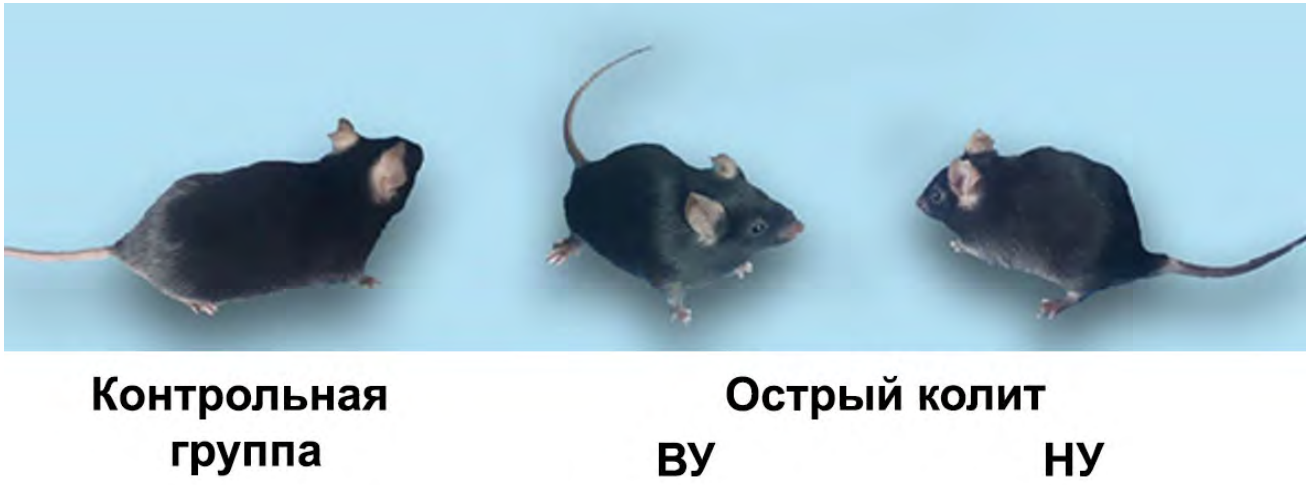


Рис. 3.3.2. Внешний вид мышей контрольной группы и с острым колитом – болевая поза – лапы поджаты к туловищу, перенос тяжести тела на задние лапы, изогнутая спина

При клиническом наблюдении как у ВУ, так и у НУ мышей с острым колитом отмечалось наличие диареи с примесью крови. С 3-х по 7-е сут эксперимента наблюдалась диарея у 9 из 20 (45%) ВУ мышей и у 9 из 12 (75%) НУ животных, у некоторых – с примесью крови. По результатам полуколичественной оценки выраженности клинических проявлений острого колита показано, что у НУ мышей по сравнению с ВУ показатели балльной оценки были статистически значимо выше (p=0,03) на 7-е сут эксперимента (рис. 3.3.3).

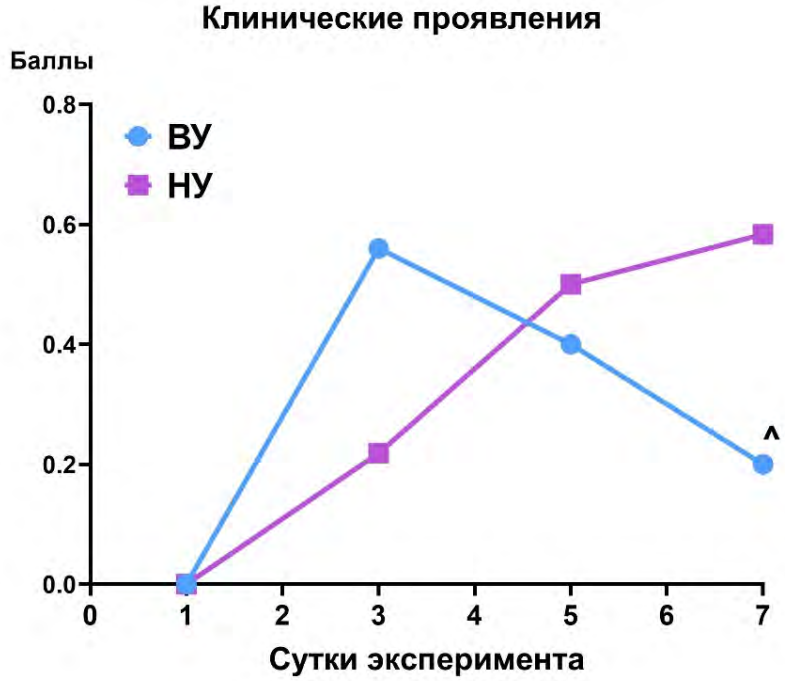


Рис. 3.3.3. Полуколичественная оценка клинических проявлений острого колита у ВУ (n=20) и НУ (n=12) мышей опытных групп, потреблявших 1,5%-ый ДСН в течение 5 сут. ^ – статистически значимые различия (p<0,05) по сравнению с НУ мышами, критерий Манна-Уитни

Масса животных в ходе эксперимента статистически значимо снижалась по сравнению с началом исследования независимо от устойчивости к гипоксии – показатели не различались у ВУ и НУ мышей (табл. 3.3.1 Приложения 3, рис. 3.3.4).

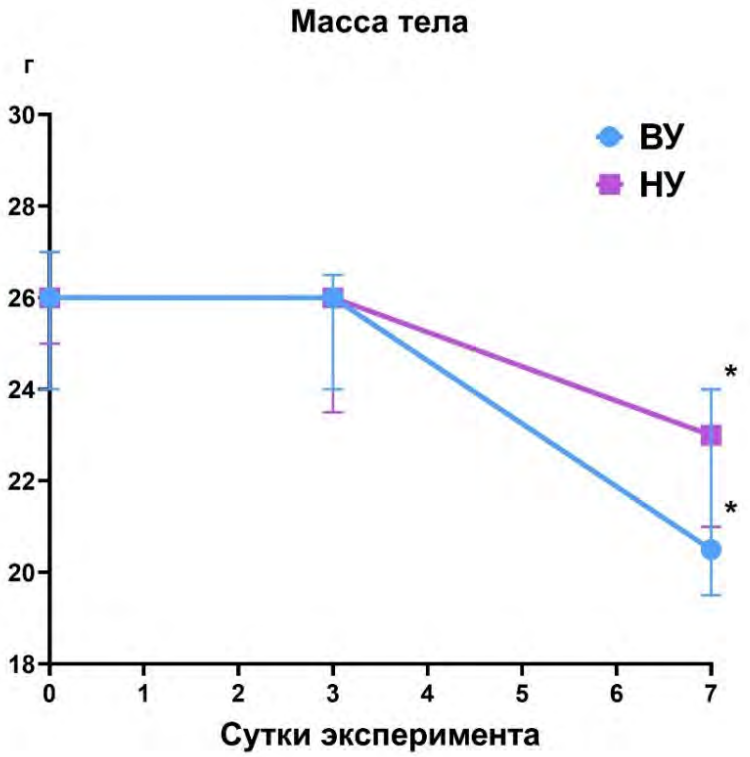


Рис. 3.3.4. Изменение массы тела в разные сроки потребления 1,5%-го ДСН у ВУ (n=20) и НУ (n=12) мышей, Me (25%-75%), * – статистически значимые различия (p<0,05) по сравнению с началом и 3-ми сутками эксперимента (критерии Краскела-Уоллиса и Данна)

3.3.2. Показатели длины ободочной кишки при остром язвенном колите у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6

При макроскопическом исследовании ободочной кишки выявлено уменьшение ее длины у ВУ и НУ мышей с острым колитом по сравнению с животными контрольных групп (рис. 3.3.5). При морфометрическом исследовании также обнаружено статистически значимое уменьшение длины ободочной кишки как у ВУ, так и у НУ мышей с острым колитом по сравнению с животными контрольных групп, при этом показатели длины кишки у ВУ и НУ мышей контрольных групп и с острым колитом не различались (табл. 3.3.2).

Рис. 3.3.5. Ободочная кишка мышей контрольных групп и с острым колитом до (слева) и после (справа) вскрытия. Заметно уменьшение длины кишки при остром колите

Таблица 3.3.2

Длина ободочной кишки у ВУ и НУ мышей контрольных групп и с острым колитом, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Группы наблюдения	**Длина ободочной кишки, см**		**p**
	Контроль	**Острый колит**	
ВУ	6,0 (6,0-6,2)	4,6 (4,1-5,2)	**0,0002**
НУ	5,8 (5,0-7,0)	4,3 (4,1-4,8)	**0,002**
p (ВУ-НУ)	0,28	0,49	

3.3.3. Морфологическое и морфометрическое исследование ободочной кишки при остром язвенном колите у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6

При морфологическом исследовании гистологических срезов 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. 3.3.6, А, Б, рис. 3.3.7, А, Б, черные стрелки). Много бокаловидных клеток (рис. 3.3.6, А, Б, рис. 3.3.7, А, Б, голубые стрелки). Среди рыхлой волокнистой соединительной ткани СПСО обнаружено небольшое количество диффузно рассеянных клеточных элементов – лимфоцитов, гистиоцитов и единичных плазмоцитов. Между ВУ и НУ животными контрольных групп по морфологическим особенностям ободочной кишки различий не обнаружено.

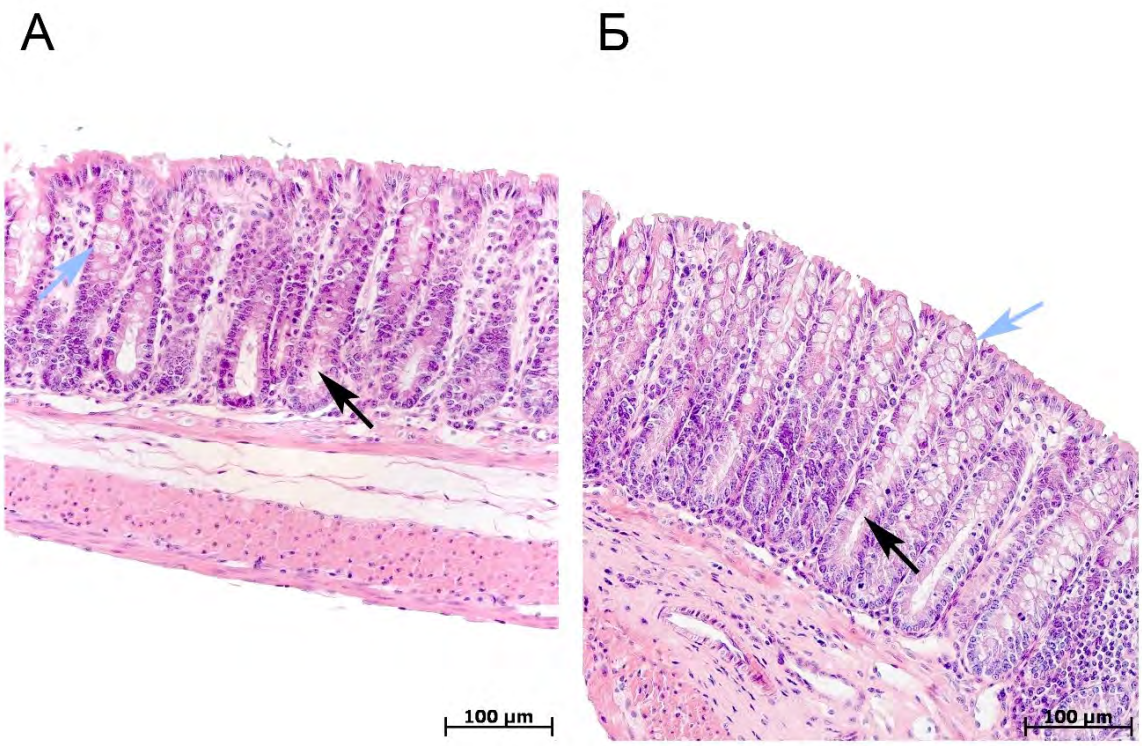


Рис. 3.3.6. Морфологическая характеристика дистального отдела ободочной кишки у ВУ (А) и НУ (Б) мышей контрольных групп. Эпителиальная выстилка сохранена, крипты узкие и глубокие (черные стрелки), много бокаловидных клеток (голубые стрелки). Окраска гематоксилином и эозином

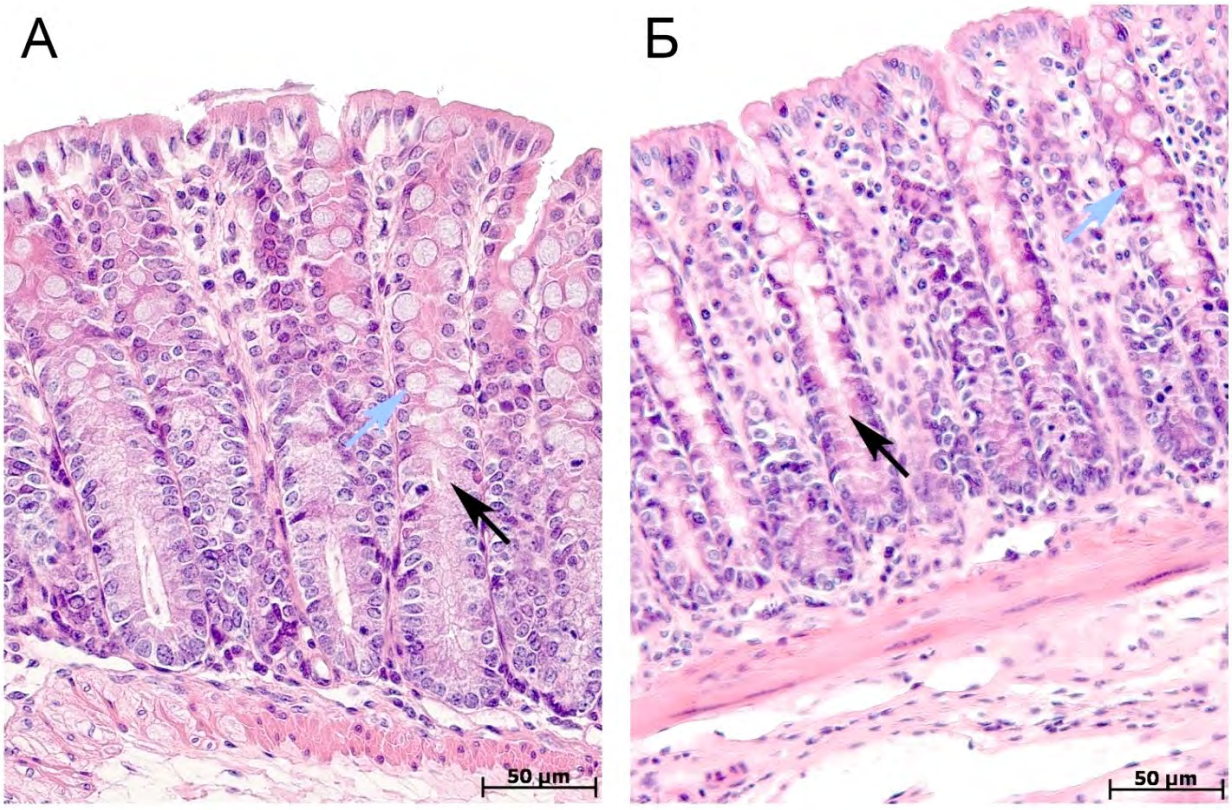


Рис. 3.3.7. Морфологическая характеристика дистального отдела ободочной кишки у ВУ (А) и НУ (Б) мышей контрольных групп. Эпителиальная выстилка сохранена, крипты узкие и глубокие (черные стрелки), много бокаловидных клеток (голубые стрелки). Окраска гематоксилином и эозином

При морфологическом исследовании ободочной кишки у животных обеих опытных групп была выявлена картина острого ЯК (рис. 3.3.8), воспалительные изменения в ободочной кишке у ВУ и НУ мышей были сходными и имели мозаичные проявления. Обнаружены зоны с катаральными воспалительными и с выраженными язвенно-воспалительными изменениями.

В зонах с катаральными воспалительными изменениями слизистой оболочки ободочной кишки эпителиальная выстилка сохранена, крипты были расширены и заполнены слизью (рис. 3.3.8, А, голубая стрелка), выявлена воспалительная инфильтрация СПСО (рис. 3.3.8, А, черная стрелка). На поверхности эпителия выявлены зоны, покрытые слизью с лейкоцитами. СПСО и подслизистая основа были утолщены и отечны, в них обнаружены клетки воспалительного инфильтрата (рис. 3.3.9, А, Б): лимфоциты (черные стрелки), плазмоциты (зеленые стрелки), гистиоциты (синие стрелки), а также фибробласты и фиброциты. Наблюдалось полнокровие кровеносных сосудов. Изменений в мышечной пластинке и мышечном слое ободочной кишки не выявлено.

В зонах с выраженными язвенно-воспалительными изменениями (рис. 3.3.8, Б-Г) выявлены язвы с явлениями эпителизации (рис. 3.3.8, Б, рис. 3.3.10, А, зеленые стрелки) и без эпителизации (рис. 3.3.8, В, синяя стрелка), с наложениями лейкоцитов и эозинофильных нитей фибрина (рис. 3.3.8, Г, рис. 3.3.10, Б, красные стрелки). Альтеративные и воспалительные изменения были максимально выражены в дистальном отделе ободочной кишки, снижаясь в проксимальном направлении. Поверхность обширных язв, распространяющихся вплоть до мышечной пластинки, была заполнена скоплениями лейкоцитов, СПСО в дне язв была замещена грануляционной тканью с большим количеством лимфоцитов, гистиоцитов и нейтрофилов, а также фибробластов и фиброцитов. Обнаружены единичные крипт-абсцессы – скопления нейтрофилов в просветах разрушенных крипт. В язвах с явлениями эпителизации края были выстланы однослойным кубическим эпителием. По краям эрозий и язв наблюдались регенераторные изменения, крипты были с высоким призматическим эпителием и большим количеством митотически делящихся клеток с гиперхромными ядрами. Мышечная пластинка не изменена. Подслизистая основа под дном язв резко расширена и отечна, в ней выявлена воспалительная инфильтрация из лимфоцитов, гистиоцитов и нейтрофилов. Кровеносные сосуды полнокровны.

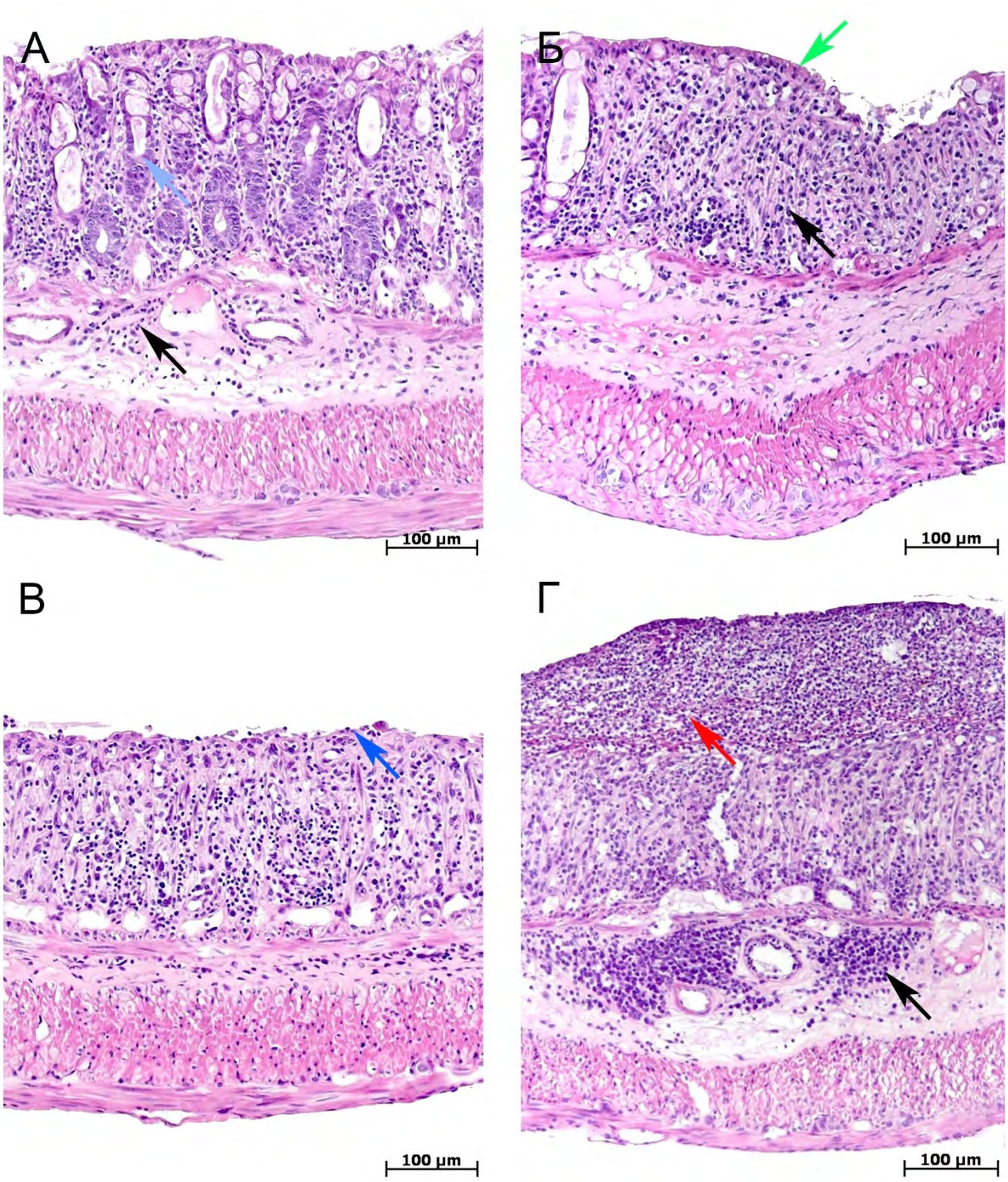


Рис. 3.3.8. Морфологическая характеристика дистального отдела ободочной кишки при остром колите у мышей C57Bl/6. А – катаральные воспалительные изменения, крипты расширены и заполнены слизью (голубая стрелка), бокаловидных клеток мало. СПСО и подслизистая основа расширены и инфильтрированы воспалительными клетками (черная стрелка); Б – участок язвы с явлениями эпителизации, края выстланы однослойным кубическим эпителием (зеленая стрелка), дно язвы представлено грануляционной тканью с выраженной воспалительной инфильтрацией (черная стрелка); В – участок язвы без эпителизации (синяя стрелка); Г – участок язвы с наложениями лейкоцитов и нитей фибрина на поверхности (красная стрелка), воспалительная инфильтрация подслизистой основы (черная стрелка). Окраска гематоксилином и эозином

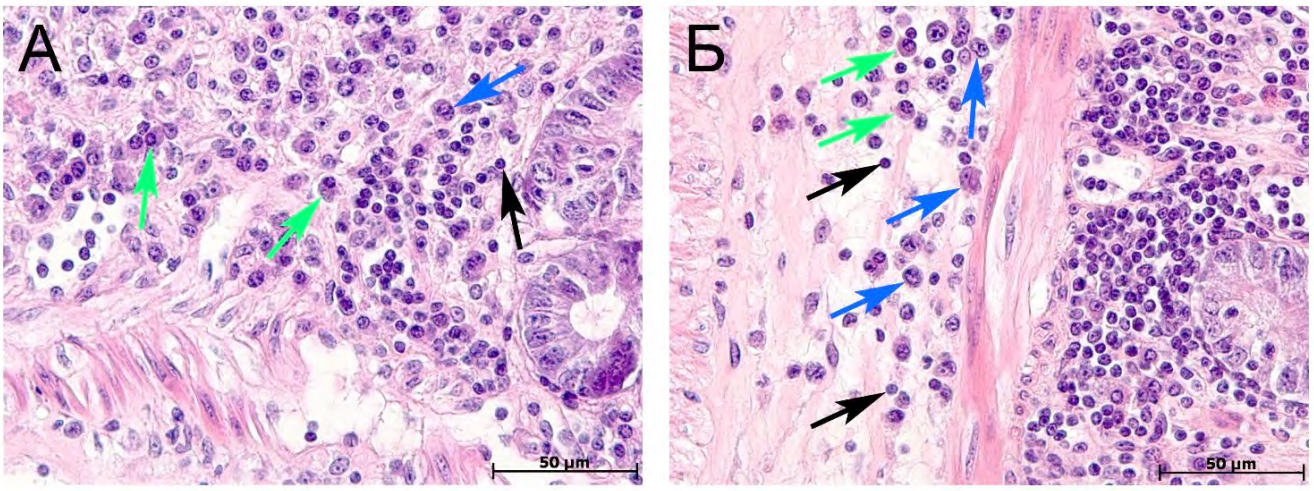


Рис. 3.3.9. Морфологическая характеристика дистального отдела ободочной кишки при остром колите у ВУ (А) и НУ (Б) мышей С57Bl/6. А – воспалительная инфильтрация СПСО и подслизистой основы представлена плазмоцитами (зеленые стрелки), лимфоцитами (черная стрелка), гистиоцитами (синяя стрелка); Б – воспалительная инфильтрация СПСО и подслизистой основы представлена плазмоцитами (зеленые стрелки), лимфоцитами (черные стрелки), гистиоцитами (синие стрелки). Окраска гематоксилином и эозином

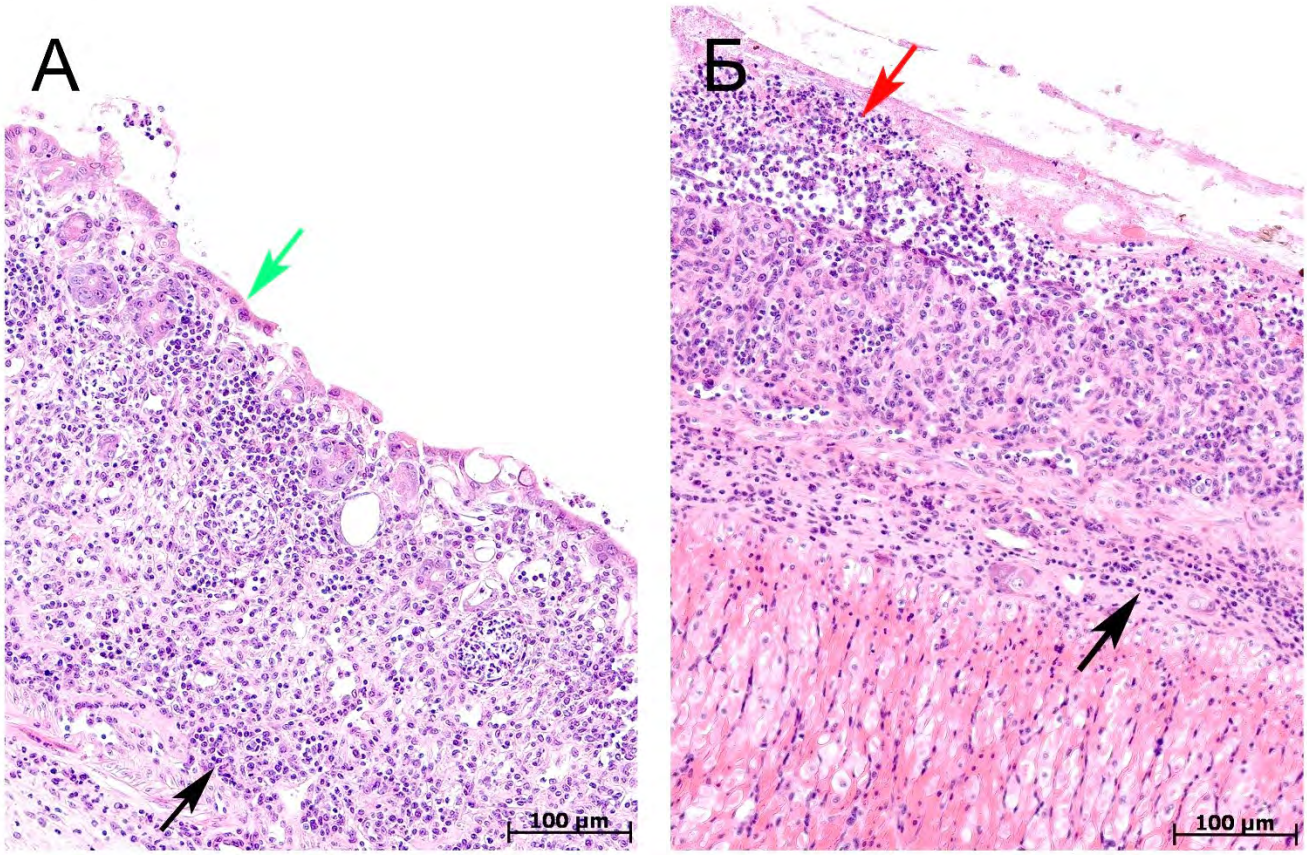


Рис. 3.3.10. Морфологическая характеристика дистального отдела ободочной кишки при остром колите у ВУ (А) и НУ (Б) мышей С57Bl/6. А – эпителизированная язва (зеленая стрелка), воспалительная инфильтрация СПСО и подслизистой основы (черная стрелка); Б – участок язвы с наложениями лейкоцитов и нитей фибрина на поверхности (красная стрелка), воспалительная инфильтрация подслизистой основы (черная стрелка). Окраска гематоксилином и эозином

По данным морфометрического исследования у НУ мышей относительная распространенность язв с фибрином в слизистой оболочке медиального отдела ободочной кишки была статистически значимо выше по сравнению с ВУ (табл. 3.3.3, 3.3.4 Приложения 3, рис. 3.3.11, рис. 3.3.12). Относительная распространенность язв без эпителизации была выше в проксимальном отделе ободочной кишки у НУ мышей по сравнению с ВУ (табл. 3.3.5 Приложения 3, рис. 3.3.11, рис. 3.3.12). Относительная распространенность язв с эпителизацией в медиальном отделе ободочной кишки по сравнению с НУ была в 2,6 раза выше у ВУ мышей (табл. 3.3.6 Приложения 3, рис. 3.3.11, рис. 3.3.13). В целом относительная распространенность всех типов язв была наибольшей в дистальном отделе ободочной кишки (табл. 3.3.7).

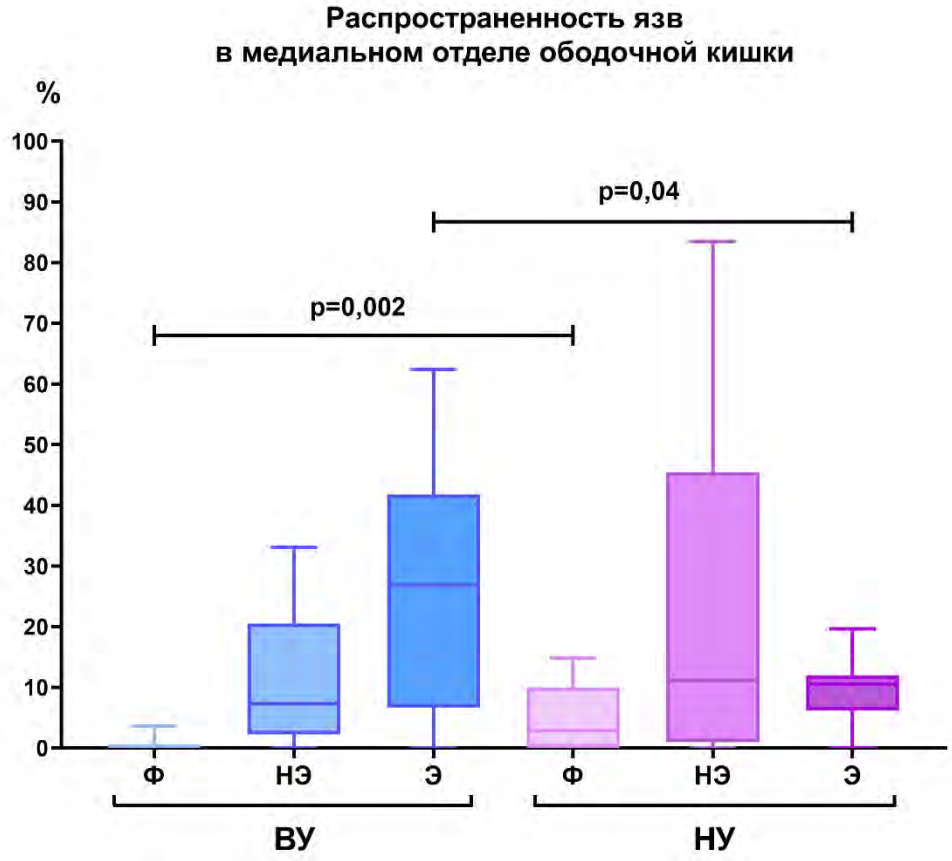


Рис. 3.3.11. Относительная распространенность (% к длине ободочной кишки) неэпителизированных (НЭ), эпителизированных (Э) язв и язв с фибрином (Ф), в медиальном отделе ободочной кишки при остром колите у ВУ (n=20) и НУ (n=12) мышей, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

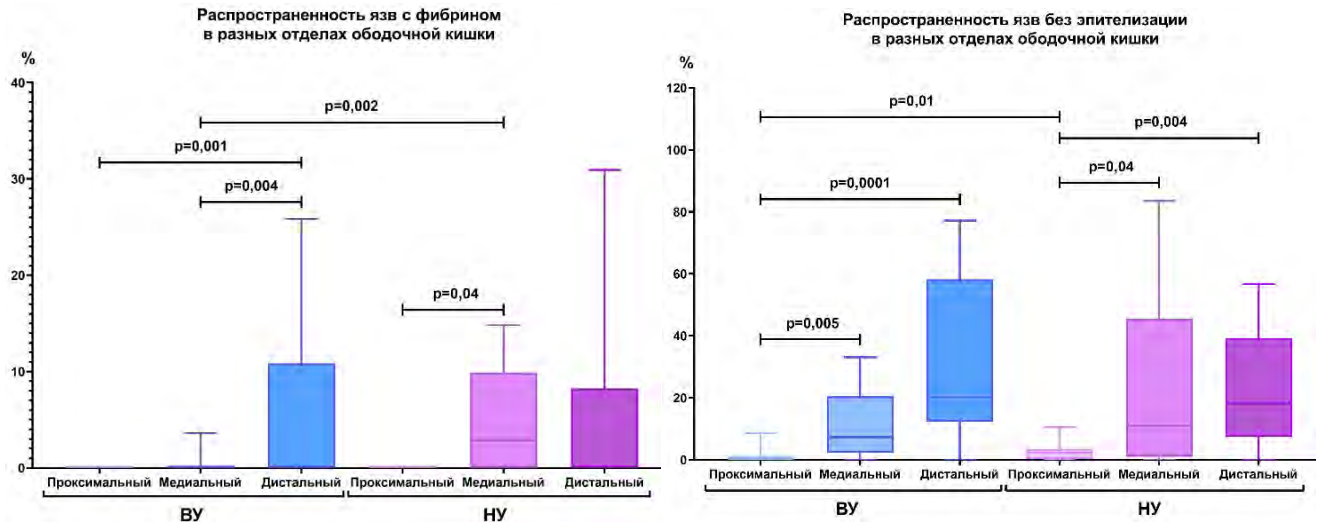


Рис. 3.3.12. Относительная распространенность язв (% к длине ободочной кишки) с фибрином и без эпителизации в проксимальном, медиальном и дистальном отделах ободочной кишки при остром колите у ВУ (n=20) и НУ (n=12) мышей, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

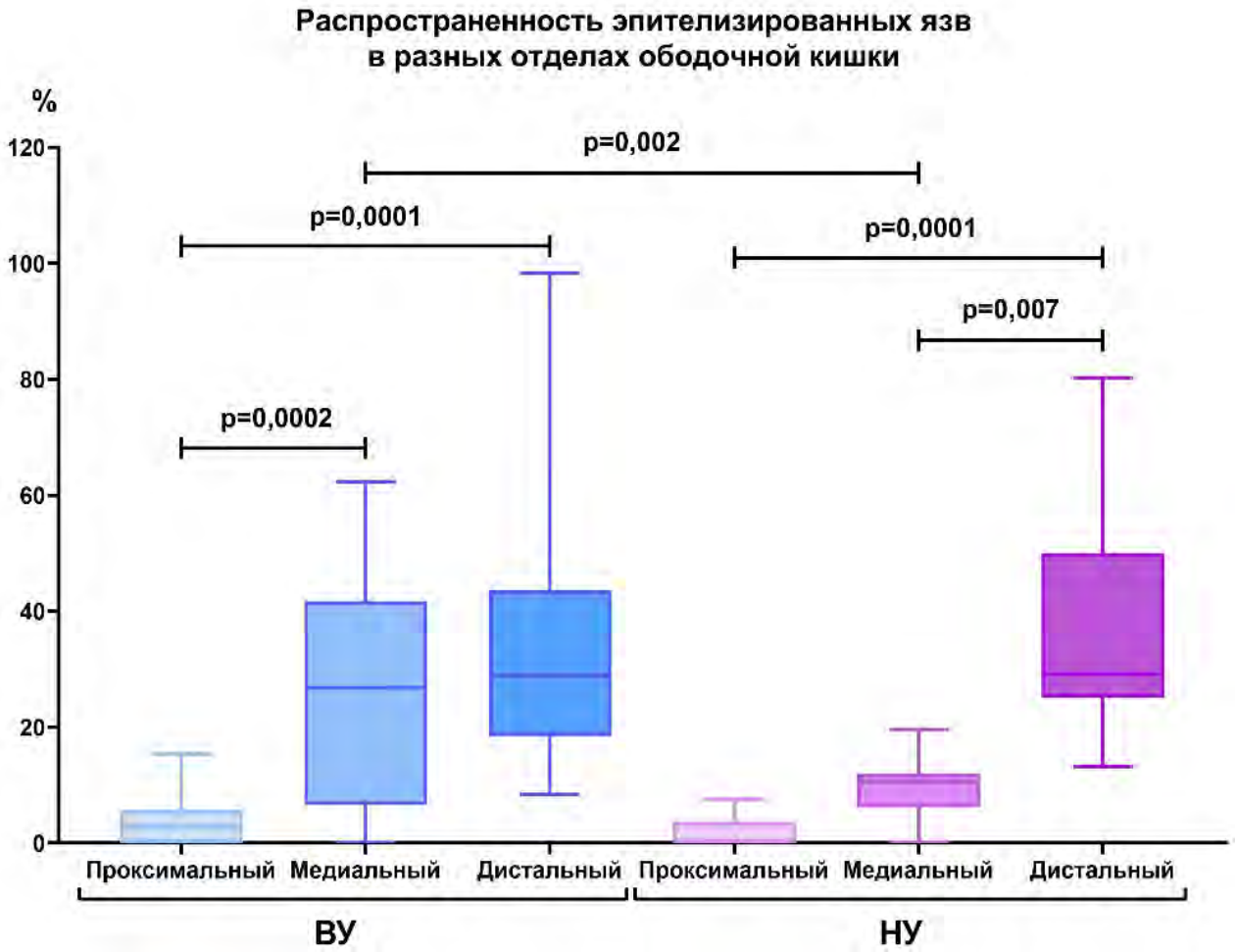


Рис. 3.3.13. Относительная распространенность язв (% к длине ободочной кишки) с эпителизацией в проксимальном, медиальном и дистальном отделах ободочной кишки при остром колите у ВУ (n=20) и НУ (n=12) мышей, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

Таблица 3.3.7

Относительная распространенность всех типов язв (% к длине ободочной кишки) в проксимальном, медиальном и дистальном отделах ободочной кишки при остром колите у ВУ (n=20) и НУ (n=12) мышей, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

Отдел ободочной кишки	**Группы наблюдения**		**p (ВУ-НУ)**
	ВУ (n=20)	**НУ (n=12)**	
Дистальный	87,5 (59,8-99,6)[1]	66,1 (44,3-93,4)[2]	0,32
Медиальный	33,4 (13,4-62,4)[3]	24,2 (13,2-68,3)[4]	0,98
Проксимальный	2,5 (0,0-5,7)[5]	3,1 (0,4-7,1)[6]	0,65
p	**0,02**[1-3]; **0,0001**[1-5]; **0,0009**[3-5]	0,18[2-4]; **0,0001**[2-6]; **0,01**[4-6]	

3.3.4. Морфологическое и морфометрическое исследование тимуса и селезенки при остром язвенном колите у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6

При морфологическом исследовании тимуса у ВУ и НУ мышей контрольных групп в дольках преобладало корковое вещество, плотно заселенное лимфоцитами (рис. 3.3.14, А, Б, черные стрелки). Границы между корковым и мозговым веществом были четкими (рис. 3.3.14, А, Б, синие стрелки).

При остром колите у ВУ мышей в дольках тимуса наблюдались очагово-нечеткие границы между корковым и мозговым веществом (рис. 3.3.14, В, синяя стрелка), а у НУ животных – акцидентальная инволюция, характеризующаяся сужением коркового вещества, наличием тимических телец с накоплением кератогиалина и в виде кистоподобных полостей (рис. 3.3.14, Г, зеленые стрелки).

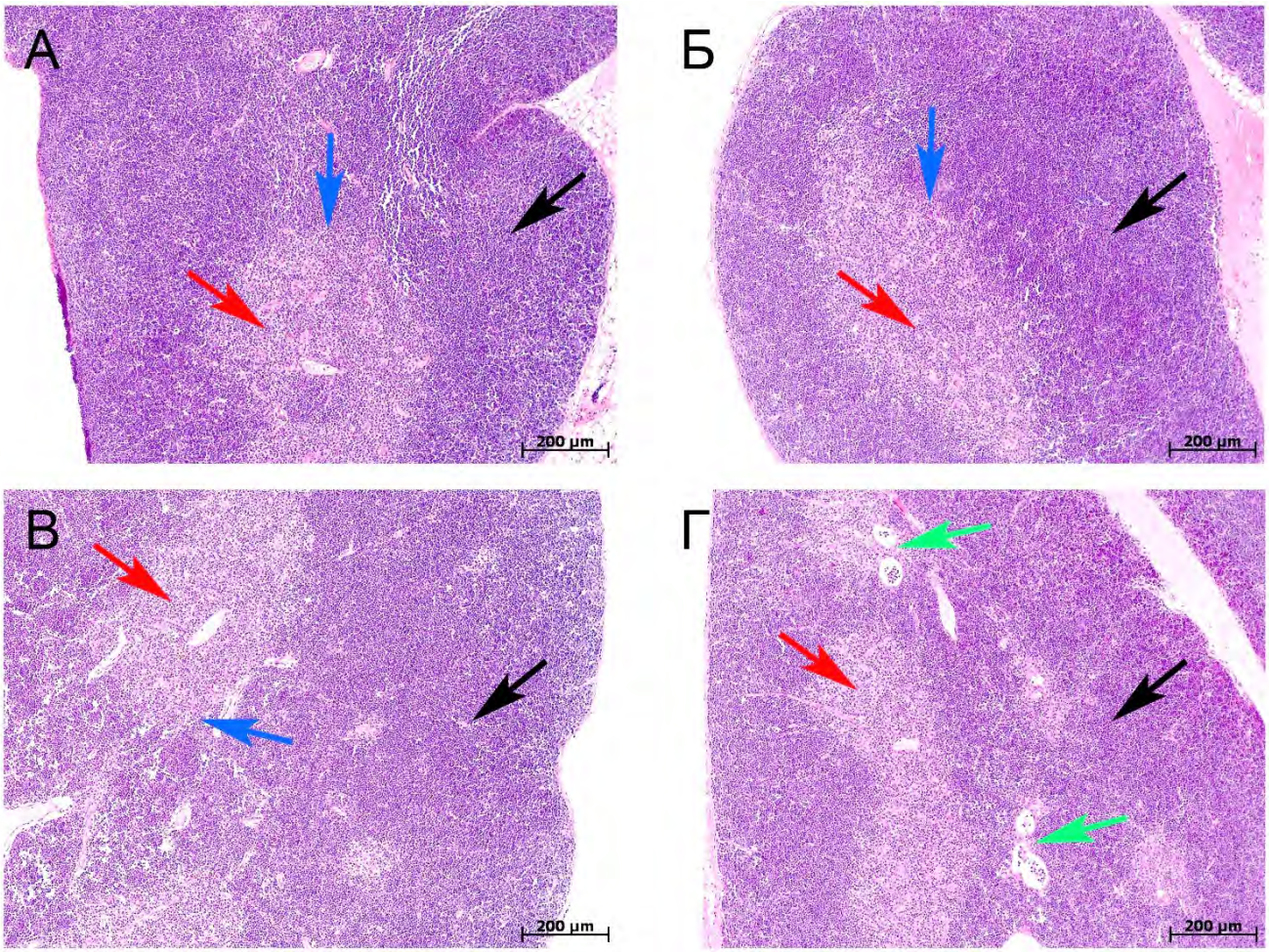


Рис. 3.3.14. Морфологическая характеристика долек тимуса у ВУ и НУ мышей контрольных групп (А, Б) и с острым колитом (В, Г). А, В – ВУ; Б, Г – НУ. А, Б – корковое вещество долек (черные стрелки) плотно заселено лимфоцитами, мозговое вещество (красные стрелки), границы между корковым и мозговым веществом четкие (синие стрелки); В – корковое вещество (черная стрелка), мозговое вещество (красная стрелка), границы коркового и мозгового вещества очагово-нечеткие (синяя стрелка); Г – острая акцидентальная инволюция, сужение коркового вещества (черная стрелка), мозговое вещество (красная стрелка), тимические тельца в виде кистоподобных полостей в корковом веществе и на границе коркового и мозгового вещества (зеленые стрелки). Окраска гематоксилином и эозином

Как у ВУ, так и у НУ мышей с острым колитом выявлены тимические тельца разных типов (рис. 3.3.15, А-Г).

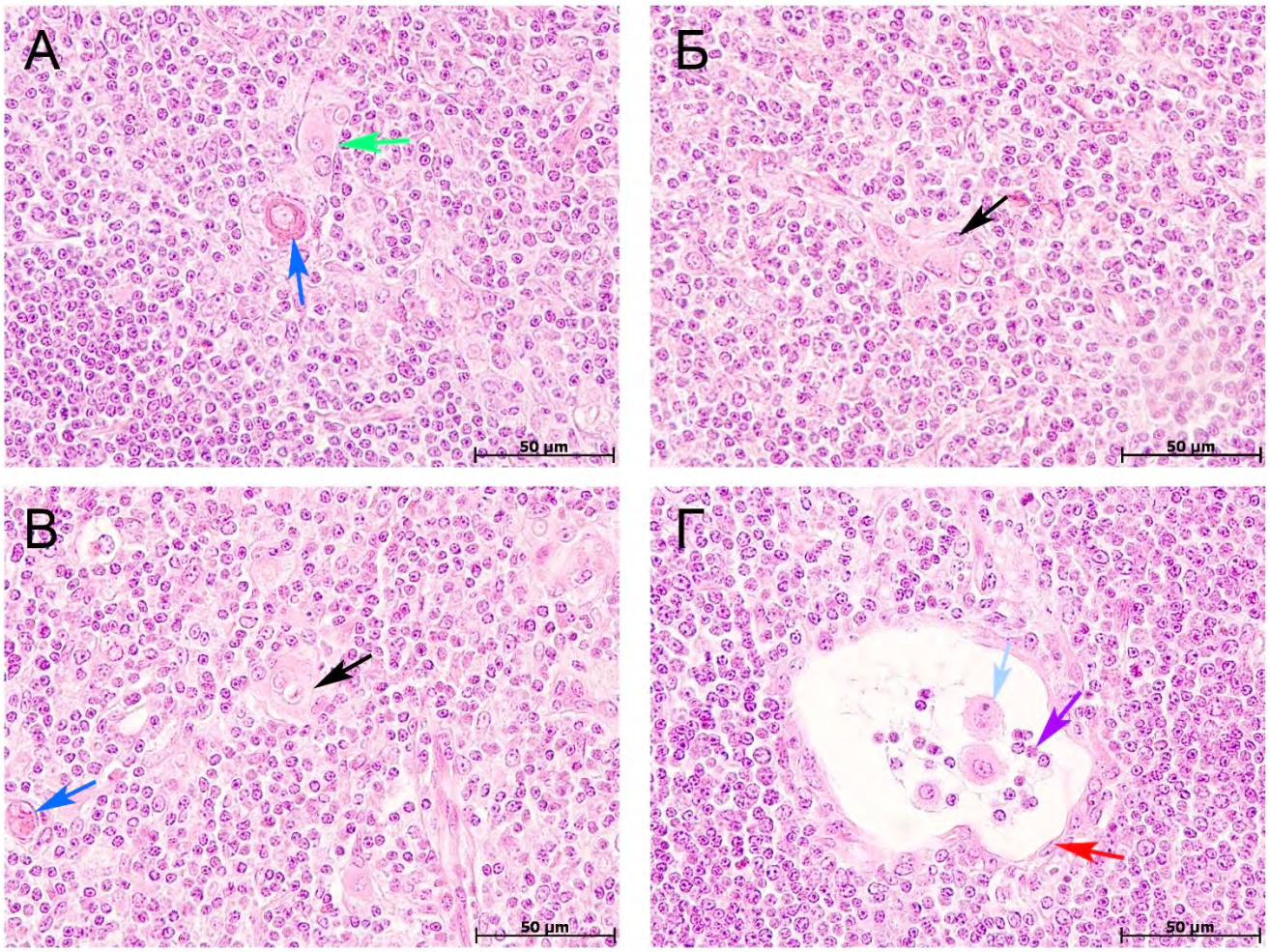


Рис. 3.3.15. Морфологическая характеристика тимических телец у ВУ (А, В) и НУ (Б, Г) мышей с острым колитом. А – в мозговом веществе тимические тельца, состоящие из 3-5 эпителиальных клеток (зеленая стрелка) и с кератогиалином (синяя стрелка); Б – в мозговом веществе тимическое тельце, состоящее из 7 эпителиальных клеток (черная стрелка); В – в мозговом веществе тимические тельца, состоящие из 5 эпителиальных клеток (черная стрелка) и с кератогиалином (синяя стрелка); Г – тимическое тельце в виде кистоподобной полости, выстланной уплощенными эпителиальными клетками (красная стрелка), в просвете которой определяются макрофаги (голубая стрелка) и лимфоциты (фиолетовая стрелка). Окраска гематоксилином и эозином

По данным морфометрического исследования при остром колите в тимусе только у НУ мышей наблюдалось статистически значимое сужение коркового вещества долек. При анализе тимических телец только у НУ животных выявлено уменьшение числа телец, состоящих из 3-5 клеток, и увеличение количества телец, состоящих из 5 и более клеток. При этом у ВУ мышей опытной группы статистически значимых различий исследуемых показателей по сравнению с животными контрольной группы и НУ не обнаружено (табл. 3.3.8).

Таблица 3.3.8

Морфометрические показатели объемной доли структурно-функциональных зон долек тимуса и относительного количества тимических телец у ВУ и НУ мышей контрольных групп и с острым колитом, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Группы наблюдения / **Параметры**		**Контроль**		**Острый колит**		**p**
		ВУ[1] (n=6)	**НУ[2] (n=6)**	**ВУ[3] (n=20)**	**НУ[4] (n=12)**	
Корковое вещество, %		69,6 (65,0-72,0)	68,5 (62,4-74,5)	65,8 (60,3-69,8)	59,9 (58,3-62,2)	$0,89^{1-2}$; $0,26^{1-3}$ **$0,04^{2-4}$**; $0,09^{3-4}$
Мозговое вещество, %		32,5 (29,4-35,2)	31,5 (25,5-37,6)	34,2 (30,2-39,7)	40,1 (37,9-41,7)	$0,89^{1-2}$; $0,61^{1-3}$ **$0,04^{2-4}$**; $0,09^{3-4}$
Отношение коркового вещества к мозговому, усл. ед.		2,5 (2,0-2,9)	2,4 (1,9-3,1)	2,1 (1,6- 2,4)	1,7 (1,5-1,9)	$0,89^{1-2}$; $0,26^{1-3}$ **$0,03^{2-4}$**; $0,18^{3-4}$
% от общего количества тимических телец	из 3-5 эпителиальных клеток	47,2 (42,6-49,8)	54,2 (45,8-59,6)	37,2 (29,3-46,3)	28,2 (21,5-34,7)	$0,23^{1-2}$; $0,19^{1-3}$ **$0,01^{2-4}$**; $0,15^{3-4}$
	из 5 и более эпителиальных клеток	11,8 (9,6-15,6)	15,5 (13,6-20,8)	19,9 (13,0-29,1)	23,0 (22,5-29,3)	$0,20^{1-2}$; $0,20^{1-3}$ **$0,01^{2-4}$**; $0,49^{3-4}$
	с кератогиалином	36,9 (31,6-40,6)	28,8 (25,9-32,3)	34,2 (25,7-38,4)	37,9 (25,8-47,6)	$0,06^{1-2}$; $0,48^{1-3}$ $0,35^{2-4}$; $0,59^{3-4}$
	в виде кистоподобных полостей	0,0 (0,0-9,1)	0,0 (0,0-5,4)	6,2 (3,8-13,9)	6,0 (0,0-16,8)	$0,71^{1-2}$; $0,52^{1-3}$ $0,24^{2-4}$; $0,94^{3-4}$

При морфологическом исследовании в селезенке (рис. 3.3.16) у ВУ и НУ мышей контрольных групп в красной пульпе выявлены рассеянные форменные элементы крови. ПАЛМ-зоны (рис. 3.3.16, А, зеленая стрелка) и маргинальные зоны лимфоидных узелков были выражены, в некоторых лимфоидных узелках обнаружены небольшие светлые центры (рис. 3.3.16, А, Б, синие стрелки).

При остром колите белая пульпа была представлена хорошо выраженной ПАЛМ-зоной (рис. 3.3.16, Г, зеленая стрелка) и лимфоидными узелками со светлыми центрами (рис. 3.3.16, В, Г, синие стрелки). В красной пульпе выявлены рассеянные форменные элементы крови.

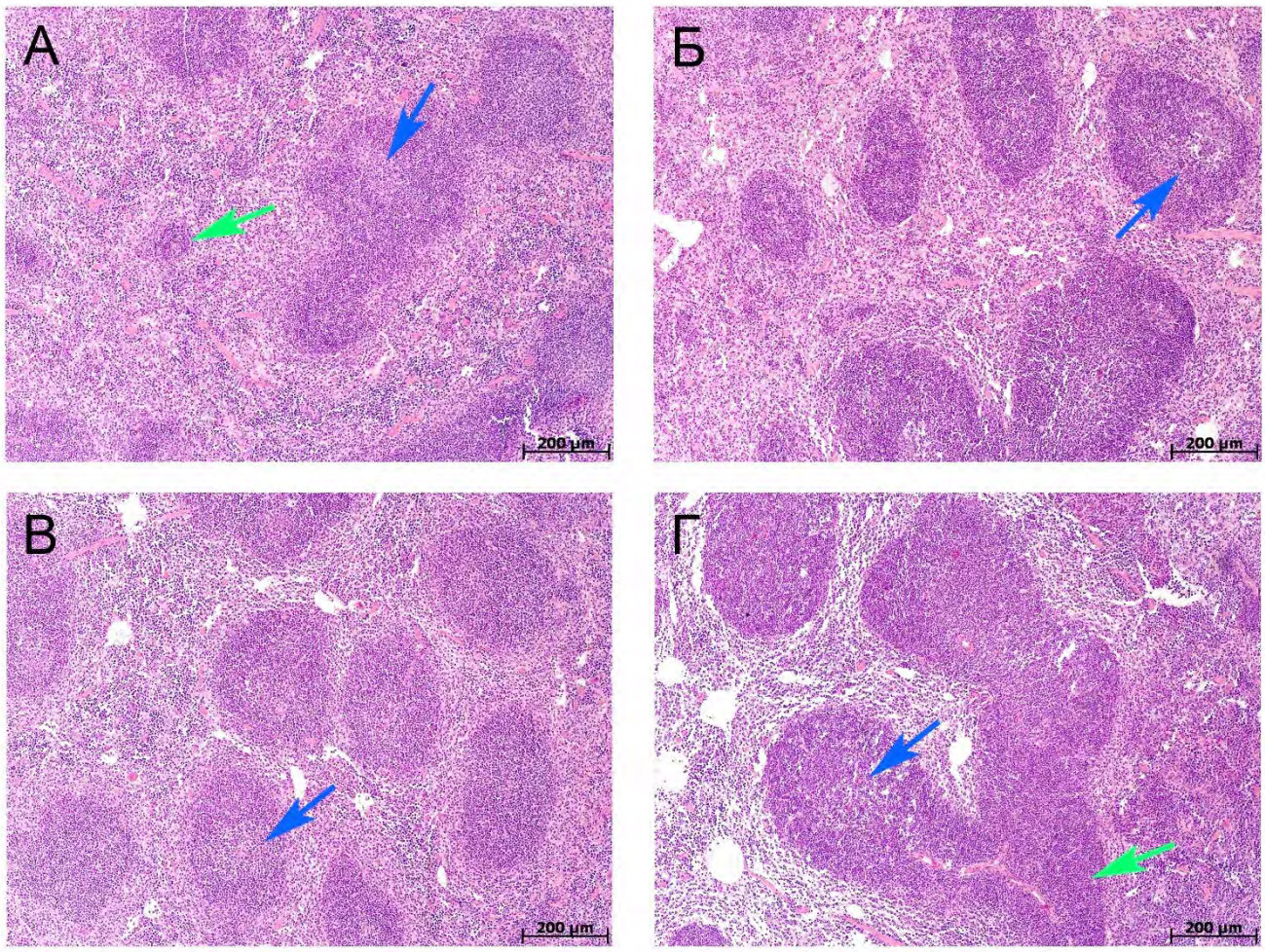


Рис. 3.3.16. Морфологическая характеристика селезенки у ВУ и НУ мышей контрольных групп (А, Б) и с острым колитом (В, Г). А, В – ВУ; Б, Г – НУ. А, Б – в лимфоидных узелках небольшие светлые центры (синие стрелки), ПАЛМ-зоны (зеленая стрелка); В – в лимфоидных узелках светлые центры (синяя стрелка); Г – в лимфоидных узелках светлые центры (синяя стрелка), выраженные ПАЛМ-зоны (зеленая стрелка). Окраска гематоксилином и эозином

По данным морфометрического исследования селезенки (табл. 3.3.9 Приложения 3) объемная доля светлых центров лимфоидных узелков была выше у НУ мышей контрольной группы по сравнению с ВУ. При остром колите по сравнению с ВУ мышами у НУ животных объемная доля ПАЛМ-зон была выше, а объемная доля белой пульпы и лимфоидных узелков ниже (табл. 3.3.9 Приложения 3). Отношение объемной доли белой пульпы к красной при остром колите у НУ животных было ниже по сравнению с ВУ. Объемная доля маргинальных зон лимфоидных узелков снижалась у ВУ мышей с острым колитом по сравнению с животными контрольной группы, а у НУ – не изменялась. Расширение светлых центров лимфоидных узелков наблюдалось как у ВУ, так и у НУ животных при остром колите по сравнению с мышами контрольных групп (табл. 3.3.9 Приложения 3, рис. 3.3.17).

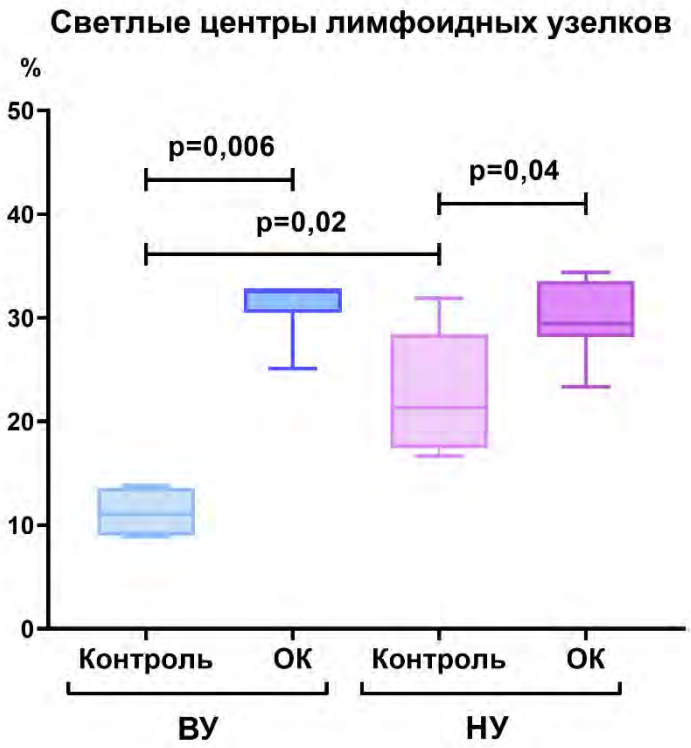


Рис. 3.3.17. Объемная доля светлых центров лимфоидных узелков селезенки у ВУ и НУ мышей контрольных групп и с острым колитом (ОК), Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

3.3.5. Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови при остром язвенном колите у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6

По данным проточной цитофлуориметрии в контрольной группе НУ мышей было выше абсолютное число В-лимфоцитов и Т-регуляторных клеток в периферической крови по сравнению с ВУ (табл. 3.3.10 Приложения 3, рис. 3.3.18). При остром колите изменения субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови были более выражены у НУ мышей: у них по сравнению с контрольной группой снижалось абсолютное число Т-лимфоцитов, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, Т-регуляторных клеток, абсолютное и относительное число В-лимфоцитов, в то время как у ВУ животных статистически значимых различий не выявлено. При остром колите по сравнению с ВУ у НУ мышей было ниже относительное количество В-лимфоцитов (табл. 3.3.10 Приложения 3).

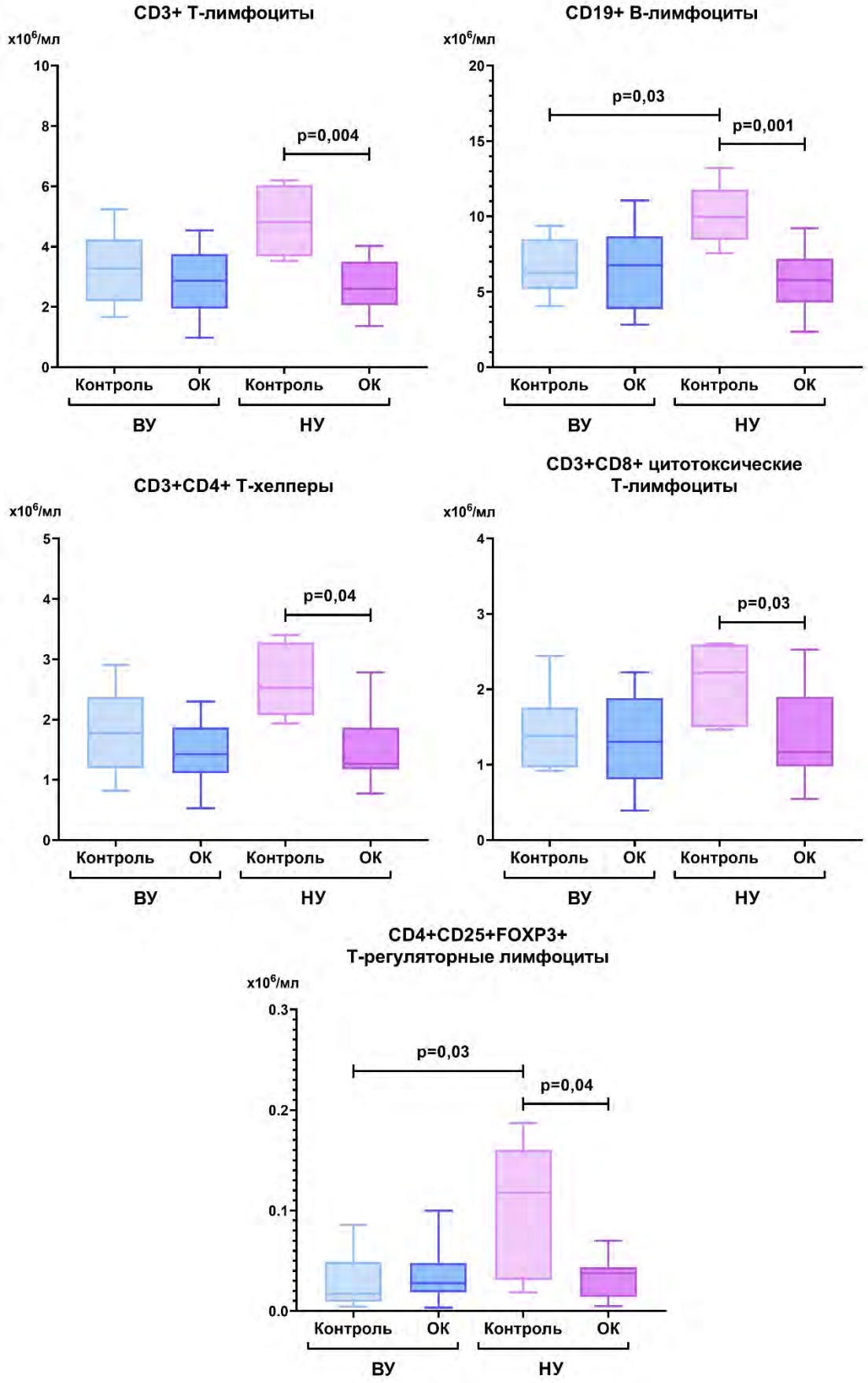


Рис. 3.3.18. Абсолютное число Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов и Т-регуляторных лимфоцитов в периферической крови у ВУ и НУ мышей контрольных групп и с острым колитом (ОК), Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Заключение и обсуждение к 3.3

Таким образом, выявлены различия в течении ДСН-индуцированного острого ЯК у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6 (рис. 3.3.19). Показано, что НУ мыши характеризуются более выраженными клиническими проявлениями острого колита, большей распространенностью язв с фибрином в медиальном отделе ободочной кишки и язв без эпителизации в проксимальном. При этом распространенность эпителизированных язв в медиальном отделе ободочной кишки была выше у ВУ мышей по сравнению с НУ.

При остром колите у НУ животных наблюдалось снижение объемной доли коркового вещества долек тимуса, уменьшение числа тимических телец, состоящих из 3-5 клеток и увеличение количества телец, состоящих из 5 и более клеток. Как у ВУ, так и у НУ мышей при остром колите обнаружено расширение светлых центров лимфоидных узелков селезенки. При остром колите в периферической крови только у НУ мышей выявлено снижение основных субпопуляций лимфоцитов (Т-лимфоцитов, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, Т-регуляторных лимфоцитов и В-лимфоцитов) по сравнению с контрольной группой, в то время как у ВУ животных изменений не наблюдалось.

Для исследования особенностей инициации и прогрессии опухолей на фоне хронического воспаления была выбрана модель колит-ассоциированного КРР. Известно, что колит-ассоциированный КРР развивается в результате дисплазии эпителия на фоне воспаления, обусловленного ЯК (Zhang et al., 2023a). В 2023 г. распространенность ЯК в мире составила 5 млн случаев и показатели заболеваемости неуклонно растут (Le Berre et al., 2023). Для лучшего понимания течения ЯК и разработки новых терапевтических стратегий было предложено множество экспериментальных моделей (Kolios, 2016; Katsandegwaza et al., 2022). Клинические проявления и морфологические изменения в ободочной кишке при ЯК имеют индивидуальную вариабельность, отличаются у мышей разных линий и зависят от пола (Абдулаева и соавт., 2013; Гао и соавт., 2015; Mähler et al., 1998; Melgar et al., 2005). В частности, более чувствительными к развитию колита являются мыши линии C57Bl/6, характеризующиеся Th1-типом иммунного ответа по сравнению с животными линии BALB/c, для которых характерен Th2-тип (Золотова и Макарова, 2020; Perše и Cerar, 2012; Mukhopadhyay et al., 2022). Одним из возможных механизмов, обусловливающих индивидуальную вариабельность течения острого и хронического колита, может быть устойчивость к гипоксии, так как воспаление сопровождается кислородной недостаточностью и активацией HIF-1α и NF-κB, что влияет на тяжесть течения ЯК (Postovalova et al., 2020; Dvornikova et al., 2023; Hou et al., 2024).

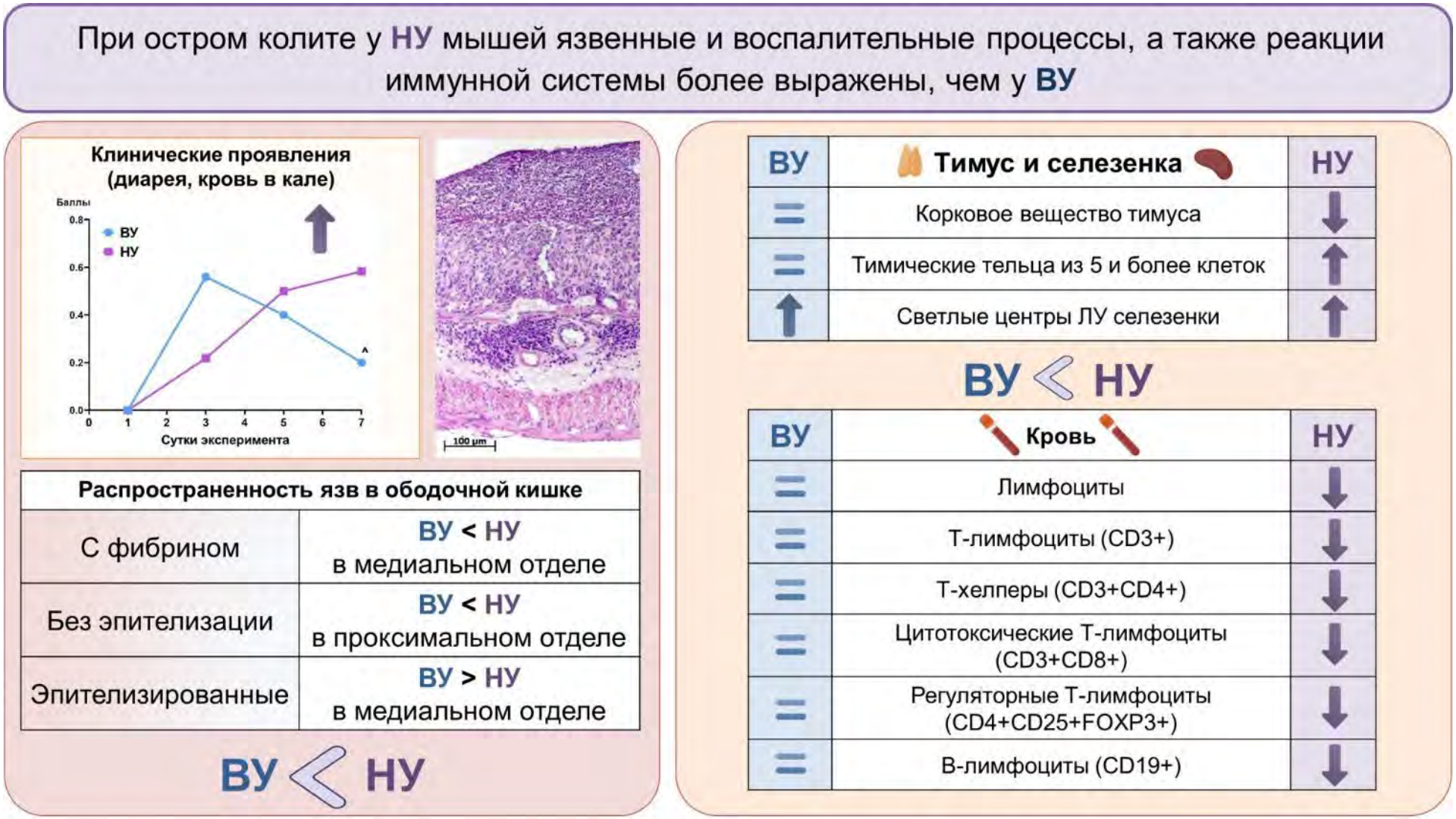


Рис. 3.3.19. Суммарные результаты исследования язвенного и воспалительного процессов в ободочной кишке и морфофункциональных особенностей иммунной системы при остром колите у ВУ и НУ мышей. ЛУ – лимфоидные узелки, стрелки – изменения по сравнению с контрольной группой, < и > – различия между ВУ и НУ

С учетом различий уровня экспрессии *Hif1a* и содержания белка HIF-1α у ВУ и НУ животных (Kirova et al., 2013; Dzhalilova et al., 2019a), очевидно, что острый и хронический колит у этих животных протекает по-разному и эти данные следует учитывать при разработке подходов к таргетной терапии. Однако особенности течения острого и хронического ЯК в зависимости от исходной устойчивости организма к недостатку кислорода не изучены. Поэтому мы провели исследование особенностей течения острого и хронического колита у ВУ и НУ мышей. Поскольку модель острого и хронического колита хорошо охарактеризована и воспроизводима на мышах разных линий, а более чувствительной к развитию колита считается линия C57Bl/6 (Золотова и Макарова, 2020; Perše и Cerar, 2012; Mukhopadhyay et al., 2022), эксперименты были проведены на мышах этой линии.

Полученные нами данные о клинических проявлениях острого колита согласуются с литературными (Золотова и Макарова, 2020; Хочанский и соавт., 2020; Perše и Cerar, 2012). По данным литературы острый ДСН-индуцированный колит у экспериментальных животных характеризуется значительным снижением массы тела, диареей, иногда с примесью крови, укорочением ободочной кишки, появлением в ней язв, выраженной воспалительной инфильтрацией слизистой оболочки, снижением числа бокаловидных клеток и крипт-абсцессами (Золотова и Макарова, 2020; Хочанский и соавт., 2020). Длина ободочной кишки является одним из показателей тяжести течения ЯК и ВЗК (Ahn et al., 2020; Koyama et al., 2022; Wang et al., 2023a). По данным Д.Н. Хочанского (2017) у мышей C57Bl/6 при остром колите, индуцированном ДСН, показатели длины ободочной кишки уменьшаются на 40%. Уменьшение длины ободочной кишки при остром колите происходит, по-видимому, за счет сокращения гладкомышечных клеток, которое вызвано воспалительными медиаторами, а также структурно-функциональными нарушениями энтеральной нервной системы (Хочанский и соавт., 2020; Ahn et al., 2020; Koyama et al., 2022; Wang et al., 2023a).

Б*о*льшая распространенность язв с фибрином у НУ мышей свидетельствует о более тяжелом течении у них острого колита по сравнению с ВУ. Б*о*льшая распространенность язв с эпителизацией у ВУ мышей свидетельствует о более выраженных репаративных процессах у них и согласуется с данными M.A. Diatroptova и соавт. (2023), которыми показано, что у ВУ крыс Вистар выше пролиферативная активность клеток грануляционной ткани в полнослойной кожной ране и репаративные процессы более выражены.

Таким образом, воспроизведенная как у ВУ, так и у НУ мышей модель острого колита по клиническим проявлениям и морфологической характеристике соответствует представленным в литературе сведениям, характеризующим острый ДСН-индуцированный колит. При этом нами показано, что при остром колите, индуцированном потреблением 1,5%-го раствора ДСН, по сравнению с ВУ животными НУ самцы мышей линии C57Bl/6 характеризовались более

выраженными клиническими проявлениями, большей тяжестью язвенно-воспалительного процесса в ободочной кишке (Джалилова и соавт., 2018а).

Воспаление сопровождается гипоксией, которая влияет на тяжесть течения ЯК (Hou et al., 2024). Показано, что активация HIF-1α и NF-κB наблюдается при различных воспалительных заболеваниях, в частности, ЯК (Dvornikova et al., 2023; Hou et al., 2024). Несмотря на провоспалительную функцию HIF в развитии системного воспаления, при остром колите, индуцированном 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислотой и оксазолоном, дефицит HIF-1α в эпителиальных клетках приводил к высокой смертности мышей, а у выживших животных – к более тяжелым клиническим проявлениям, то есть при локальных воспалительных заболеваниях HIF-1α играет, напротив, противовоспалительную роль (Karhausen et al., 2004). Изоформы HIF регулируют множество барьерно-протективных генов, контролирующих продукцию таких молекул, как муцины и β-дефензины, уменьшают апоптоз эпителиальных клеток (Robinson et al., 2008; Kim et al., 2020). При этом нокаут гена *Hif1a* в миелоидных клетках препятствует развитию колита, вызванного ДСН (Bäcker et al., 2017). Это свидетельствует о том, что активация HIF-1α может оказывать антагонистическое действие на различные клетки в условиях воспаления.

На моделях острого ЯК, индуцированного ДСН, у мышей показано, что ингибиторы пролилгидроксилазы PHD2, которая способствует разрушению HIF-1α, уменьшают выраженность воспаления (Cummins et al., 2008; Robinson et al., 2008). Активация HIF-1α путем ингибирования PHD в эпителиальных клетках может использоваться как терапевтическая стратегия в борьбе с ВЗК (Xue et al., 2014). Препараты для ингибирования PHD проходят клинические испытания III и IV фаз для лечения анемии, связанной с хронической болезнью почек, и в ряде стран уже одобрены для применения (Haase, 2021; Zheng et al., 2022). Поэтому в будущем возможность применения ингибиторов PHD для лечения ВЗК вполне реальна. Однако системное введение ингибиторов увеличивает вероятность нежелательных побочных эффектов, таких как повышение эритропоэза, у пациентов с ВЗК (Новиков и Левченкова, 2024). Поэтому разрабатываются подходы таргетной доставки, при которых лекарство высвобождается локально в толстой кишке, при этом системное воздействие минимально (Tambuwala et al., 2015; Brown и Taylor, 2018). С учетом различий уровня экспрессии *Hif1a* и содержания белка HIF-1α у ВУ и НУ животных (Kirova et al., 2013; Dzhalilova et al., 2019a), и выявленных нами особенностей тяжести течения острого ЯК у мышей с разной устойчивостью к гипоксии, индивидуальную чувствительность к недостатку кислорода следует учитывать при разработке подходов к таргетной терапии ЯК. При этом необходим поиск способов определения устойчивости к гипоксии у людей без гипоксического воздействия на организм.

По данным литературы при остром катарально-язвенном колите воспалительный процесс в ободочной кишке сочетается с системными проявлениями воспалительного ответа, реактивными

изменениями в центральных и периферических органах иммунной системы (Kim et al., 2012; Postovalova et al., 2019). Показано, что при остром колите в зависимости от его тяжести у мышей развиваются иммунодефицитные состояния разной выраженности (Постовалова, 2018), однако индивидуальная устойчивость животных к гипоксии автором не учитывалась. Вторичный иммунодефицит – это приобретенная недостаточность иммунного ответа, развивающаяся при воздействии различных факторов и характеризующаяся выраженным снижением качественных и/или количественных показателей специфической и неспецифической иммунорезистентности (Herman и Tuttle, 2024). Единой классификации вторичных иммунодефицитов не разработано (Павленко, 2017). Индуцированный вторичный иммунодефицит, как правило, является транзиторным (Хаитов и Пинегин, 1999), т.е. при устранении вызвавшей его причины наступает полное восстановление функционирования иммунной системы. При развитии хронического, рецидивирующего инфекционно-воспалительного процесса вторичный иммунодефицит приобретает форму компенсированного.

По нашим данным при остром колите только у НУ животных развивался транзиторный вторичный иммунодефицит: в тимусе выявлена острая умеренная акцидентальная инволюция – сужение коркового вещества долек, уменьшение количества тимических телец из 3-5 клеток и увеличение количества телец, состоящих из 5 и более клеток. Увеличение числа тимических телец, состоящих из большего количества эпителиальных клеток, у НУ мышей косвенно указывает на более выраженную функциональную активность эпителиальных клеток мозгового вещества тимуса, а также на гибель тимоцитов. Считается, что количество и размеры тимических телец, с одной стороны, служат показателем их высокой секреторной активности, а с другой – гибели тимоцитов (Sharma и Moroni, 2021). Ранее показано, что при экспериментальном остром ЯК, индуцированном ДСН, у половозрелых мышей C57Bl/6 на 7-е сут наблюдалось снижение массы тимуса и уменьшение числа тимоцитов в нем, при этом у мышей BALB/c инволюции тимуса выявлено не было (Sasaki et al., 2008). По данным Е.А. Постоваловой и соавт. (2019) при остром катарально-язвенном колите у самцов мышей C57Bl/6 в тимусе наблюдается умеренная акцидентальная инволюция – опустошение и уменьшение объемной доли коркового вещества долек, гиперплазия тимических телец, увеличение среди них телец с отложениями кератогиалина и появление телец в виде кистоподобных полостей. Однако в данных работах не учитывалась индивидуальная устойчивость к гипоксии. При остром ЯК нами не наблюдалось изменений функциональных зон тимуса у ВУ мышей, что важно учитывать для оценки индивидуальных реакций животных при ВЗК.

При остром колите как у ВУ, так и у НУ мышей наблюдалось расширение светлых центров лимфоидных узелков селезенки. Это свидетельствует о повышении антигенной стимуляции из-за нарушения эпителиального барьера кишки и транслокации антигенов (Bronte и Pittet, 2013;

Kałużna et al., 2022). Важную роль в развитии воспалительного процесса играет микробиота, которая вследствие увеличения проницаемости слизистой оболочки транслоцируется в стенку кишки, лимфатические узлы и другие органы (Trivedi и Jena, 2012). Увеличение транслокации бактерий связано также с повышением уровня липополисахаридов, являющихся классическими провоспалительными агентами, которые через связывание TLR4 и активацию NF-κB способствуют увеличению продукции провоспалительных цитокинов (Trivedi и Jena, 2012).

Следует отметить, что у НУ животных контрольной группы по сравнению с ВУ была выше объемная доля светлых центров лимфоидных узелков селезенки. Кроме того, по сравнению с ВУ, у НУ животных контрольной группы абсолютное содержание В-лимфоцитов и Т-регуляторных клеток в периферической крови было статистически значимо выше. Регуляторные Т-лимфоциты препятствуют развитию воспаления в слизистой оболочке толстой кишки в норме, ограничивая развитие Т-клеточного ответа на собственные антигены (Jalalvand et al., 2023). Вероятно, высокое число В-лимфоцитов и Т-регуляторных клеток в периферической крови и более широкие светлые центры лимфоидных узелков селезенки у НУ животных контрольной группы по сравнению с ВУ обусловлены сублетальным гипоксическим воздействием в барокамере за один месяц до включения мышей в эксперимент. Такое воздействие может способствовать провоспалительному фенотипу клеток у НУ мышей и согласуется с данными Л.Д. Лукьяновой (2019) о том, что функционально-метаболические различия между ВУ и НУ животными особенно четко выявляются при предъявлении им стресс-нагрузок, и в совокупности все особенности «функционально-метаболического портрета» НУ животных могут быть причиной возникновения таких заболеваний, как диабет, атеросклероз и др. Возможность их развития у НУ животных выражена в гораздо большей степени по сравнению с ВУ, что характеризует НУ как «группу риска» (Лукьянова, 2019). Возможно, что интервал в один месяц после сублетального гипоксического воздействия является недостаточным для нивелирования эффекта этого воздействия и возвращения систем организма к «неактивированному» состоянию. Кроме того, выявленные особенности ВУ и НУ мышей могут быть предсуществующими и определять различия в тяжести течения острого колита. Необходимы неинвазивные способы определения устойчивости к недостатку кислорода без гипоксического воздействия в барокамере.

Патогенез ВЗК, в том числе ЯК, до конца не изучен, однако было показано, что экологические, генетические факторы, иммунные нарушения и изменения состава кишечной микробиоты способствуют его возникновению и развитию, при этом иммунные нарушения играют ключевую роль (de Souza и Fiocchi, 2016; Chen et al., 2024). Наиболее широко распространенная гипотеза заключается в том, что ВЗК, которые характеризуются хроническим воспалением толстой кишки, являются результатом нарушений иммунного ответа при

взаимодействии между организмом и микробиотой, особенно у генетически предрасположенных людей (Imhann et al., 2018). С помощью сравнительного транскриптомного, метаболомного и метагеномного анализа установлено, что иммунный статус организма является одним из основных регуляторных механизмов, определяющих течение ЯК (Mukhopadhyay et al., 2022). Современные данные свидетельствуют о том, что лимфоциты, включающие В-лимфоциты, Т-хелперы, регуляторные Т-лимфоциты и клетки памяти участвуют в иммунитете слизистых оболочек и играют решающую роль в патогенезе ВЗК (Chang, 2020), поэтому их соотношение предлагают использовать в качестве прогностического маркера тяжести течения ВЗК (Chen et al., 2024).

Уменьшение абсолютного количества основных субпопуляций лимфоцитов в крови при остром ЯК у НУ мышей обусловлено нарушениями их дифференцировки, миграцией и гибелью иммунных клеток, и отражает формирование транзиторного вторичного иммунодефицита (Хаитов и Пинегин, 1999; Hall et al., 2011; Tuano et al., 2021; Herman и Tuttle, 2024). Регуляторные Т-лимфоциты оказывают противовоспалительное действие при экспериментальном колите, уменьшение их числа в периферической крови наблюдается при активных формах ВЗК у человека (Saruta et al., 2007; Fonseca-Camarillo и Yamamoto-Furusho, 2015). Выявленное нами снижение количества регуляторных Т-лимфоцитов в периферической крови при остром ЯК согласуется с данными J. Maul и соавт. (2005) и Y. Yokoyama и соавт. (2007), однако оно наблюдалось только у НУ мышей, что отражает более тяжелое течение заболевания у этих животных. Уменьшение количества циркулирующих В-лимфоцитов в крови характерно для пациентов с активными формами ВЗК (Giuffrida et al., 2018). Миграция Т- и В-лимфоцитов в стенку кишки отражает интенсивность воспалительных реакций (Smids et al., 2018; Chen et al., 2024; Fung et al., 2024). У ВУ мышей менее выраженные клинические проявления, большая распространенность эпителизированных язв и отсутствие изменений в тимусе и субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови свидетельствуют о менее тяжелом течении воспалительного процесса и адаптивных изменениях иммунной системы.

Таким образом, нами показано (Джалилова и соавт., 2018а, 2024а), что при остром ЯК по сравнению с ВУ животными НУ мыши характеризовались более выраженными клиническими проявлениями, большей тяжестью язвенно-воспалительного процесса в ободочной кишке. У НУ животных наблюдалось развитие транзиторного вторичного иммунодефицита, который характеризовался острой умеренной акцидентальной инволюцией тимуса, меньшей объемной долей белой пульпы и лимфоидных узелков селезенки по сравнению с ВУ мышами, снижением в периферической крови основных субпопуляций лимфоцитов (Т-лимфоцитов, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, Т-регуляторных лимфоцитов и В-лимфоцитов) по сравнению с

контрольной группой, в то время как у ВУ мышей наблюдалось только расширение светлых центров лимфоидных узелков селезенки.

3.4. Морфологическая характеристика язвенного и воспалительного процессов в ободочной кишке и морфофункциональные особенности иммунной системы при хроническом колите у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6[4]

По результатам определения устойчивости к гипоксии в барокамере по «времени жизни» на «высоте» 10 000 м среди половозрелых мышей C57Bl/6 36% оказались ВУ со «временем жизни» более 10 мин, 26,5% – НУ со «временем жизни» менее 3 мин (рис. 3.4.1).

Рис. 3.4.1. Результаты разделения половозрелых мышей C57Bl/6 в барокамере на критической «высоте» 10 000 м на ВУ, СУ и НУ

---

[4]При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении научных степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования (в скобках приведен импакт-фактор журнала, объем публикации в условных печатных листах/вклад автора в условных печатных листах):

1. **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, Scopus (SJR), Q4 (0,50/0,40)
2. **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, Scopus (SJR), Q4 (0,60/0,50)

3.4.1. Клинические проявления хронического язвенного колита у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6

В течение эксперимента у животных опытных групп после потребления трех циклов 1%-го ДСН наблюдалось снижение двигательной активности – уменьшалась интенсивность передвижения животных в клетке. Кроме того, была выражена болевая поза – лапы поджаты к туловищу, наблюдался перенос тяжести тела на задние лапы, изогнутая спина, выпрямленный хвост (рис. 3.4.2).

Рис. 3.4.2. Внешний вид мышей контрольной группы и с хроническим колитом – болевая поза – лапы поджаты к туловищу, перенос тяжести тела на задние лапы, изогнутая спина, выпрямленный хвост

При клиническом наблюдении за животными с хроническим колитом как у ВУ, так и у НУ мышей выявлено наличие диареи с примесью крови. По результатам полуколичественной оценки на 14-е сут эксперимента проявления хронического колита у НУ мышей были более выраженными ($p=0,0015$) по сравнению с ВУ животными. Максимальные проявления заболевания как у ВУ, так и у НУ мышей наблюдались на 27-е сут исследования, однако только у НУ животных показатели статистически значимо различались по сравнению с началом эксперимента (рис. 3.4.3).

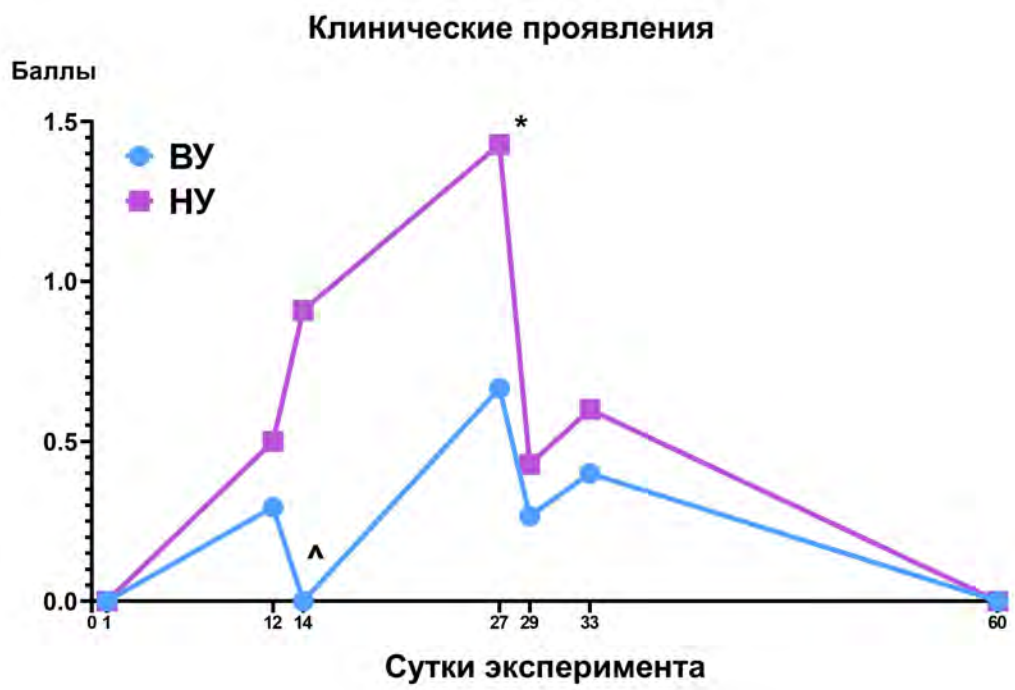


Рис. 3.4.3. Полуколичественная оценка клинических проявлений хронического колита у ВУ и НУ мышей опытных групп. Статистически значимые различия ($p<0,05$): * – по сравнению с началом эксперимента (критерии Краскела-Уоллиса и Данна), ^ – по сравнению с НУ мышами (критерий Манна-Уитни)

В течение эксперимента наблюдалась гибель животных. Гибель ВУ животных составила 16,7% (3 из 18), в то время как НУ – 54,5% (6 из 11), показатели статистически значимо различались (табл. 3.4.1, рис. 3.4.4).

Таблица 3.4.1

Гибель ВУ и НУ мышей в течение хронического колита, p – статистическая значимость различий, точный тест Фишера

Гибель	**ВУ (n=18)**	**НУ (n=11)**	**p**
Выжило	15 (83,3%)	5 (45,5%)	**0,043**
Погибло	3 (16,7%)	6 (54,5%)	

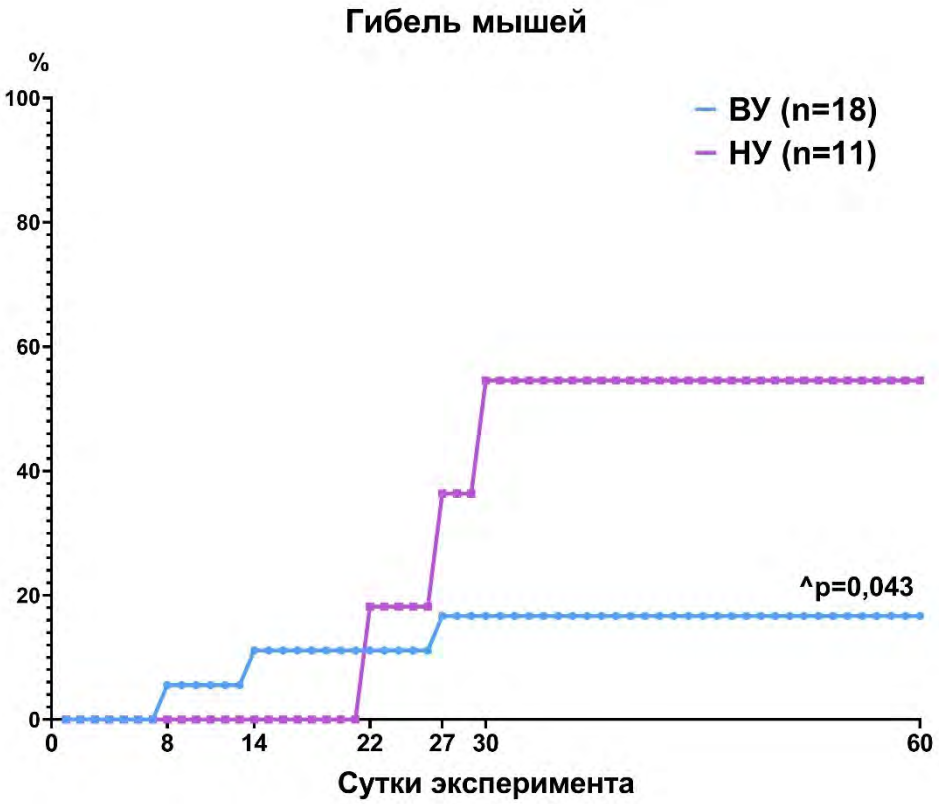


Рис. 3.4.4. Гибель ВУ и НУ мышей в течение хронического колита, ^ – статистически значимые различия по сравнению с НУ мышами, точный тест Фишера

У ВУ мышей статистически значимого снижения массы тела при хроническом колите не наблюдалось, а к 60-м сут эксперимента она увеличивалась по сравнению с 12-ми, 14-ми и 27-ми (табл. 3.4.2 Приложения 4, рис. 3.4.5). Только у НУ животных наблюдалось снижение массы тела на 14-е сут эксперимента, а к 60-м сут показатели нормализовались и были выше по сравнению с 14-ми и 27-ми сут. Масса тела НУ мышей была статистически значимо ниже по сравнению с ВУ на 14-е и 27-е сут эксперимента (табл. 3.4.2 Приложения 4, рис. 3.4.5).

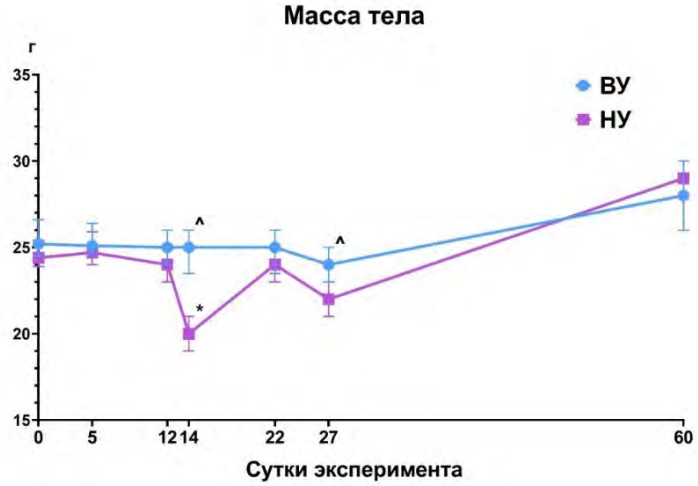


Рис. 3.4.5. Изменение массы тела в разные сроки потребления 1%-го ДСН у ВУ и НУ мышей, Me (25%-75%), * – статистически значимые различия (p<0,05) по сравнению с началом эксперимента (критерии Краскела-Уоллиса и Данна), ^ – по сравнению с НУ мышами (критерий Манна-Уитни)

3.4.2. Показатели длины ободочной кишки при хроническом язвенном колите у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6

Длина ободочной кишки у ВУ и НУ мышей контрольных групп и с хроническим колитом не различалась и не изменялась в течение эксперимента (табл. 3.4.3).

Таблица 3.4.3

Длина ободочной кишки у ВУ и НУ мышей контрольных групп и с хроническим колитом, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Группы наблюдения	**Длина ободочной кишки, см**		**p**
	Контроль	**Хронический колит**	
ВУ	6,1 (5,9-6,3)	5,8 (5,3-6,2)	0,25
НУ	5,9 (5,8-6,2)	5,7 (4,2-6,1)	0,30
p (ВУ-НУ)	0,54	0,54	

3.4.3. Морфологическое и морфометрическое исследование ободочной кишки при хроническом язвенном колите у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6

При морфологическом исследовании ободочной кишки у ВУ и НУ мышей опытных групп наблюдалась картина хронического колита (рис. 3.4.6, 3.4.7, 3.4.8). Выявлялись язвы с эпителизацией, щелевидной или пирамидальной формы. Поверхность язв была выстлана кубическим и призматическим эпителием (рис. 3.4.6, А, Б, рис. 3.4.7, А, Б, рис. 3.4.8, А, Б, зеленые стрелки), дно представлено грануляционной тканью с фибробластами и фиброцитами, в ней определялись клетки воспалительного инфильтрата – лимфоциты и плазмоциты. В краях язв крипты были деформированы (рис. 3.4.7, А, Б, синие стрелки), бокаловидных клеток мало. Как у ВУ, так и у НУ мышей наблюдалась выраженная воспалительная инфильтрация СПСО (рис. 3.4.9, А, Б, черные стрелки). Подслизистая основа инфильтрирована, преимущественно, плазмоцитами и лимфоцитами.

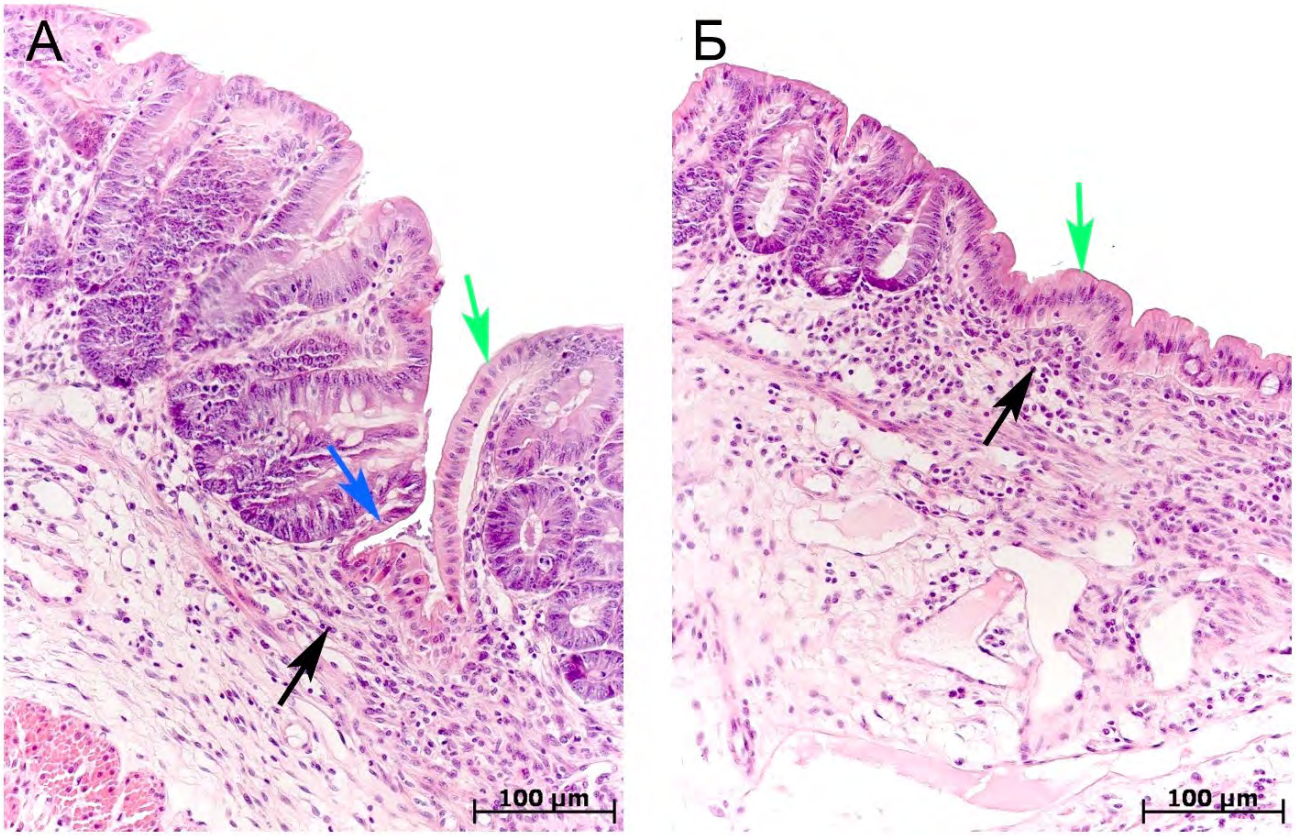


Рис. 3.4.6. Морфологическая характеристика ободочной кишки при хроническом колите у ВУ (А) и НУ (Б) мышей. А – щелевидная язва с эпителизацией (синяя стрелка), ее поверхность выстлана кубическим эпителием (зеленая стрелка), по краям язвы расположены деформированные крипты с регенераторными изменениями, воспалительная инфильтрация СПСО (черная стрелка); Б – эпителизированная язва (зеленая стрелка) и воспалительная инфильтрация СПСО (черная стрелка). Окраска гематоксилином и эозином

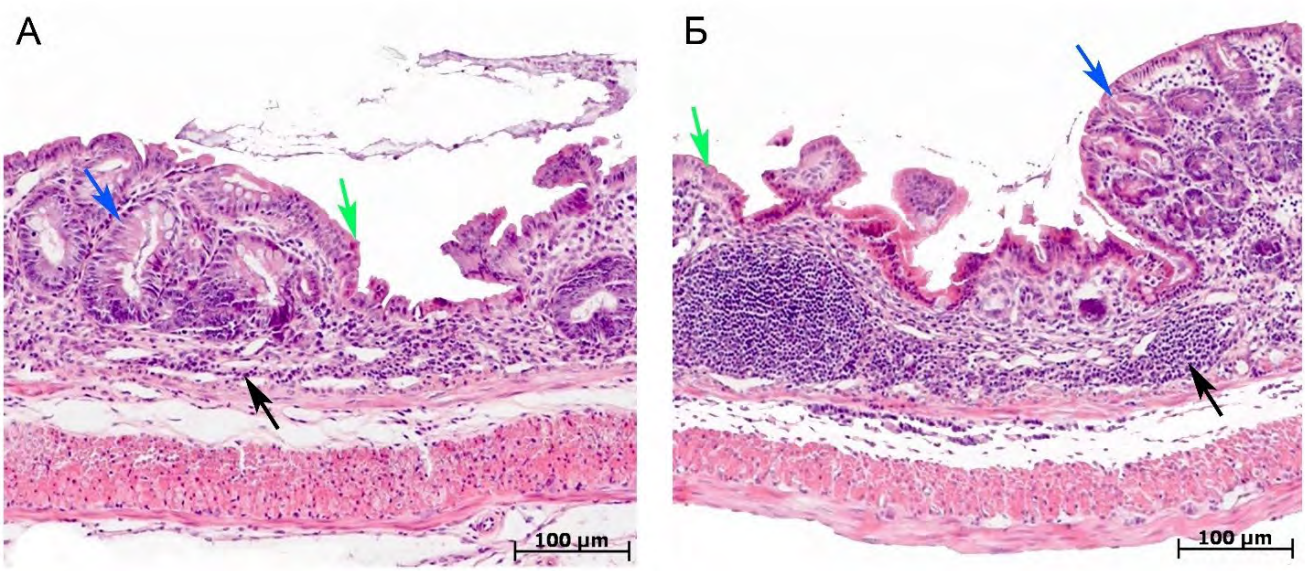


Рис. 3.4.7. Морфологическая характеристика дистального отдела ободочной кишки при хроническом колите у ВУ (А) и НУ (Б) мышей. А, Б – крипты с деформированным просветом (синие стрелки). Участки язв с эпителизацией выстланы однослойным призматическим эпителием, ядра клеток гиперхромные (зеленые стрелки). Выраженная воспалительная инфильтрация в слизистой оболочке (черные стрелки). Окраска гематоксилином и эозином

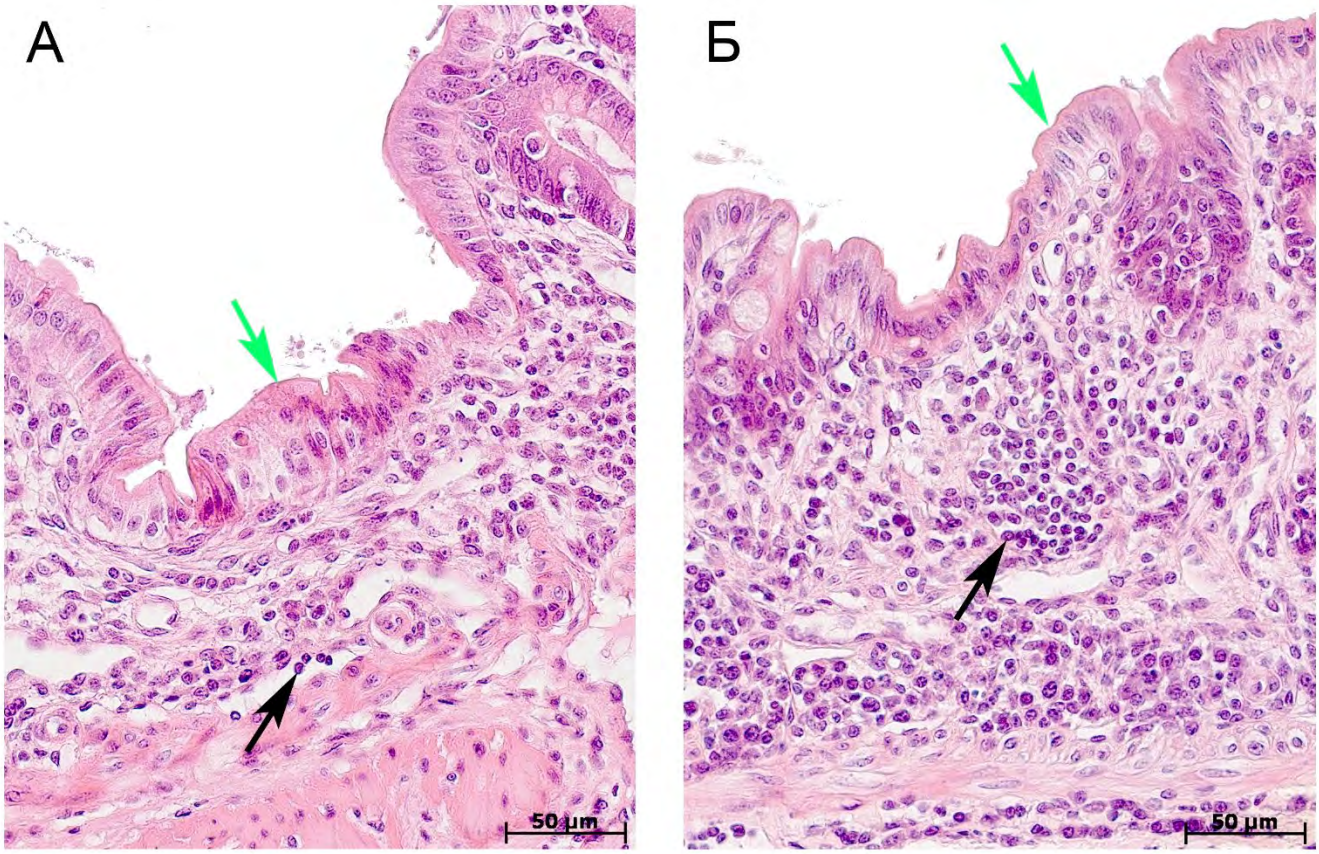


Рис. 3.4.8. Морфологическая характеристика дистального отдела ободочной кишки при хроническом колите у ВУ (А) и НУ (Б) мышей. А, Б – крипты отсутствуют, участки язв с эпителизацией (зеленые стрелки). Выраженная воспалительная инфильтрация в слизистой оболочке (черные стрелки). Окраска гематоксилином и эозином

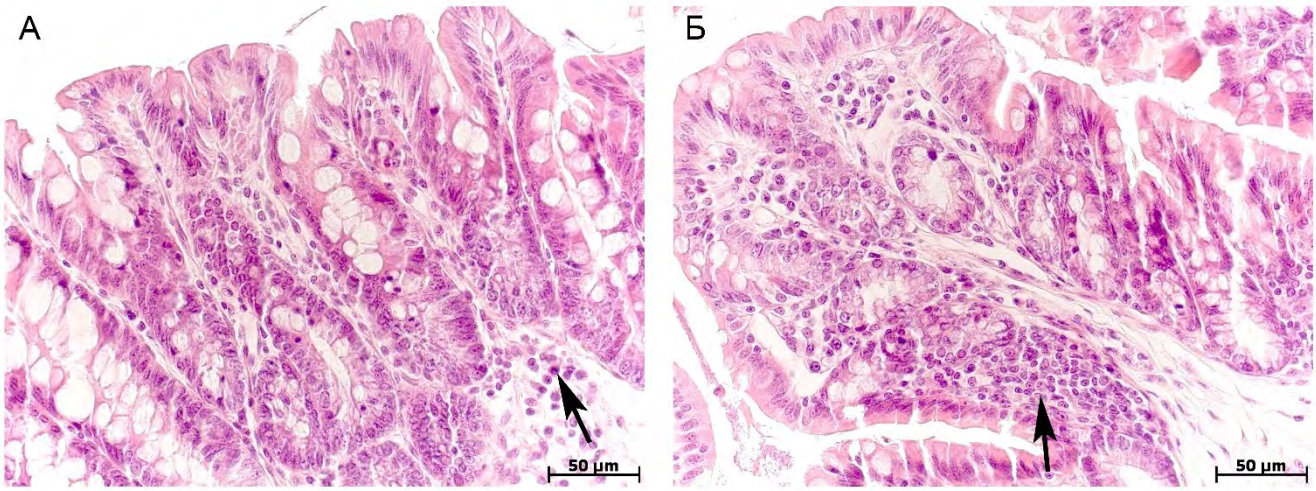


Рис. 3.4.9. Воспалительная инфильтрация СПСО (черные стрелки) в проксимальном отделе ободочной кишки при хроническом колите у ВУ (А) и НУ (Б) мышей. Окраска гематоксилином и эозином

Наряду с зонами, где воспалительные изменения были выраженными, определялись участки без них – с сохраненной эпителиальной выстилкой и слабо выраженной воспалительной инфильтрацией базального отдела СПСО. Крипты расширены, их просветы заполнены слизью

(рис. 3.4.10, А, Б, синие стрелки), лимфатические сосуды расширены (рис. 3.4.10, А, Б, голубые стрелки), в подслизистой основе слабо выраженная воспалительная инфильтрация (рис. 3.4.10, А, Б, черные стрелки). Встречались крипт-абсцессы (рис. 3.4.11, черная стрелка). У нескольких мышей присутствовали участки с очаговой дисплазией эпителия.

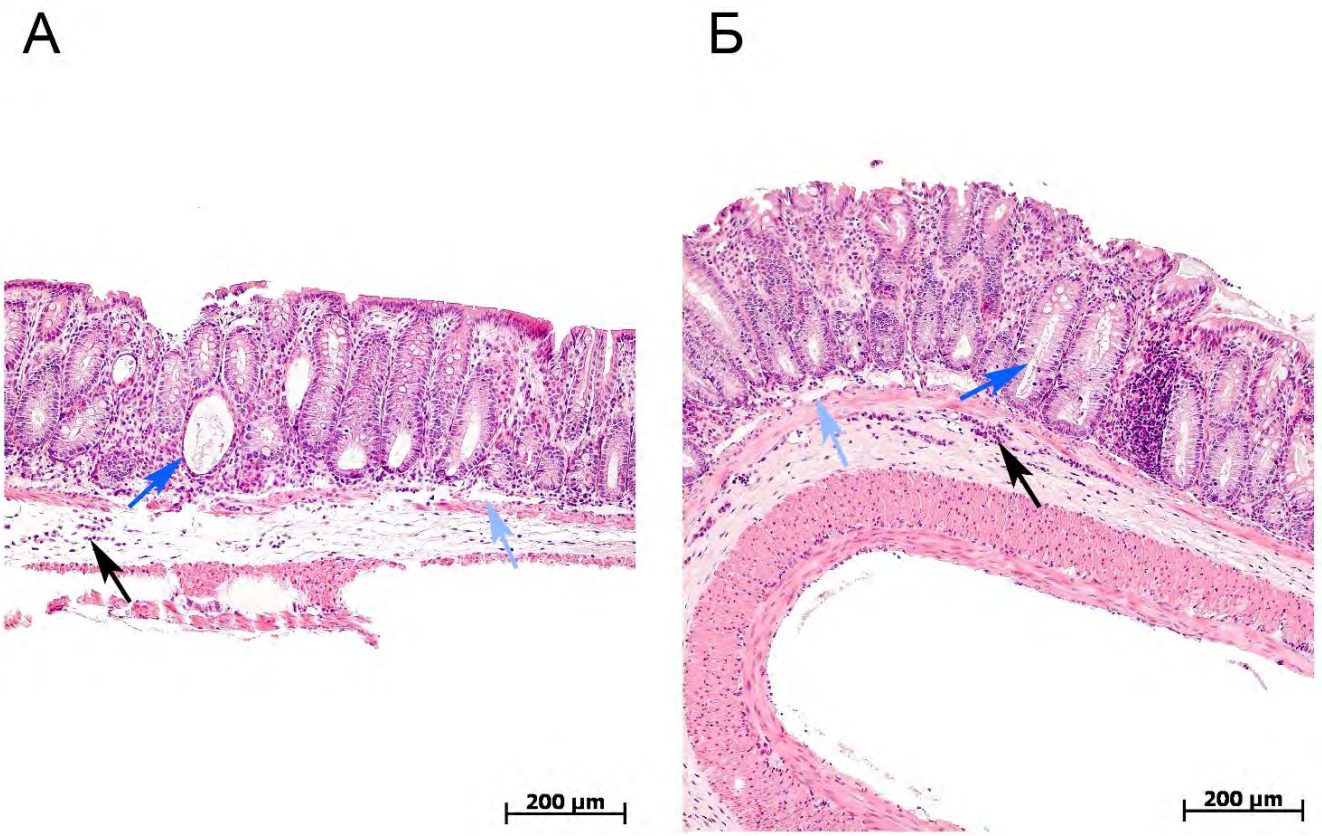


Рис. 3.4.10. Морфологическая характеристика ободочной кишки при хроническом колите у ВУ (А) и НУ (Б) мышей. Дистальный отдел ободочной кишки в зонах вне язв, с сохраненной эпителиальной выстилкой и слабо выраженной воспалительной инфильтрацией базального отдела СПСО. Крипты расширены, их просветы заполнены слизью (синие стрелки), лимфатические сосуды расширены (голубые стрелки), в подслизистой основе слабо выраженная воспалительная инфильтрация (черные стрелки). Окраска гематоксилином и эозином

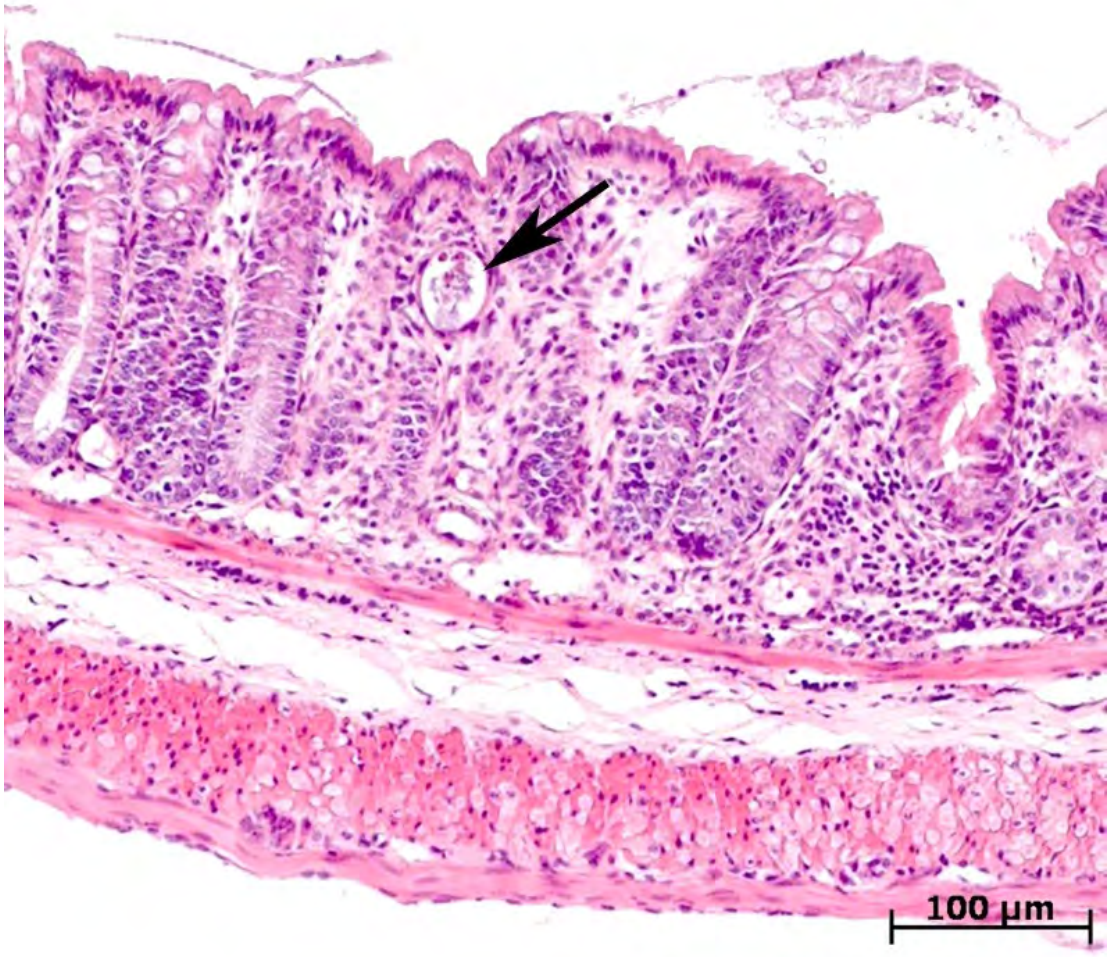


Рис. 3.4.11. Морфологическая характеристика ободочной кишки при хроническом колите у НУ самца мышей C57Bl/6. Крипт-абсцесс (стрелка) в участке ремоделирования слизистой оболочки с сохраненной эпителиальной выстилкой. Уменьшение числа бокаловидных клеток. Окраска гематоксилином и эозином

По данным морфометрического исследования относительная распространенность язв с эпителизацией в слизистой оболочке трех отделов ободочной кишки у НУ мышей статистически значимо не отличалась от показателей у ВУ животных. По распространенности язв без эпителизации различий также не выявлено (табл. 3.4.4, табл. 3.4.5).

Таблица 3.4.4

Относительная распространенность язв (% к длине ободочной кишки) в проксимальном, медиальном и дистальном отделах ободочной кишки при хроническом колите у ВУ (n=15) и НУ (n=5) мышей, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Отдел ободочной кишки	**Морфологическая характеристика язв**	**Группы наблюдения**		**P (ВУ-НУ)**
		ВУ (n=15)	**НУ (n=5)**	
Дистальный	С эпителизацией	15,5 (9,5-31,8)	18,1 (14,5-21,3)	0,55
	Без эпителизации	0,0 (0,0-1,9)	0,0 (0,0-0,4)	0,72
	Все	18,5 (9,8-31,8)	18,9 (14,5-21,3)	0,69
Медиальный	С эпителизацией	7,2 (5,5-8,5)	9,2 (4,4-10,7)	0,69
	Без эпителизации	0,0 (0,0-0,3)	0,0 (0,0-0,5)	0,72
	Все	7,2 (5,5-8,8)	9,2 (4,7-11,0)	0,69
Проксимальный	С эпителизацией	0,3 (0,3-4,0)	4,9 (2,8-6,4)	0,13
	Без эпителизации	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,99
	Все	0,3 (0,3-4,0)	4,9 (2,8-6,5)	0,11
Суммарно, в % по отношению к длине мышечной пластинки всей кишки	С эпителизацией	6,1 (4,2-9,4)	9,6 (7,4-10,9)	0,16
	Без эпителизации	0,1 (0,0-0,5)	0,1 (0,0-0,3)	0,99
	Все	6,7 (4,2-9,6)	9,7 (7,4-11,1)	0,21

Таблица 3.4.5

Относительная распространенность язв (% к длине ободочной кишки) с эпителизацией и без эпителизации в проксимальном, медиальном и дистальном отделах ободочной кишки при хроническом колите у ВУ (n=15) и НУ (n=5) мышей, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

Относительная распространенность язв	**Отдел ободочной кишки**	**Группы наблюдения**		**p (ВУ-НУ)**
		ВУ (n=15)	**НУ (n=5)**	
Язвы с эпителизацией	Дистальный	15,5 (9,5-31,8)[1]	18,1 (14,5-21,3)[2]	0,55
	Медиальный	7,2 (5,5-8,5)[3]	9,2 (4,4-10,7)[4]	0,69
	Проксимальный	0,3 (0,3-4,0)[5]	4,9 (2,8-6,4)[6]	0,13
	p	0,20[1-3]; **0,002**[1-5]; 0,31[3-5]	0,07[2-4]; **0,007**[2-6]; 0,99[4-6]	
Язвы без эпителизации	Дистальный	0,0 (0,0-1,9)[1]	0,0 (0,0-0,4)[2]	0,72
	Медиальный	0,0 (0,0-0,3)[3]	0,0 (0,0-0,5)[4]	0,72
	Проксимальный	0,0 (0,0-0,0)[5]	0,0 (0,0-0,1)[6]	0,99
	p	0,99[1-3]; 0,32[1-5]; 0,99[3-5]	0,99[2-4]; 0,99[2-6]; 0,99[4-6]	

Относительная распространенность всех типов язв была статистически значимо выше в дистальном отделе ободочной кишки по сравнению с проксимальным как у ВУ, так и у НУ мышей (табл. 3.4.6).

Таблица 3.4.6

Относительная распространенность всех типов язв (% к длине ободочной кишки) в проксимальном, медиальном и дистальном отделах ободочной кишки при хроническом колите у ВУ (n=15) и НУ (n=5) мышей, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

Отдел ободочной кишки	**Группы наблюдения**		**p (ВУ-НУ)**
	ВУ (n=15)	**НУ (n=5)**	
Дистальный	18,5 (9,8-31,8)[1]	18,9 (14,5-21,3)[2]	0,69
Медиальный	7,2 (5,5-8,8)[3]	9,2 (4,7-11,0)[4]	0,69
Проксимальный	0,3 (0,3-4,0)[5]	4,9 (2,8-6,5)[6]	0,11
p	0,20[1-3]; **0,002**[1-5]; 0,31[3-5]	0,09[2-4]; **0,006**[2-6]; 0,99[4-6]	

Относительная распространенность воспалительного инфильтрата (табл. 3.4.7 Приложения 4, рис. 3.4.12) в СПСО проксимального отдела ободочной кишки у НУ животных была в 2,7 раза выше по сравнению с ВУ, показатели статистически значимо различались (p=0,04). При этом относительная распространенность воспалительного инфильтрата была выше в дистальном

отделе ободочной кишки по сравнению с проксимальным как у ВУ, так и у НУ мышей (табл. 3.4.7 Приложения 4).

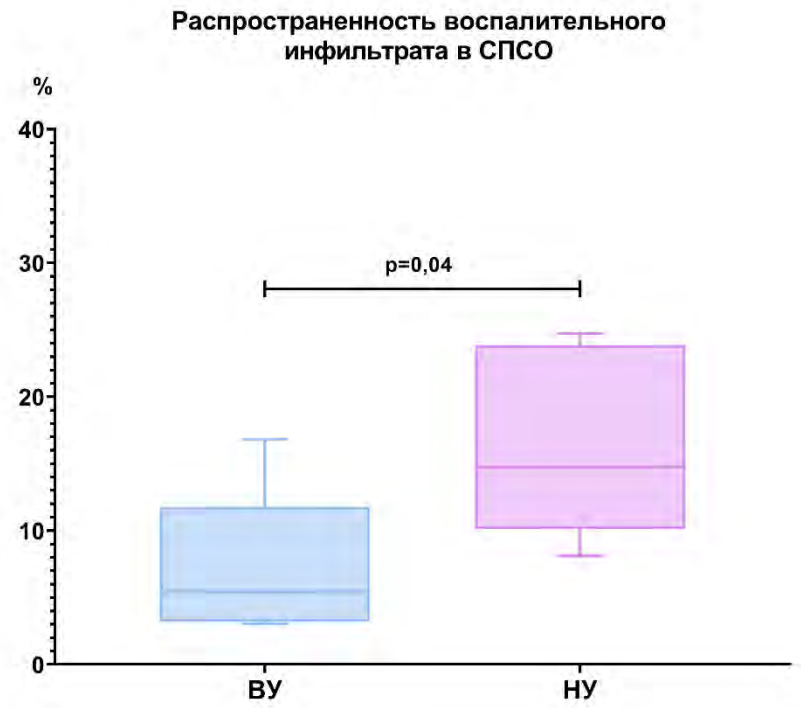


Рис. 3.4.12. Относительная распространенность воспалительного инфильтрата (% к длине ободочной кишки) в СПСО проксимального отдела ободочной кишки при хроническом колите у ВУ (n=15) и НУ (n=5) мышей, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

3.4.4. Морфологическое и морфометрическое исследование тимуса и селезенки при хроническом язвенном колите у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6

При морфологическом исследовании долек тимуса у самцов мышей с разной устойчивостью к гипоксии контрольных групп преобладало корковое вещество, плотно заселенное лимфоцитами (рис. 3.4.13, А, Б, черные стрелки). Границы между корковым и мозговым веществом были четкими (рис. 3.4.13, А, Б, синие стрелки).

При хроническом колите у ВУ мышей наблюдались очагово-нечеткие границы между корковым и мозговым веществом (рис. 3.4.13, В, синяя стрелка), тимические тельца преимущественно из 3-5 клеток и из более 5 клеток (рис. 3.4.13, Д, зеленая стрелка), а у НУ животных – акцидентальная инволюция, характеризующаяся расширением коркового и сужением мозгового вещества (рис. 3.4.13, Г, черная и красная стрелки), наличием тимических телец в виде кистоподобных полостей и с кератогиалином (рис. 3.4.13, Г, Е, зеленые стрелки).

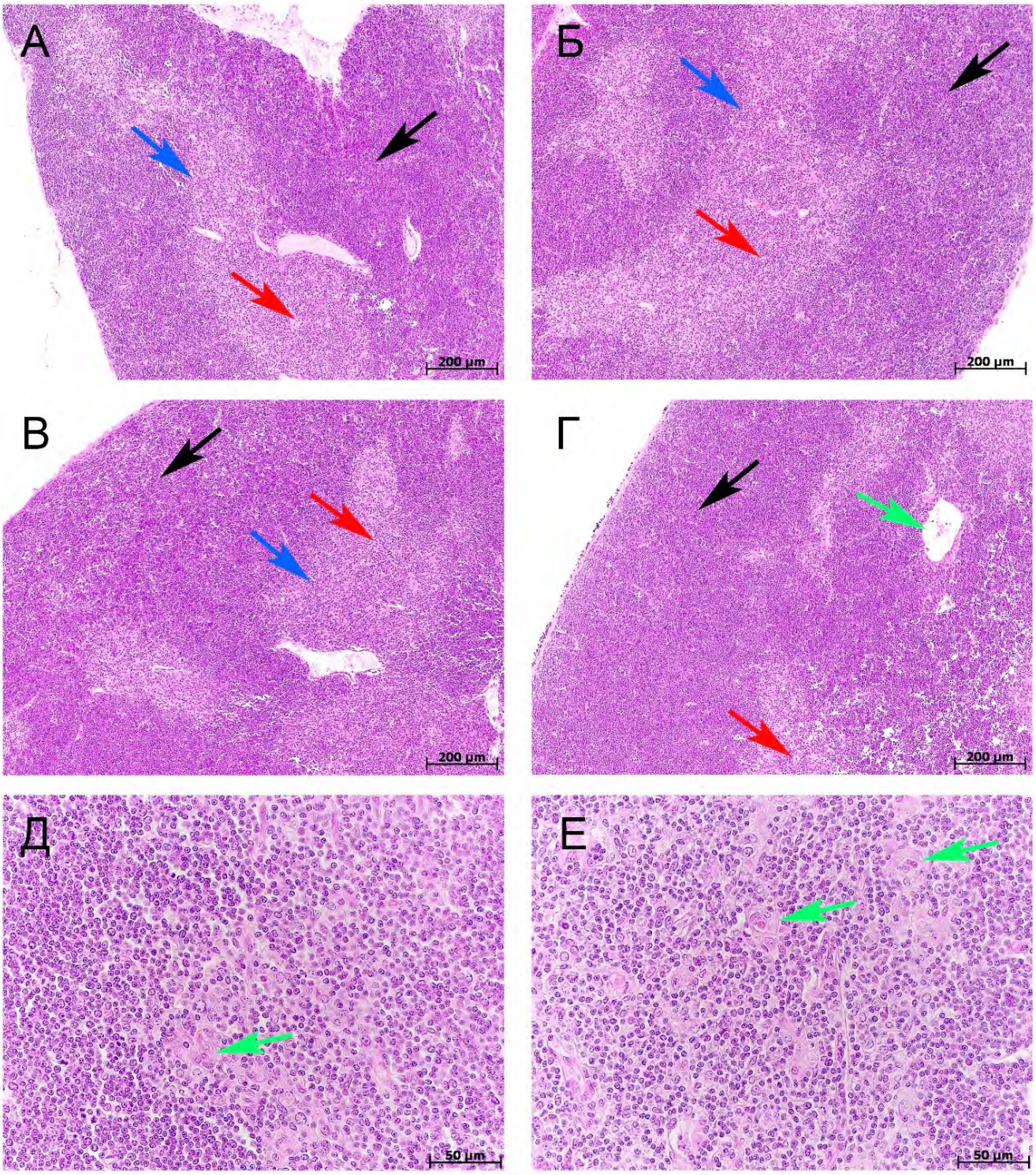


Рис. 3.4.13. Морфологическая характеристика долек тимуса у ВУ и НУ мышей контрольных групп (А, Б) и с хроническим колитом (В-Е). А, В, Д – ВУ; Б, Г, Е – НУ. А, Б – корковое вещество (черные стрелки) плотно заселено лимфоцитами, мозговое вещество (красные стрелки), границы между корковым и мозговым веществом четкие (синие стрелки); В – корковое вещество (черная стрелка), мозговое вещество (красная стрелка), границы коркового и мозгового вещества очагово-нечеткие (синяя стрелка); Г – гиперплазия коркового вещества (черная стрелка), сужение мозгового вещества (красная стрелка), тимическое тельце в виде кистоподобной полости в корковом веществе (зеленая стрелка); Д, Е — тимические тельца, образованные эпителиальными клетками (зеленые стрелки). Окраска гематоксилином и эозином

По данным морфометрического исследования в тимусе у НУ мышей при хроническом колите выявлена гиперплазия коркового вещества долек, в то время как у ВУ животных изменений не наблюдалось (табл. 3.4.8 Приложения 4). Показатель отношения коркового вещества к мозговому увеличивался в 2 раза только у НУ мышей. При хроническом колите только у НУ животных уменьшалось число тимических телец, состоящих из 3-5 клеток и увеличивалось количество тимических телец с кератогиалином (табл. 3.4.8 Приложения 4, рис. 3.4.14). У ВУ животных показатели числа тимических телец разных типов не изменялись.

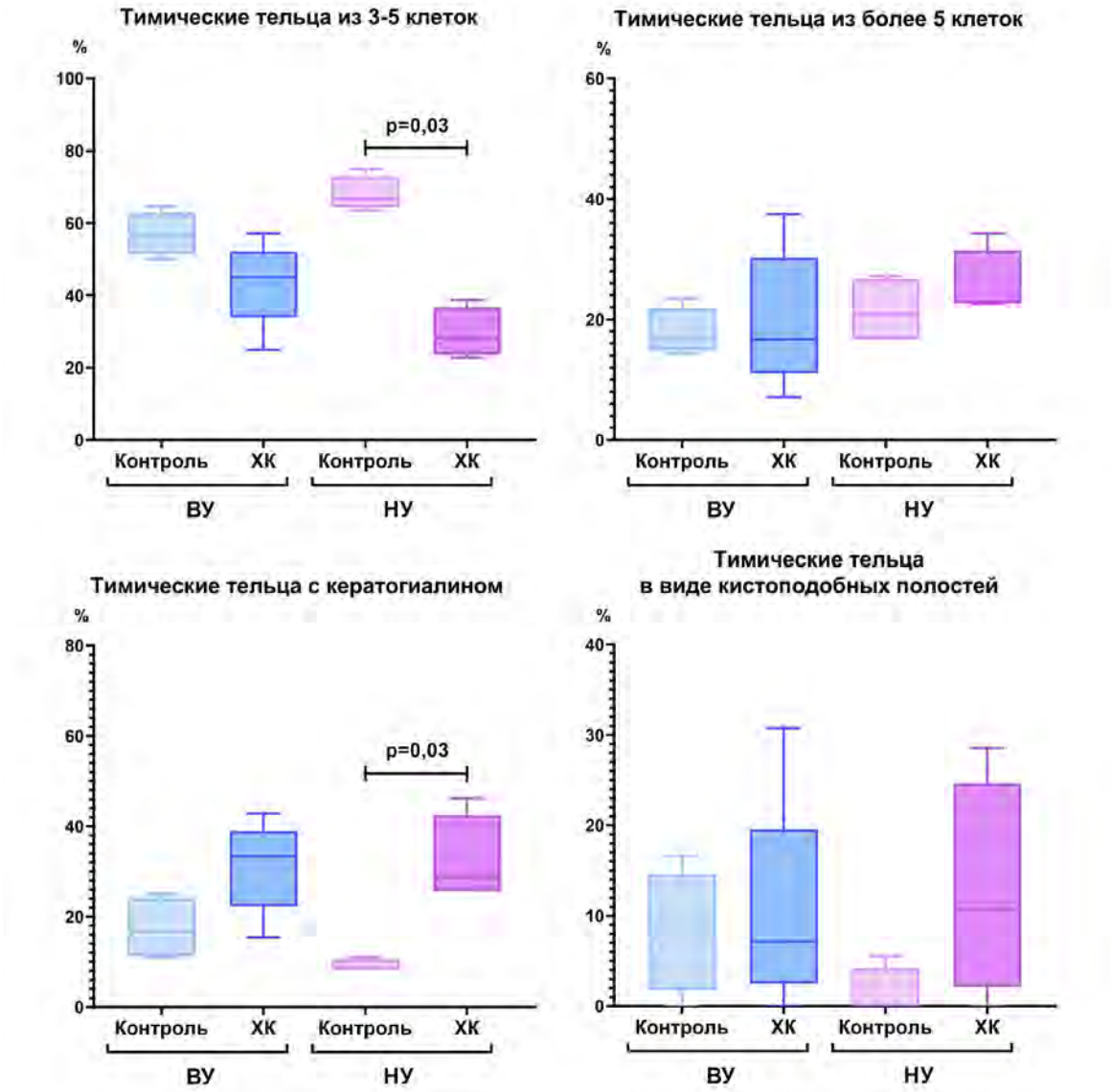


Рис. 3.4.14. Относительное количество тимических телец разных типов у ВУ и НУ мышей контрольных групп и с хроническим колитом (ХК), Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

При морфологическом исследовании в селезенке (рис. 3.4.15) у ВУ и НУ мышей контрольных групп в красной пульпе выявлены рассеянные форменные элементы крови. В некоторых лимфоидных узелках обнаружены небольшие светлые центры (рис. 3.4.15, А, Б, черные и синие стрелки).

По данным морфологического исследования селезенки при хроническом колите как у ВУ, так и у НУ мышей в красной пульпе выявлены рассеянные форменные элементы крови, белая пульпа была представлена хорошо выраженной ПАЛМ-зоной (рис. 3.4.15, Г, зеленая стрелка) и лимфоидными узелками со светлыми центрами (рис. 3.4.14, В-Е, черные и синие стрелки).

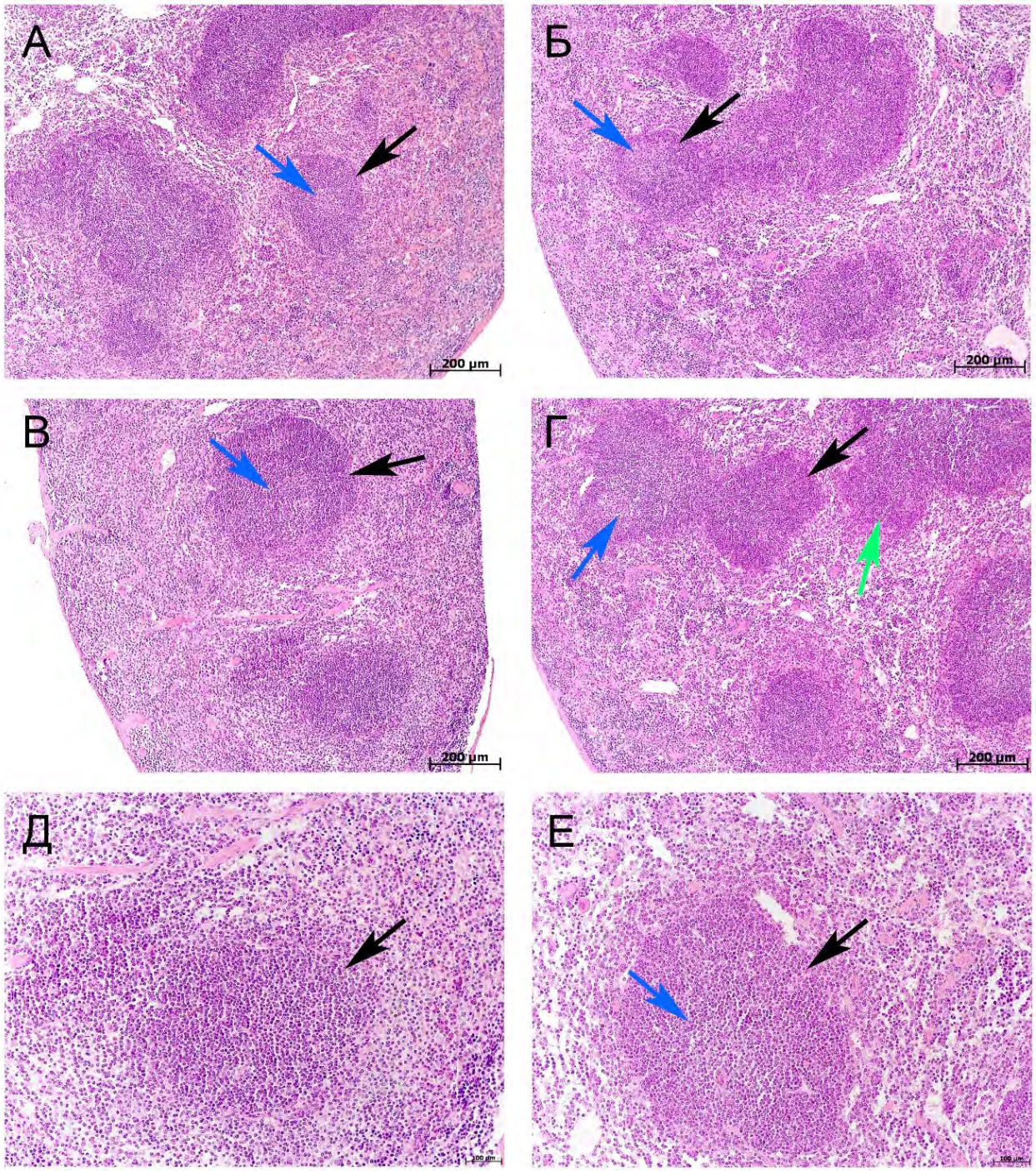


Рис. 3.4.15. Морфологическая характеристика селезенки у ВУ и НУ мышей контрольных групп (А, Б) и с хроническим колитом (В-Е). А, В, Д – ВУ; Б, Г, Е – НУ. А, Б – в лимфоидных узелках (черные стрелки) небольшие светлые центры (синие стрелки); В – в лимфоидных узелках светлые центры; Г – выраженные ПАЛМ-зоны (зеленая стрелка) и лимфоидные узелки (черная стрелка) со светлыми центрами (синяя стрелка); Д – лимфоидный узелок без светлого центра (черная стрелка); Е – лимфоидный узелок (черная стрелка) с широким светлым центром (синяя стрелка). Окраска гематоксилином и эозином

При морфометрическом исследовании селезенки исследуемые показатели у ВУ и НУ мышей с хроническим колитом не отличались от контрольных групп. Однако было показано, что при хроническом колите показатель объемной доли светлых центров лимфоидных узелков у НУ мышей был в 1,4 раза выше по сравнению с ВУ животными (табл. 3.4.9 Приложения 4, рис. 3.4.16).

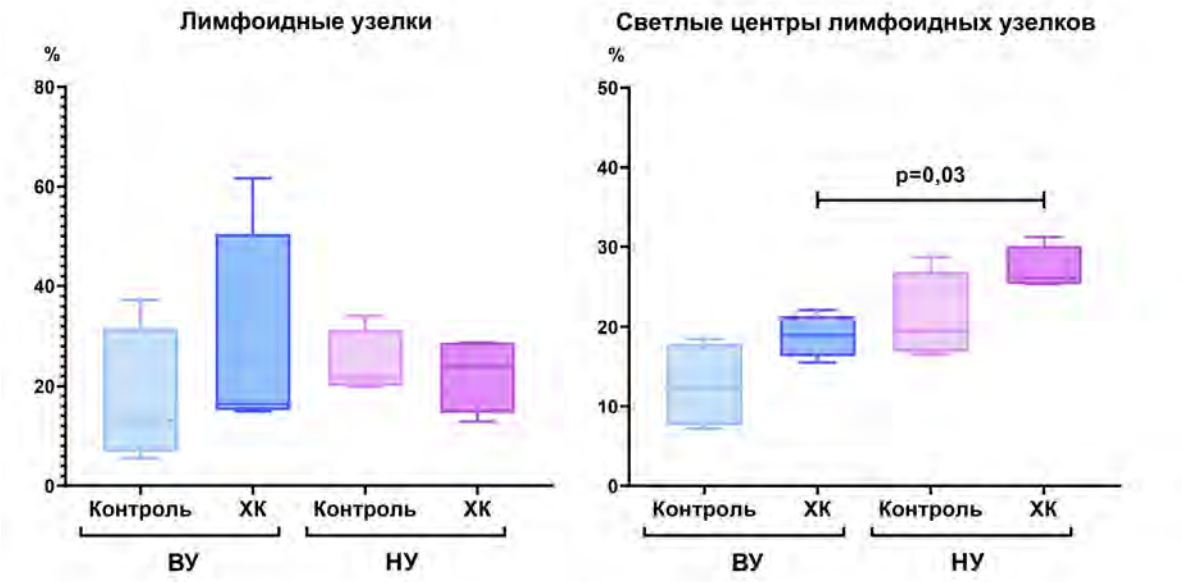


Рис. 3.4.16. Объемная доля лимфоидных узелков и их светлых центров в селезенке у ВУ и НУ мышей контрольных групп и с хроническим колитом (ХК), Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

3.4.5. Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови при хроническом язвенном колите у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6

При анализе субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови различий между ВУ и НУ животными контрольных групп по исследуемым показателям не выявлено. По сравнению с контрольной группой при хроническом колите в периферической крови у ВУ мышей наблюдалось уменьшение относительного количества Т-лимфоцитов, Т-хелперов и абсолютного количества Т-регуляторных лимфоцитов. При хроническом колите у НУ мышей в периферической крови снижалось абсолютное и относительное количество Т-лимфоцитов, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, регуляторных Т-лимфоцитов и увеличивалось относительное количество В-лимфоцитов по сравнению с контрольной группой. По сравнению с НУ у ВУ мышей при хроническом колите выявлено большее абсолютное и относительное количество Т-регуляторных лимфоцитов в периферической крови в 3,3 и 1,7 раз соответственно (табл. 3.4.10 Приложения 4, рис. 3.4.17, 3.4.18).

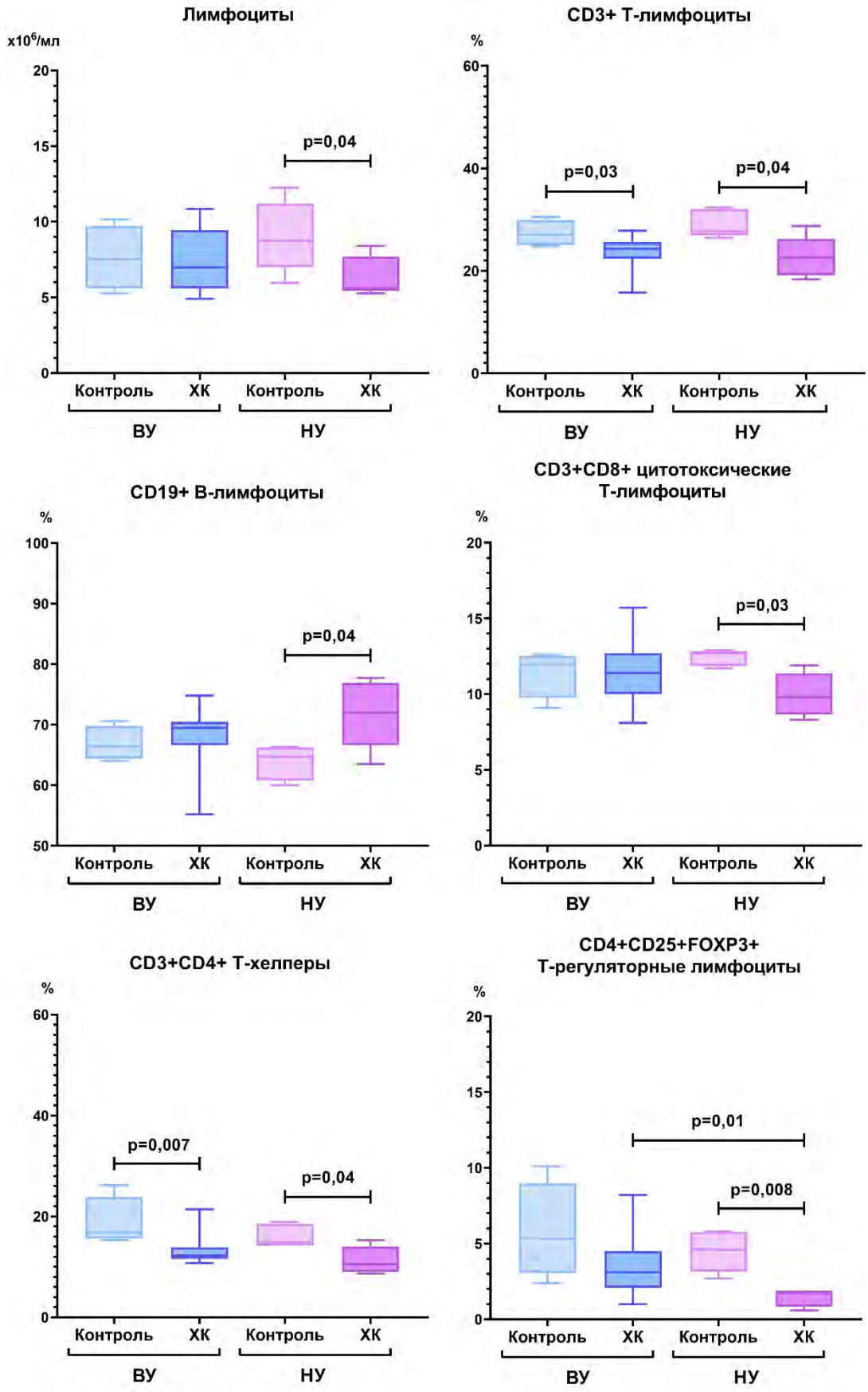


Рис. 3.4.17. Абсолютное число лимфоцитов и относительное количество Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, цитотоксических Т-лимфоцитов, Т-хелперов и Т-регуляторных лимфоцитов в периферической крови у ВУ и НУ мышей контрольных групп и с хроническим колитом (ХК), Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

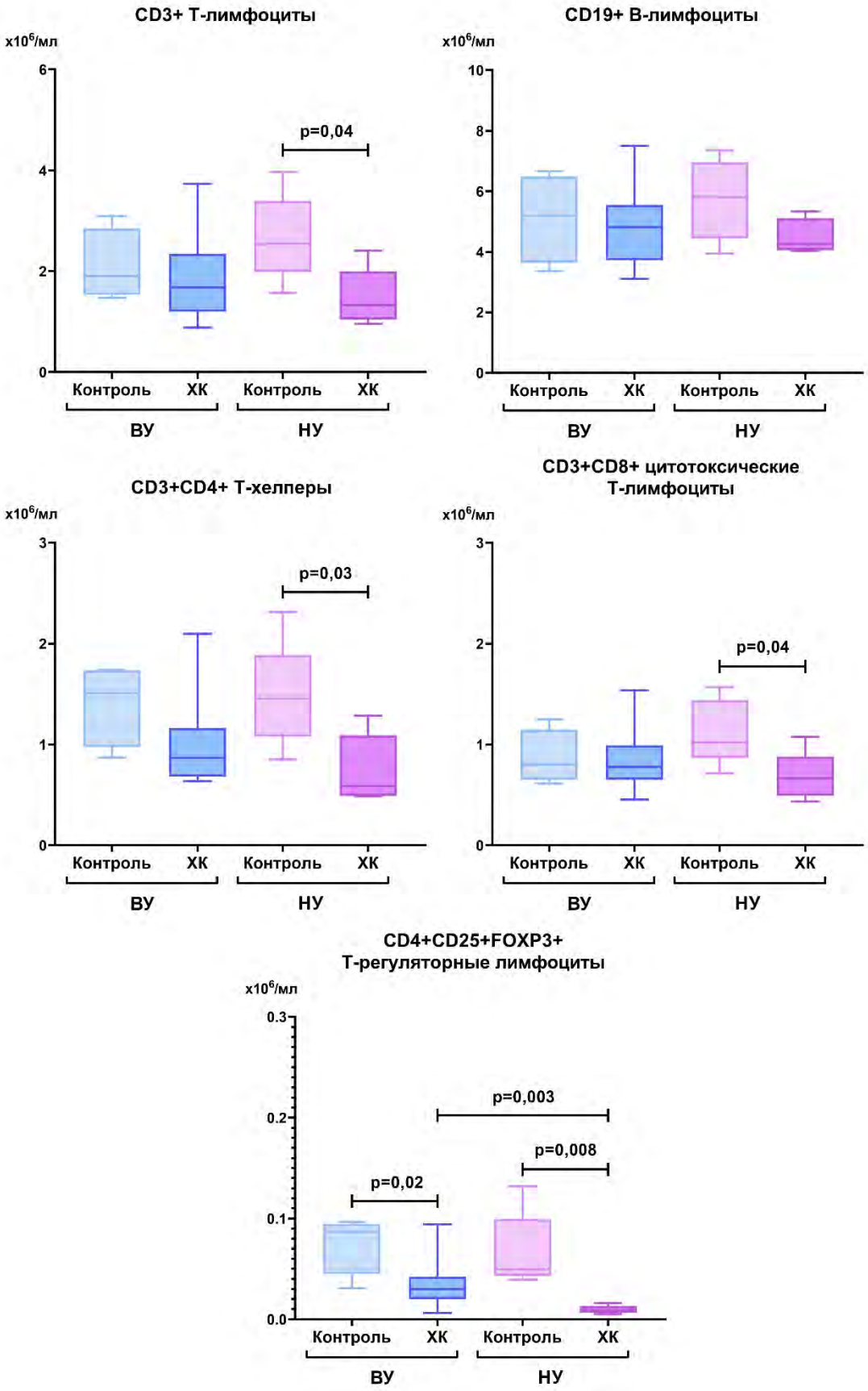


Рис. 3.4.18. Абсолютное число Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, цитотоксических Т-лимфоцитов, Т-хелперов и Т-регуляторных лимфоцитов в периферической крови у ВУ и НУ мышей контрольных групп и с хроническим колитом (ХК), Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Заключение и обсуждение к 3.4

Таким образом, по сравнению с ВУ НУ самцы мышей C57Bl/6 характеризуются более тяжелым течением ДСН-индуцированного хронического ЯК. У них наблюдаются более выраженные клинические проявления хронического колита, снижение массы тела, выше гибель животных. По показателю относительной распространенности эпителизированных язв и язв без эпителизации различий у животных с разной устойчивостью к гипоксии выявлено не было, однако относительная распространенность воспалительного инфильтрата в проксимальном отделе ободочной кишки была статистически значимо выше у НУ мышей по сравнению с ВУ (рис. 3.4.19).

При хроническом колите только у НУ мышей в тимусе наблюдалась гиперплазия коркового вещества долек, в то время как у ВУ животных его статистически значимое расширение отсутствовало. Только у НУ мышей уменьшалось число тимических телец, состоящих из 3-5 клеток и увеличивалось количество тимических телец с кератогиалином. По сравнению с ВУ животными у НУ был выше показатель объемной доли светлых центров лимфоидных узелков селезенки. При анализе субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови при хроническом колите у ВУ мышей наблюдалось уменьшение относительного количества Т-лимфоцитов, Т-хелперов и абсолютного количества Т-регуляторных клеток по сравнению с контрольной группой (рис. 3.4.19). При хроническом колите у НУ мышей выявлено снижение абсолютного и относительного количества Т-лимфоцитов, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, Т-регуляторных клеток и увеличение относительного числа В-лимфоцитов. По сравнению с НУ у ВУ мышей при хроническом колите обнаружено большее абсолютное и относительное количество Т-регуляторных клеток в периферической крови.

В нашем исследовании при клиническом наблюдении за животными с хроническим колитом, индуцированным тремя циклами потребления 1%-го ДСН, как у ВУ, так и у НУ мышей отмечалось наличие диареи с примесью крови, однако на 14-е сут, по результатам полуколичественной оценки, проявления у НУ животных были более выраженными. Только у НУ животных наблюдалось статистически значимое снижение массы тела на 14-е сут эксперимента по сравнению с контрольной группой, на 14-е и 27-е сут она была ниже по сравнению с ВУ мышами. При развитии хронического колита гибель ВУ животных составила 16,7% (3 из 18), в то время как НУ – 54,5% (6 из 11), показатели статистически значимо различались (p=0,048). По данным литературы более выраженные клинические проявления колита – высокая гибель, снижение массы тела, наличие диареи с примесью крови – свидетельствуют о более тяжелом течении заболевания (Karhausen et al., 2004). Очевидно, что у НУ мышей хронический колит протекает тяжелее, чем у ВУ, что приводит к большей гибели этих животных.

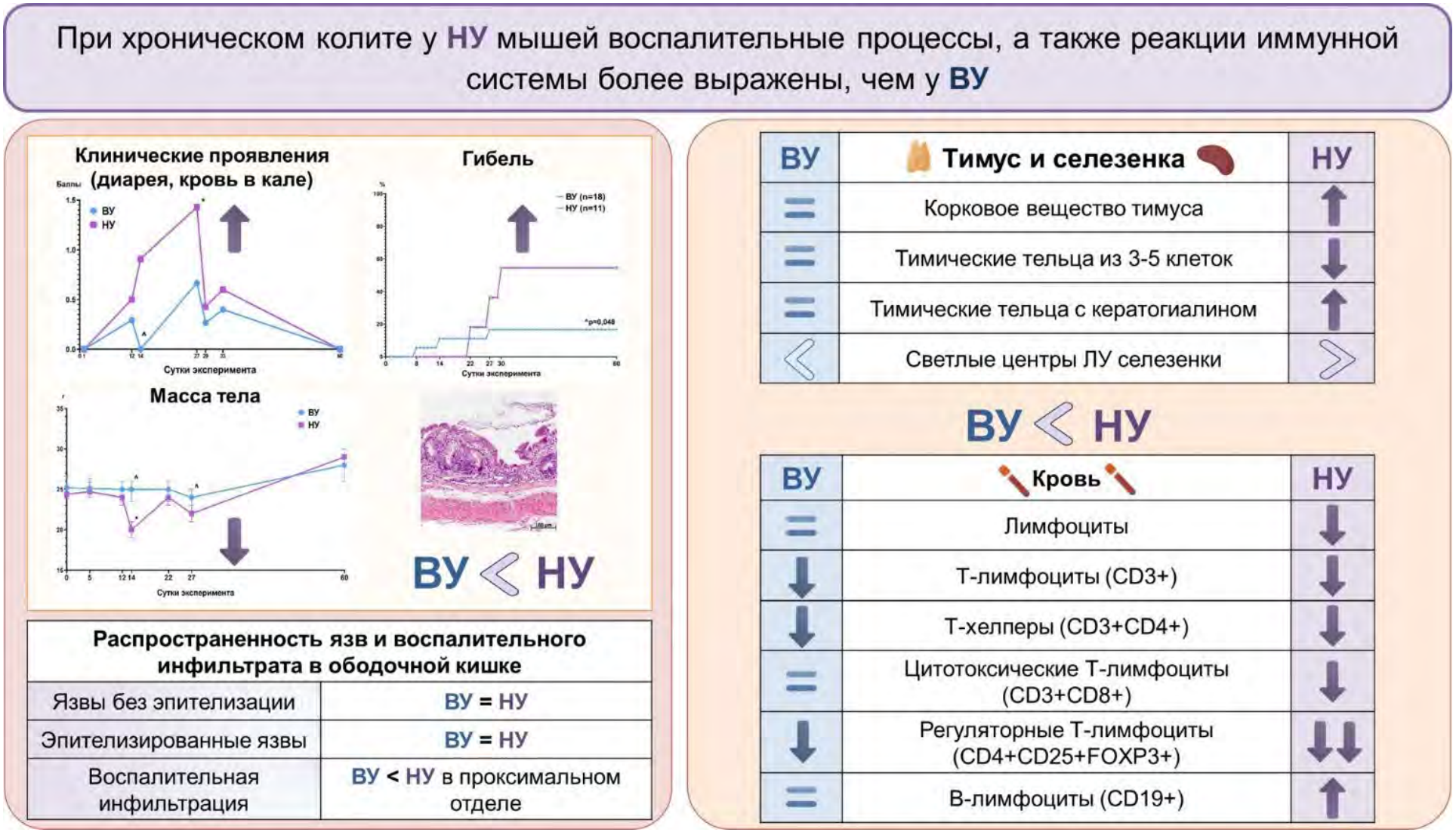


Рис. 3.4.19. Суммарные результаты исследования язвенного и воспалительного процессов в ободочной кишке и морфофункциональных особенностей иммунной системы при хроническом колите у ВУ и НУ мышей. ЛУ – лимфоидные узелки, стрелки – изменения по сравнению с контрольной группой, < и > – различия между ВУ и НУ

Возможно, отсутствие различий по распространенности язв с эпителизацией и без нее между ВУ и НУ животными связано с гибелью более половины НУ мышей (6 из 11) от тяжелых проявлений острого фульминантного колита. Относительная распространенность воспалительного инфильтрата в СПСО проксимального отдела ободочной кишки у НУ мышей была в 2,7 раза выше по сравнению с ВУ, что свидетельствует о более тяжелом течении у них хронического колита.

Выявленное нами у НУ животных развитие гиперплазии коркового вещества долек тимуса и увеличение числа тимических телец с кератогиалином при хроническом колите согласуется с данными Е.А. Постоваловой и соавт. (2019). Полученные данные морфологического и морфометрического исследований тимуса свидетельствуют о восстановлении коркового вещества у НУ мышей с хроническим колитом и развитии гиперплазии за счет активации процессов пролиферации и дифференцировки тимоцитов, что согласуется с данными литературы и характерно, как показано О.В. Макаровой и соавт. (2012), для хронического воспалительного процесса. Гиперплазия коркового вещества долек тимуса и выявленное уменьшение абсолютного и относительного количества основных субпопуляций Т-лимфоцитов (Т-лимфоцитов, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов и регуляторных Т-лимфоцитов) в крови у НУ мышей при хроническом колите свидетельствует о развитии компенсированного вторичного иммунодефицита (Хаитов и Пинегин, 1999). Более высокий показатель объемной доли светлых центров лимфоидных узелков селезенки у НУ мышей по сравнению с ВУ отражает активацию пролиферации В-лимфоцитов, вероятно, связанную с антигенной стимуляцией бактериями и ЛПС вследствие нарушенного эпителиального барьера ободочной кишки (Nojima et al., 2011; Wang et al., 2019). Это подтверждается увеличением относительного числа В-лимфоцитов в крови у НУ мышей.

У ВУ животных при хроническом колите выявлены нарушения иммунитета, обусловленные дисбалансом субпопуляций Т-лимфоцитов – снижалось относительное число Т-лимфоцитов, Т-хелперов и абсолютное количество Т-регуляторных лимфоцитов. По сравнению с НУ у ВУ мышей при хроническом колите в крови обнаружено большее абсолютное и относительное число Т-регуляторных лимфоцитов (в 3,3 и 1,7 раз соответственно). По данным литературы регуляторные Т-лимфоциты 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 количества CD4+CD25+FOXP3+ регуляторных Т-лимфоцитов в периферической крови (Yamada et al., 2016; Jalalvand et al., 2023), в том числе при обострении ЯК (Maul et al., 2005). Меньшее количество регуляторных Т-лимфоцитов в

периферической крови у НУ мышей по сравнению с ВУ свидетельствует о более тяжелом течении заболевания у этих животных.

Таким образом, нами показано (Джалилова и соавт., 2018б, 2024а), что по сравнению с ВУ НУ мыши характеризовались более тяжелым течением хронического колита: высокой гибелью животных, более выраженными клиническими проявлениями, снижением массы тела, большей распространенностью воспалительного инфильтрата в СПСО проксимального отдела ободочной кишки. У НУ животных наблюдалось развитие компенсированного вторичного иммунодефицита, который характеризовался гиперплазией коркового вещества долек тимуса, большей объемной долей светлых центров лимфоидных узелков селезенки по сравнению с ВУ мышами, снижением в периферической крови основных субпопуляций Т-лимфоцитов (Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов и регуляторных Т-лимфоцитов) по сравнению с контрольной группой. При хроническом колите у ВУ животных выявлен только дисбаланс субпопуляций Т-лимфоцитов.

Задачей следующей части работы было установить особенности инициации и прогрессии колит-ассоциированного КРР у ВУ и НУ животных.

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «РОССИЙСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ХИРУРГИИ
имени АКАДЕМИКА Б.В. ПЕТРОВСКОГО»
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МОРФОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА
имени АКАДЕМИКА А.П. АВЦЫНА»

На правах рукописи

Джалилова Джулия Шавкатовна

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

1.5.22. Клеточная биология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

доктора биологических наук

ТОМ II

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор

Макарова Ольга Васильевна

Москва – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ТОМII

ТОМ II 1
3.5. Морфологическая характеристика, молекулярно-биологические и иммунологические особенности колоректального рака у ВУ и НУ самцов мышей С57Bl/6 5
3.5.1. Динамика массы тела, морфологическая характеристика дистального отдела ободочной кишки и брыжеечных лимфатических узлов, частота развития и площадь опухолей через 70 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у ВУ и НУ самцов мышей С57Bl/6 6
3.5.2. Клинический анализ крови через 70 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у ВУ и НУ самцов мышей С57Bl/6 16
3.5.3. Динамика массы тела, морфологическая характеристика дистального отдела ободочной кишки, частота развития и площадь опухолей через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у ВУ и НУ самцов мышей С57Bl/6.... 19
3.5.4. Уровни экспрессии генов и иммуногистохимическое исследование в перитуморальной зоне и в опухолях дистального отдела ободочной кишки через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у ВУ и НУ самцов мышей С57Bl/6 25
3.5.5. Содержание HIF-1α и СРБ в сыворотке крови через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у ВУ и НУ самцов мышей С57Bl/6 34
3.5.6. Субпопуляционный состав лимфоцитов и макрофагов в опухолях через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у ВУ и НУ самцов мышей С57Bl/6 35
3.5.7. Морфологическое и морфометрическое исследование тимуса и селезенки через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у ВУ и НУ самцов мышей С57Bl/6 36
3.5.8. Морфологическое исследование брыжеечных лимфатических узлов, печени и легких через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у ВУ и НУ самцов мышей С57Bl/6 41
3.5.9. Субпопуляционный состав клеток брыжеечных лимфатических узлов через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у ВУ и НУ самцов мышей С57Bl/6 45
3.5.10. Клинический анализ и субпопуляционный состав клеток периферической крови через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у ВУ и НУ самцов мышей С57Bl/6 48
3.5.11. Выявление железосодержащего пигмента гемосидерина в аденокарциномах дистального отдела ободочной кишки через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у ВУ и НУ самцов мышей С57Bl/6.... 54
Заключение и обсуждение к 3.5 55
3.6. Морфологические, иммуногистохимические и молекулярно-биологические особенности прогрессии глиобластомы 101.8 у ВУ и НУ самцов крыс Вистар....80
3.6.1. Гибель животных и динамика массы тела на 11-е и 15-е сут после трансплантации глиобластомы у ВУ и НУ самцов крыс Вистар.... 81
3.6.2. Морфологическое исследование глиобластомы 101.8 на 11-е и 15-е сут после трансплантации у ВУ и НУ самцов крыс Вистар 83
3.6.3. Волюмометрическая оценка опухолей с помощью 3D реконструирования на 11-е и 15-е сут после трансплантации глиобластомы у ВУ и НУ самцов крыс Вистар.... 85

3.6.4. Оценка абсолютного числа кровеносных сосудов и площади некрозов в опухолях на 11-е и 15-е сут после трансплантации глиобластомы у ВУ и НУ самцов крыс Вистар..... 86
3.6.5. Оценка пролиферативной активности опухолевых клеток на 11-е и 15-е сут после трансплантации глиобластомы у ВУ и НУ самцов крыс Вистар 87
3.6.6. Содержание TNF-α, IL-1β и HIF-1α в сыворотке крови на 11-е и 15-е сут после трансплантации глиобластомы у ВУ и НУ самцов крыс Вистар 89
Заключение и обсуждение к 3.6 90
3.7. Морфологические и молекулярно-биологические особенности прогрессии карциномы легких у ВУ и НУ самцов мышей С57Bl/6.....100
3.7.1. Гибель животных, частота развития опухолей и метастазирования, динамика массы тела на 21-е и 28-е сут после подкожного введения клеток карциномы легких у ВУ и НУ самцов мышей С57Bl/6 101
3.7.2. Оценка массы и объема подкожных опухолей, морфологическое исследование опухолей и анализ пролиферативной активности опухолевых клеток на 21-е и 28-е сут после подкожного введения клеток карциномы легких у ВУ и НУ самцов мышей С57Bl/6 105
3.7.3. Морфологическое и морфометрическое исследование легких на 21-е и 28-е сут после подкожного введения клеток карциномы легких у ВУ и НУ самцов мышей С57Bl/6 107
3.7.4. Морфологическое и морфометрическое исследование тимуса и морфологическое исследование селезенки на 21-е и 28-е сут после подкожного введения клеток карциномы легких у ВУ и НУ самцов мышей С57Bl/6 111
3.7.5. Клинический анализ и субпопуляционный состав клеток периферической крови на 21-е и 28-е сут после подкожного введения клеток карциномы легких у ВУ и НУ самцов мышей С57Bl/6 117
3.7.6. Уровни экспрессии генов *Hif1a, Nfkb, Tnfa, Il1b* и *Tgfb* в печени на 21-е и 28-е сут после подкожного введения клеток карциномы легких у ВУ и НУ самцов мышей С57Bl/6 119
3.7.7. Содержание СРБ в сыворотке крови на 21-е и 28-е сут после подкожного введения клеток карциномы легких у ВУ и НУ самцов мышей С57Bl/6 121
Заключение и обсуждение к 3.7 121
Раздел 3. Молекулярно-биологические особенности макрофагов, уровень продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в зависимости от устойчивости к гипоксии и определение лабораторных способов оценки устойчивости к недостатку кислорода 130
3.8. Молекулярно-биологические особенности макрофагов и уровень продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов у ВУ и НУ самцов крыс Вистар 131
3.8.1. Молекулярно-биологическая и функциональная характеристика макрофагов у ВУ и НУ самцов крыс Вистар..... 132
3.8.2. Спонтанная и стимулированная продукция цитокинов клетками крови у ВУ и НУ самцов крыс Вистар 141
3.8.3. Продукция цитокинов, стимулированная гипоксией и воспалением, у самцов крыс Вистар до и после сублетальной гипоксической нагрузки в барокамере..... 143
Заключение и обсуждение к 3.8 147
3.9. Разработка способов *ex vivo* оценки устойчивости к недостатку кислорода самцов крыс Вистар без сублетального гипоксического воздействия в барокамере 167
3.9.1. Фагоцитарная активность моноцитов периферической крови до определения устойчивости самцов крыс Вистар к гипоксии 168

3.9.2. Спонтанная и стимулированная гипоксией продукция цитокинов клетками крови до определения устойчивости животных к гипоксии..... 169
3.9.3. Спонтанная и стимулированная провоспалительными стимулами продукция цитокинов клетками крови до определения устойчивости животных к гипоксии..... 170
Заключение и обсуждение к 3.9 171
Глава 4. ОБЩЕЕ ОБСУЖДЕНИЕ 177
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 195
ВЫВОДЫ.....199
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....200
ПРИЛОЖЕНИЯ.....250
Приложение 1. Взаимосвязь между устойчивостью к гипоксии, окислительным стрессом и содержанием провоспалительных и противовоспалительных цитокинов у новорожденных, препубертатных и половозрелых самцов крыс Вистар.....250
Приложение 2. Сравнительная характеристика устойчивости к гипоксии, уровней экспрессии *Hif1a, Vegf* и *Nfkb* в печени, содержания белка HIF-1α в сыворотке крови и числа нейтрофилов в легких у ВУ и НУ половозрелых и старых самцов крыс Вистар.....251
Приложение 3. Морфологическая характеристика язвенного и воспалительного процессов в ободочной кишке и морфофункциональные особенности иммунной системы при остром колите у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6.....252
Приложение 4. Морфологическая характеристика язвенного и воспалительного процессов в ободочной кишке и морфофункциональные особенности иммунной системы при хроническом колите у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6 257
Приложение 5. Морфологическая характеристика, молекулярно-биологические и иммунологические особенности колоректального рака у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6 261
Приложение 6. Морфологические, иммуногистохимические и молекулярно-биологические особенности прогрессии глиобластомы 101.8 у ВУ и НУ самцов крыс Вистар 279
Приложение 7. Морфологические и молекулярно-биологические особенности прогрессии карциномы легких у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6 281
Приложение 8. Молекулярно-биологические особенности макрофагов и уровень продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов у ВУ и НУ самцов крыс Вистар 288
Приложение 9. Разработка способов *ex vivo* оценки устойчивости к недостатку кислорода самцов крыс Вистар без сублетального гипоксического воздействия в барокамере.....295

3.5. Морфологическая характеристика, молекулярно-биологические и иммунологические особенности колоректального рака у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6[5]

Задачей следующей части работы было оценить морфологические, молекулярно-биологические и иммунологические особенности КРР у ВУ и НУ животных. В данной части работы использовали мышей, так как наиболее распространенной и высоковоспроизводимой моделью злокачественного процесса на фоне хронического воспаления является модель колит-ассоциированного КРР у мышей (Li et al., 2022). Данная модель имеет преимущества над трансплантируемыми опухолями, так как воспроизводит процесс развития опухоли от момента инициации до прогрессии и повторяет последовательность стадий КРР у человека (Tanimura et al., 2021; Deng et al., 2022; Dzhalilova et al., 2023г). Для того, чтобы охарактеризовать различия в развитии опухолей на фоне хронического воспаления у ВУ и НУ мышей, индуцировали хронический колит с предварительным введением канцерогена АОМ. По данным литературы для моделирования КРР с помощью АОМ и ДСН преимущественно используют сроки 10, 20 и 30 недель после введения АОМ, при этом частота развития опухолей с увеличением срока эксперимента повышается (Suzuki et al., 2015; Tanimura et al., 2021; Martínez-Gregorio et al., 2022). Поэтому в данной работе исследование проведено в два срока – через 70 сут (то есть 10 недель) после введения АОМ и через 140 сут (20 недель).

---

[5]При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении научных степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования (в скобках приведен импакт-фактор журнала, объем публикации в условных печатных листах/вклад автора в условных печатных листах):

1. **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 РИНЦ 0,988, 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 WoS (JIF), Q4 (0,50/0,40)]
2. **Dzhalilova D.Sh.**, Silina M.V., Tsvetkov I.S., Kosyreva 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 WoS (JIF), Q1 (2,0/1,5)
3. **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 WoS (JIF), Scopus, Q2 (2,1/1,7)
4. **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 РИНЦ 0,880, RSCI (0,40/0,30)

По результатам определения устойчивости к гипоксии в барокамере по «времени жизни» на «высоте» 10 000 м среди половозрелых мышей C57Bl/6, включенных в эксперименты по моделированию КРР в течение 70 сут 31,3% оказались ВУ со «временем жизни» более 10 мин, 22,5% – НУ со «временем жизни» менее 3 мин, а в течение 140 сут – 31,5% ВУ и 21,4% НУ (рис. 3.5.1).

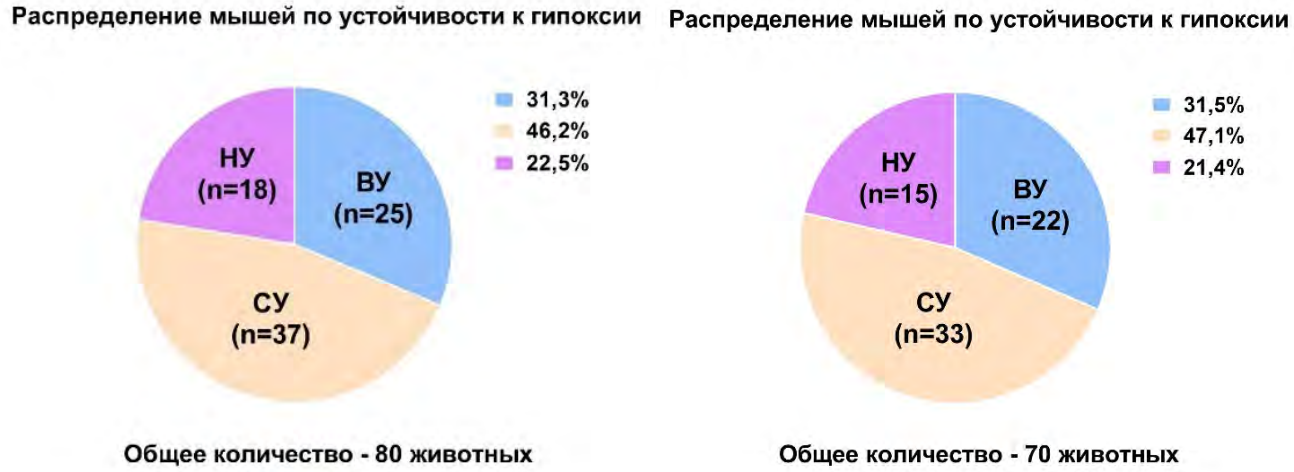


Рис. 3.5.1. Результаты разделения половозрелых мышей C57Bl/6, включенных в эксперименты по моделированию КРР в течение 70 (слева) и 140 (справа) сут, в барокамере на критической «высоте» 10 000 м на ВУ, СУ и НУ

3.5.1. Динамика массы тела, морфологическая характеристика дистального отдела ободочной кишки и брыжеечных лимфатических узлов, частота развития и площадь опухолей через 70 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6

При клиническом наблюдении за животными, получавшими однократно АОМ и три цикла ДСН, как у ВУ, так и у НУ мышей отмечалась диарея с примесью крови. Максимальные клинические проявления колита выявлены после первого цикла потребления ДСН. Тем не менее, по сравнению с началом эксперимента снижения массы тела после потребления трех циклов ДСН не обнаружено, а к концу эксперимента масса тела увеличивалась как у ВУ, так и у НУ мышей (табл. 3.5.1 Приложения 5, рис. 3.5.2). При этом на 36-е и 70-е сут эксперимента масса тела у ВУ мышей была ниже по сравнению с НУ (табл. 3.5.1 Приложения 5). Следует отметить, что в контрольной группе НУ мышей масса тела на 70-е сут эксперимента также была выше по сравнению с ВУ (табл. 3.5.2 Приложения 5). По сравнению с мышами контрольных групп только у НУ животных опытной группы через 70 сут после введения АОМ масса тела была ниже (табл. 3.5.2 Приложения 5). Гибели животных в течение эксперимента не наблюдалось.

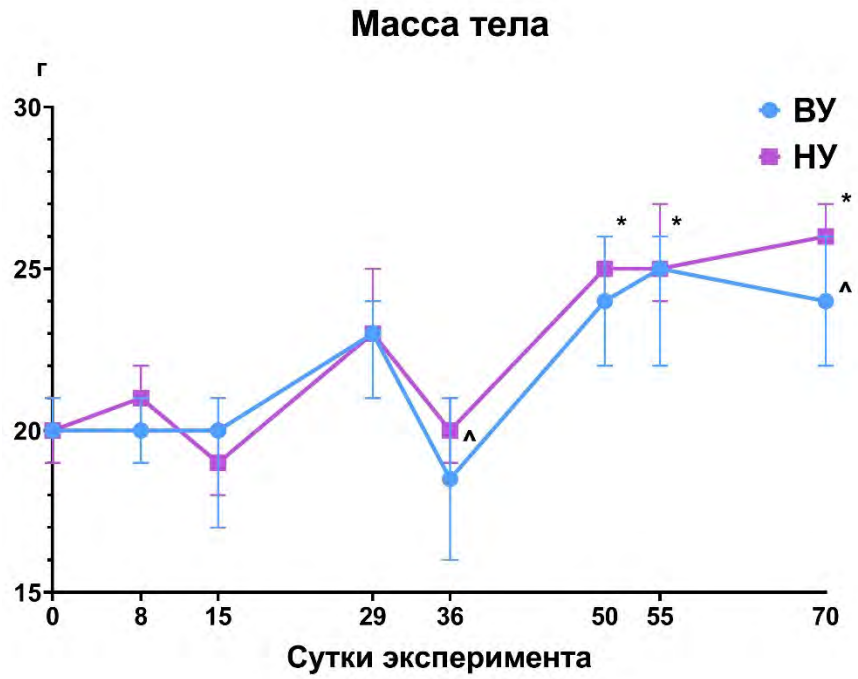


Рис. 3.5.2. Изменение массы тела в течение 70 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у ВУ и НУ мышей, Me (25%-75%). Статистически значимые различия (p<0,05): * – по сравнению с началом эксперимента (критерии Краскела-Уоллиса и Данна), ^ – по сравнению с НУ мышами (критерий Манна-Уитни)

При макроскопическом исследовании ободочной кишки у ВУ и НУ мышей опытных групп выявлены опухоли, которые были представлены полиповидными новообразованиями, значительно возвышающимися над поверхностью слизистой оболочки и невыступающими образованиями – слегка приподнятыми над поверхностью слизистой оболочки участками розового цвета, поверхность которых была зернистой (рис. 3.5.3). При микроскопическом исследовании полипы соответствовали аденокарциномам, а выступающие участки розового цвета с зернистой поверхностью – железистой интраэпителиальной неоплазии.

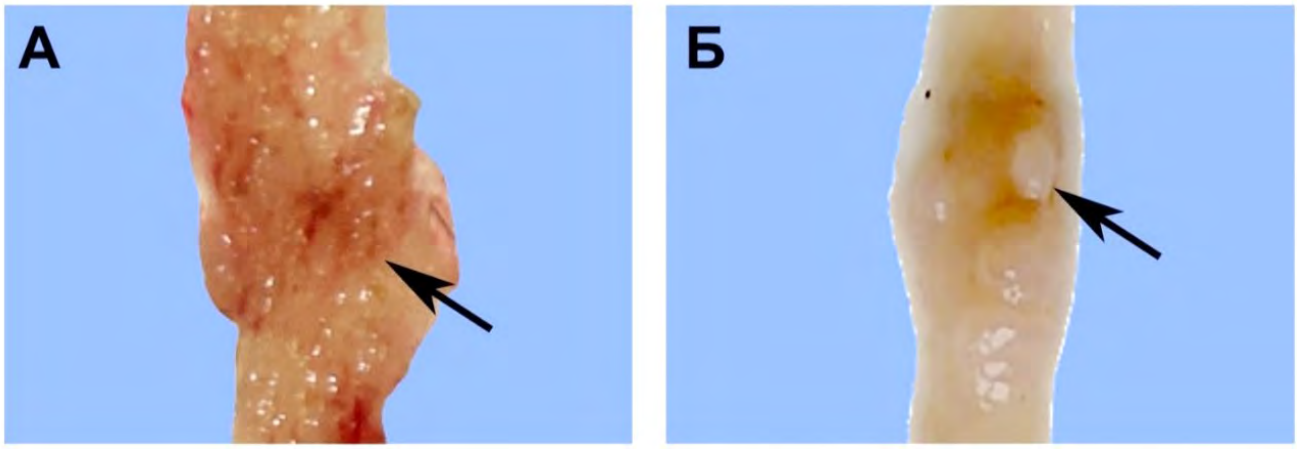


Рис. 3.5.3. Макроскопическая характеристика опухолей ободочной кишки через 70 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у мышей C57Bl/6. А – слегка приподнятый над поверхностью слизистой оболочки участок розового цвета с зернистой поверхностью; Б – полиповидные новообразования, значительно возвышающиеся над поверхностью слизистой оболочки

При гистологическом исследовании ободочной кишки ВУ и НУ животных опытных групп во всех трех отделах наблюдалась картина хронического колита (рис. 3.5.4). Выявлена воспалительная инфильтрация из плазмоцитов, гистиоцитов и единичных нейтрофилов, наиболее выраженная в базальном отделе СПСО.

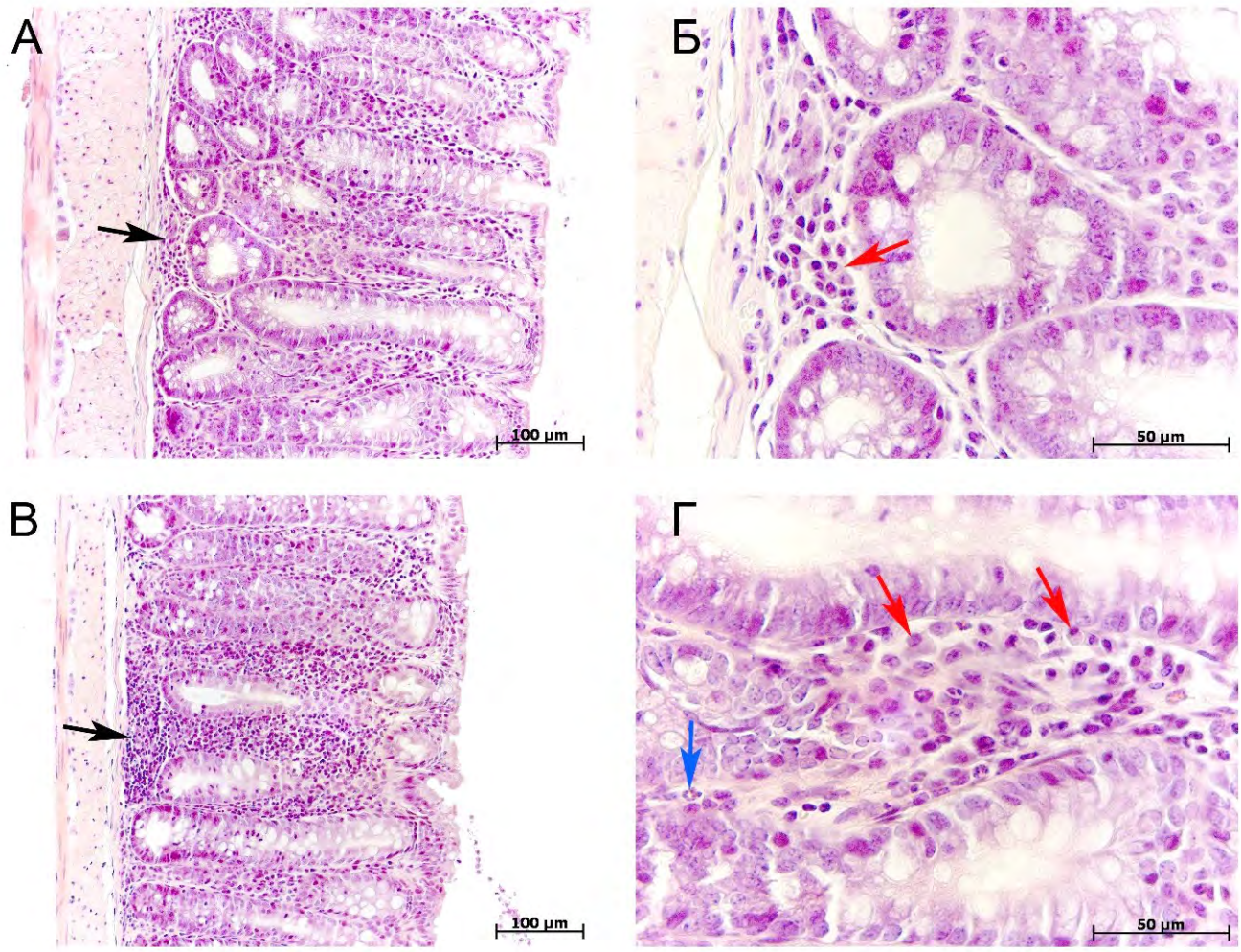


Рис. 3.5.4. Хронический колит в дистальном отделе ободочной кишки в зонах вне опухолей. А, Б – ВУ; В, Г – НУ. А – выраженная воспалительная инфильтрация в СПСО (черная стрелка); Б – в составе инфильтрата плазмоциты (красная стрелка); В – выраженная воспалительная инфильтрация в СПСО (черная стрелка); Г – в составе воспалительного инфильтрата плазмоциты (красные стрелки) и единичные нейтрофилы (синяя стрелка)

При микроскопическом исследовании дистального отдела ободочной кишки опухоли были выявлены у 65% ВУ (13 из 20) и у 69% НУ (9 из 13) мышей (табл. 3.5.3). В медиальном отделе ободочной кишки только у 2 ВУ и 1 НУ мыши выявлены опухоли, а в проксимальном отделе ободочной кишки как у ВУ, так и у НУ мышей опухоли не обнаружены. У 35% ВУ и 31% НУ животных опухоли во всех трех отделах ободочной кишки не выявлены.

Опухоли были представлены железистой интраэпителиальной неоплазией, а также аденокарциномами, частота их развития не различалась между ВУ и НУ мышами (табл. 3.5.3).

Таблица 3.5.3

Количество мышей с опухолями, частота развития железистой интраэпителиальной неоплазии и аденокарцином в дистальном отделе ободочной кишки через 70 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у ВУ и НУ мышей, p – статистическая значимость различий, точный тест Фишера

Группы наблюдения / **Развитие опухолей**	**ВУ (n=20)**	**НУ (n=13)**	**p**
Да	13 из 20 (65%)	9 из 13 (69%)	0,99
Нет	7 из 20 (35%)	4 из 13 (31%)	
Группы наблюдения / **Тип опухоли**	**ВУ (n=13)**	**НУ (n=9)**	**p**
Железистая интраэпителиальная неоплазия	9 (69%)	4 (44%)	0,38
Аденокарцинома	4 (31%)	5 (56%)	

При микроскопическом исследовании железистая интраэпителиальная неоплазия характеризовалась небольшими очагами укрупненных крипт, выстланных гиперхромными полиморфными клетками эпителия (рис. 3.5.5, А, Б, рис. 3.5.6, А, Б, синие стрелки). Все очаги железистой интраэпителиальной неоплазии располагались в пределах эпителиальной выстилки крипт. Наблюдалась воспалительная инфильтрация СПСО (рис. 3.5.5, А, Б, рис. 3.5.6, А, Б, черные стрелки).

Аденокарциномы были представлены опухолями с экзофитным ростом – в полость просвета кишки (рис. 3.5.5, В, Г, красные стрелки). Ни в одном из наблюдений не выявлено прорастания опухоли в подслизистую основу. Микроскопически опухоли были представлены множеством желез, выстланных пролиферирующим атипичным эпителием (рис. 3.5.6, В, Г, синие стрелки), выявлены крипт-абсцессы – просветы крипт заполнены слизью с большим количеством нейтрофилов. Наблюдалась выраженная воспалительная инфильтрация в соединительной ткани опухоли (рис. 3.5.5, В, рис. 3.5.6, В, Г, черные стрелки).

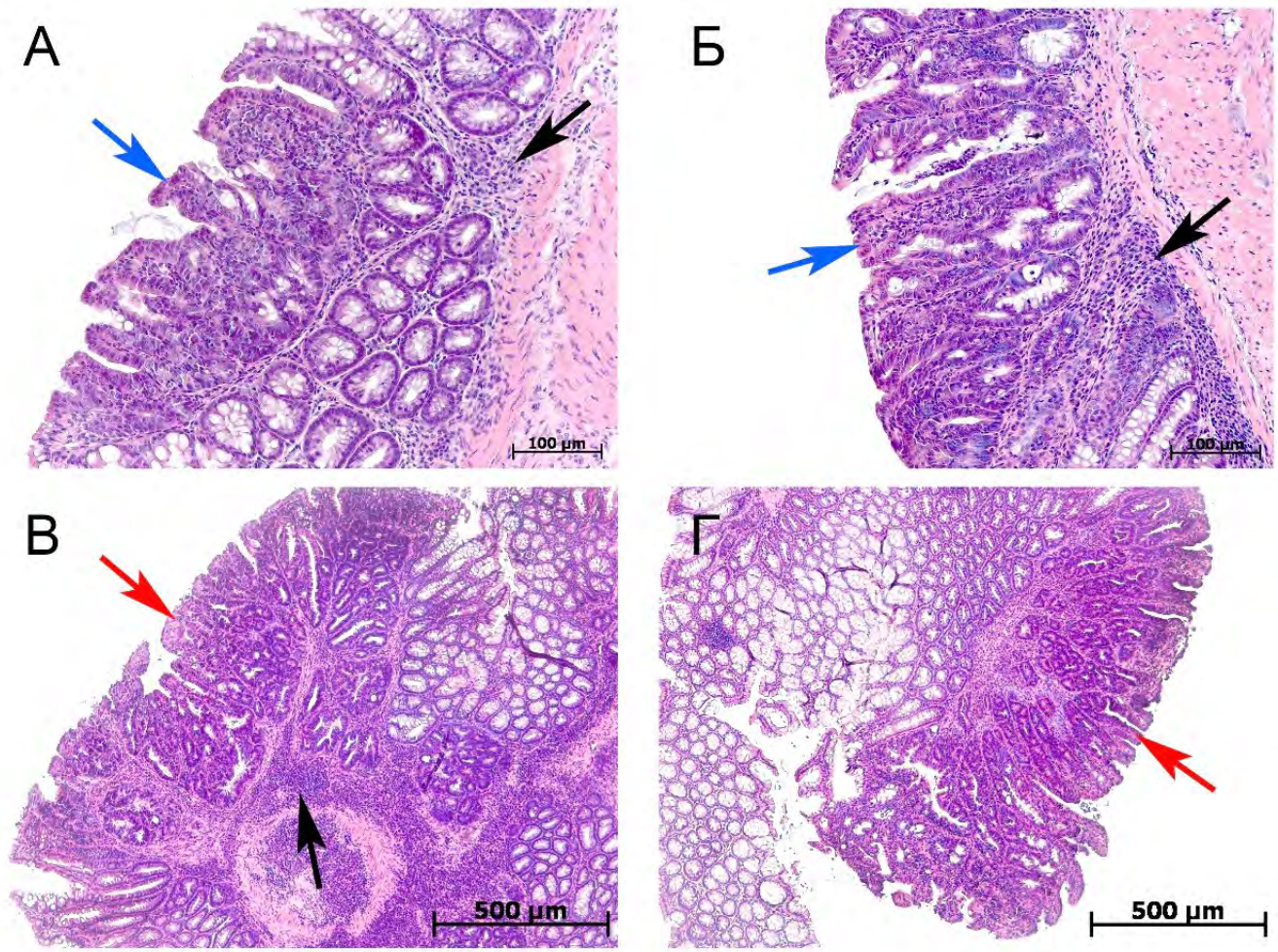


Рис. 3.5.5. Морфологическая характеристика дистального отдела ободочной кишки через 70 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у ВУ (А, В) и НУ (Б, Г) мышей. А, Б – железистая интраэпителиальная неоплазия (синие стрелки); В, Г – аденокарцинома (красные стрелки). Воспалительная инфильтрация в соединительной ткани опухоли (черные стрелки). Окраска гематоксилином и эозином

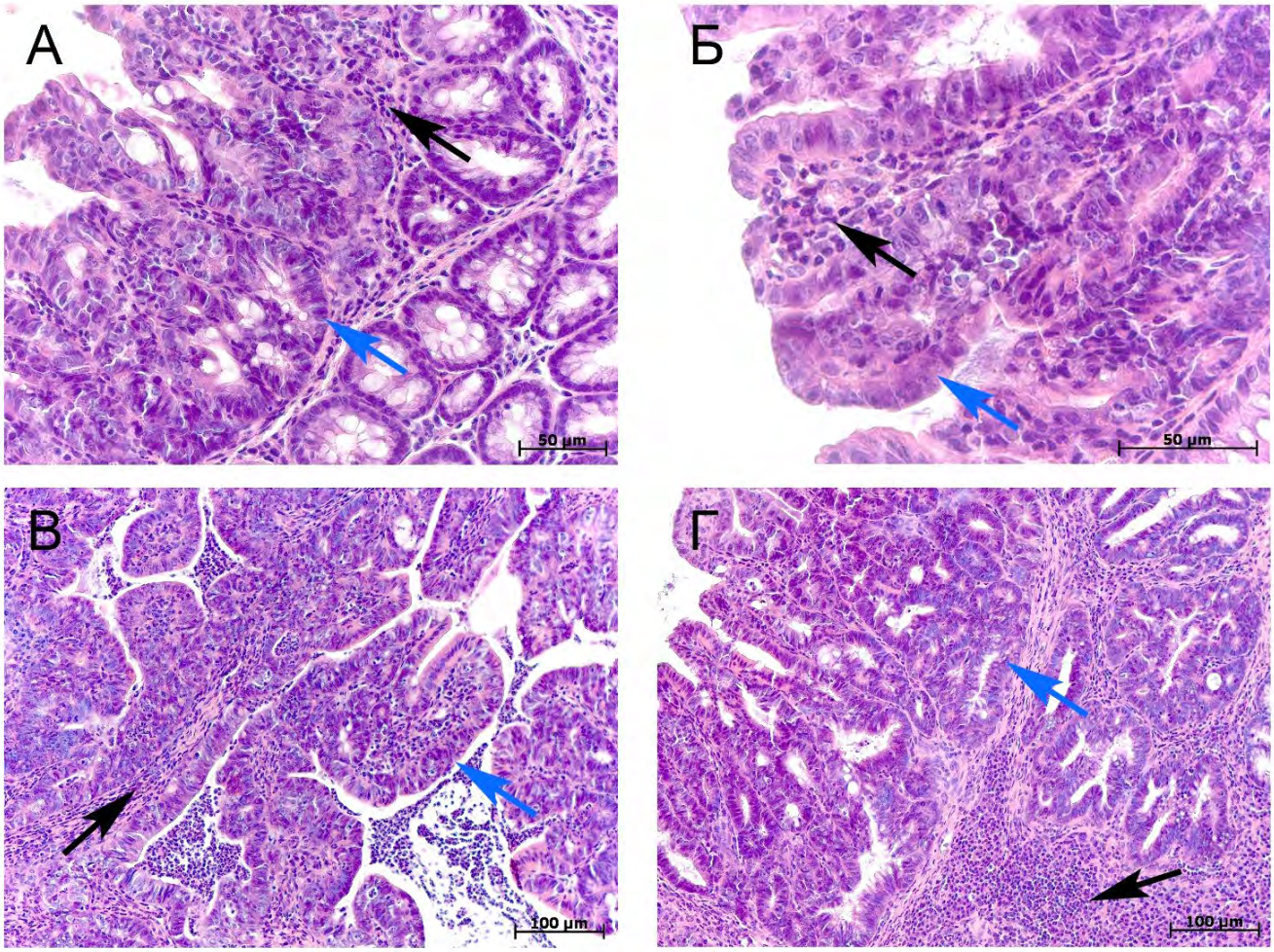


Рис. 3.5.6. Морфологическая характеристика дистального отдела ободочной кишки через 70 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у ВУ (А, В) и НУ (Б, Г) мышей. А, Б – железистая интраэпителиальная неоплазия, характеризующаяся небольшими очагами укрупненных крипт, выстланных гиперхромными полиморфными клетками эпителия (синие стрелки), воспалительная инфильтрация СПСО (черные стрелки); В, Г – аденокарцинома, характеризующаяся множеством желез, выстланных пролиферирующим атипичным эпителием (синие стрелки), воспалительная инфильтрация в соединительной ткани опухоли (черные стрелки). Окраска гематоксилином и эозином

По данным морфометрического исследования ступенчато-серийных гистологических срезов показатели площади опухолей в дистальном отделе ободочной кишки статистически значимо не различались (p=0,86) у ВУ и НУ животных (табл. 3.5.4).

Таблица 3.5.4

Площадь опухолей в дистальном отделе ободочной кишки через 70 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у ВУ и НУ мышей, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Группы наблюдения / **Параметр**	**ВУ (n=13)**	**НУ (n=9)**	**p**
Площадь опухолей, мм^2	1,45 (0,75-2,40)	1,62 (0,53-2,31)	0,86

Эндокринные клетки выявляли с помощью антител к компоненту секреторных гранул – хромогранину А. У ВУ и НУ животных как контрольных, так и опытных групп число хромогранин А-положительных клеток в слизистой оболочке ободочной кишки не различалось. В опытных группах в зонах опухолей как у ВУ, так и у НУ мышей по сравнению с контрольными группами содержание эндокринных клеток статистически значимо увеличивалось (табл. 3.5.5 Приложения 5, рис. 3.5.7, рис. 3.5.8).

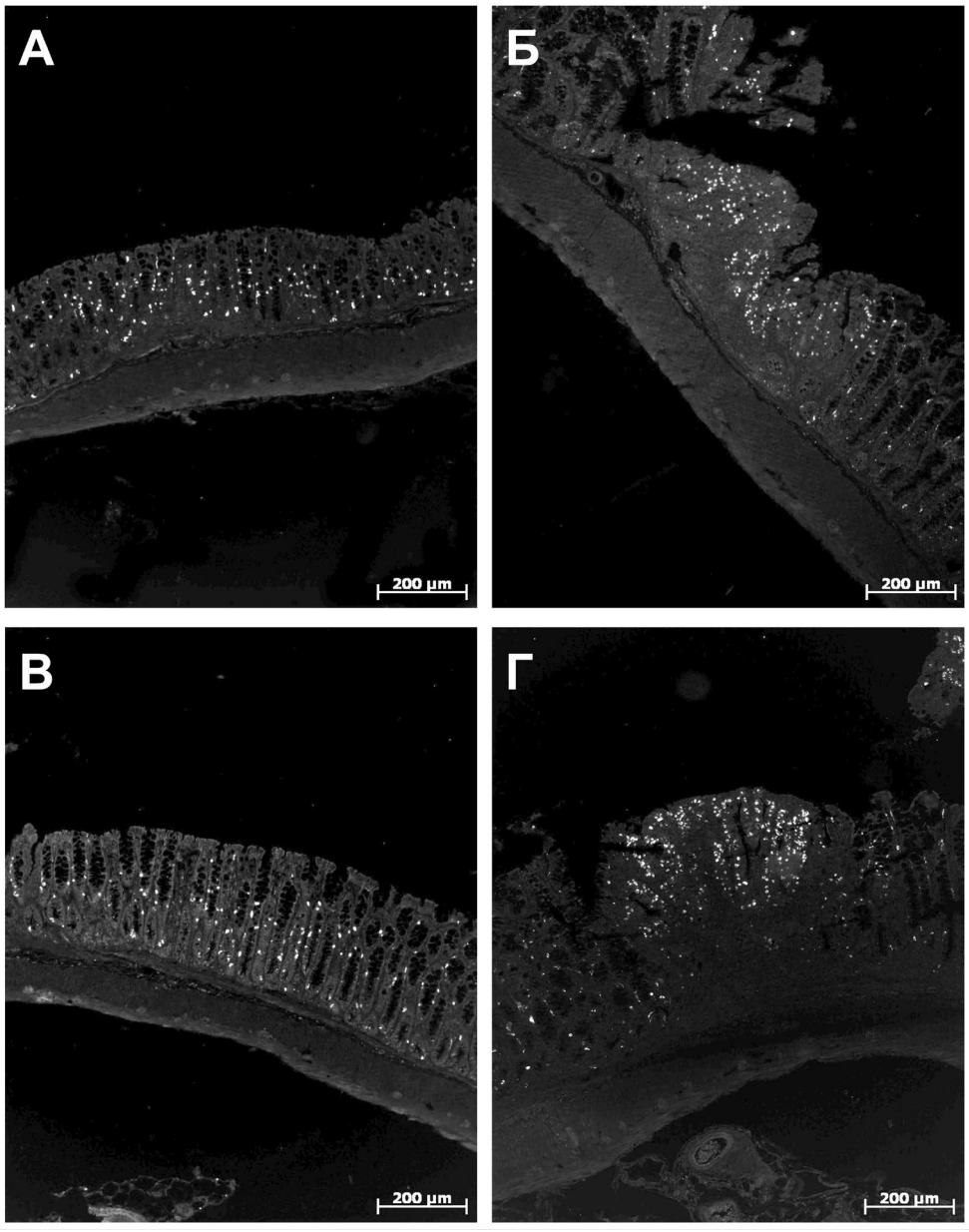


Рис. 3.5.7. Эндокринные клетки в дистальном отделе ободочной кишки у ВУ и НУ мышей контрольных групп (А, В) и в зонах неоплазии в опытных группах (Б, Г). А, Б – ВУ; В, Г – НУ. Иммунофлуоресцентная окраска с антителами к хромогранину А

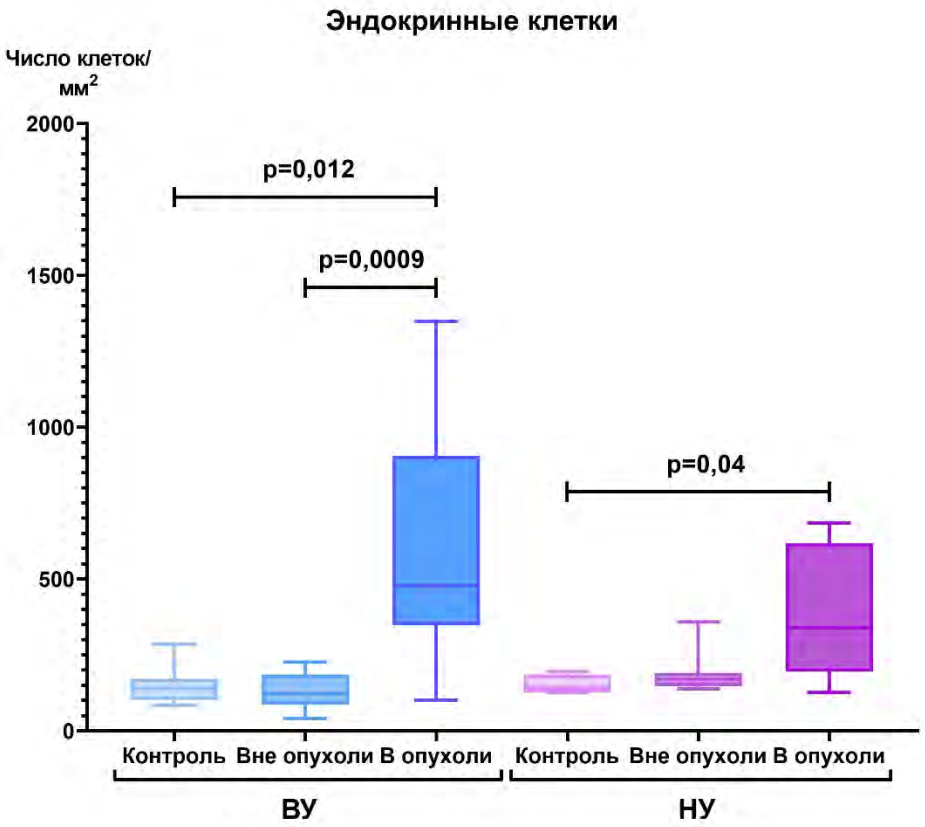


Рис. 3.5.8. Число эндокринных клеток в слизистой оболочке дистального отдела ободочной кишки у ВУ и НУ животных контрольных групп, мышей опытных групп в зонах вне опухоли и в опухоли, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

По данным гистохимического выявления бокаловидных клеток с помощью окраски альциановым синим в опухолях как у ВУ, так и у НУ мышей наблюдалось статистически значимое снижение объемной доли альциан-положительных бокаловидных клеток по сравнению с мышами контрольных групп (табл. 3.5.5 Приложения 5, рис. 3.5.9, 3.5.10).

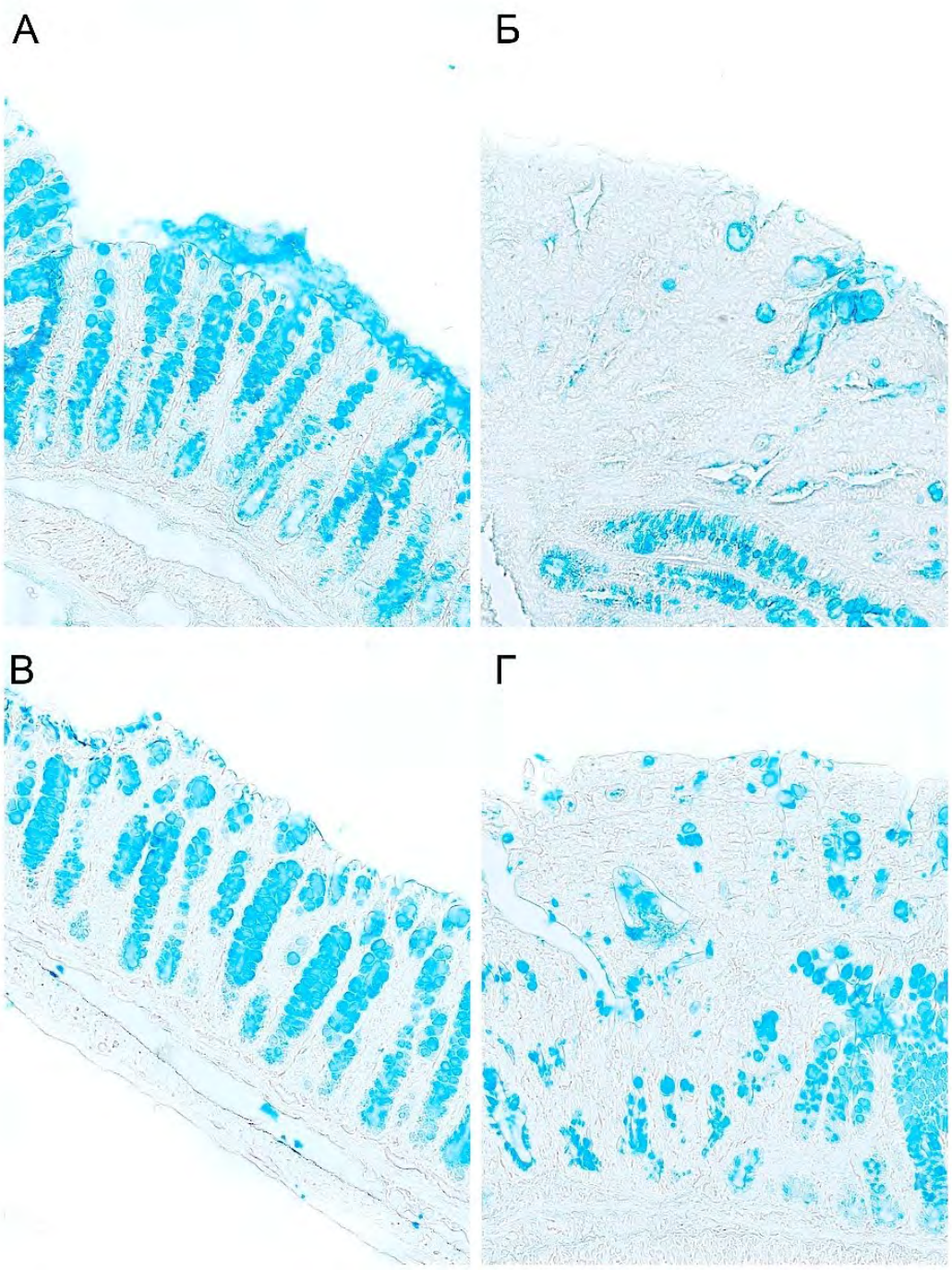


Рис. 3.5.9. Бокаловидные клетки в дистальном отделе ободочной кишки у ВУ и НУ мышей контрольных групп (А, В) и в зонах неоплазии в опытных группах (Б, Г). А, Б – ВУ; В, Г – НУ. Окраска альциановым синим

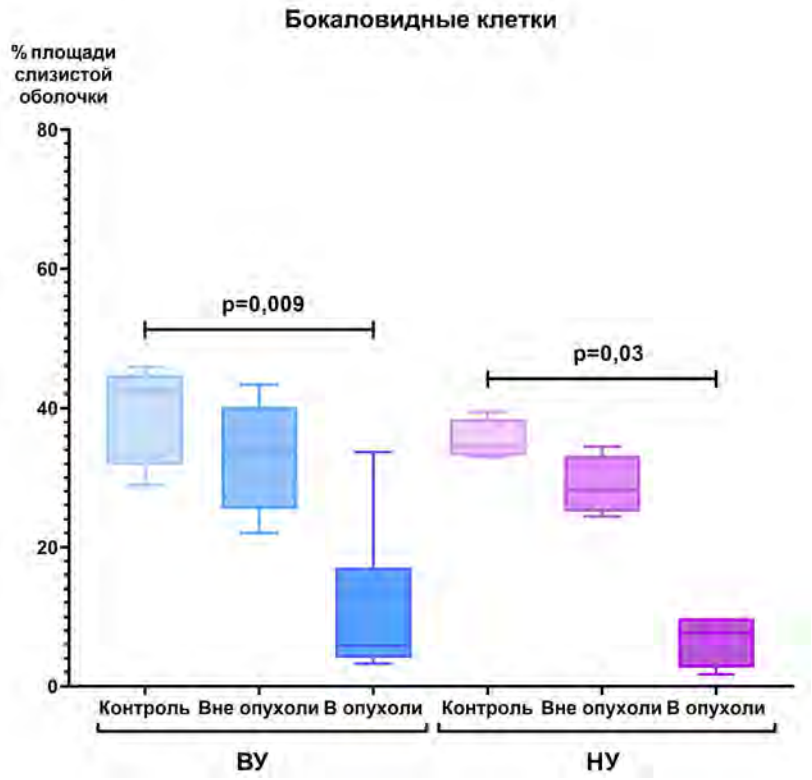


Рис. 3.5.10. Содержание бокаловидных клеток в слизистой оболочке дистального отдела ободочной кишки у ВУ и НУ животных контрольных групп, мышей опытных групп в зонах вне опухоли и в опухоли, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

При морфологическом исследовании в БЛУ (рис. 3.5.11) у ВУ и НУ мышей опытных групп патологических изменений не выявлено, метастазы не обнаружены.

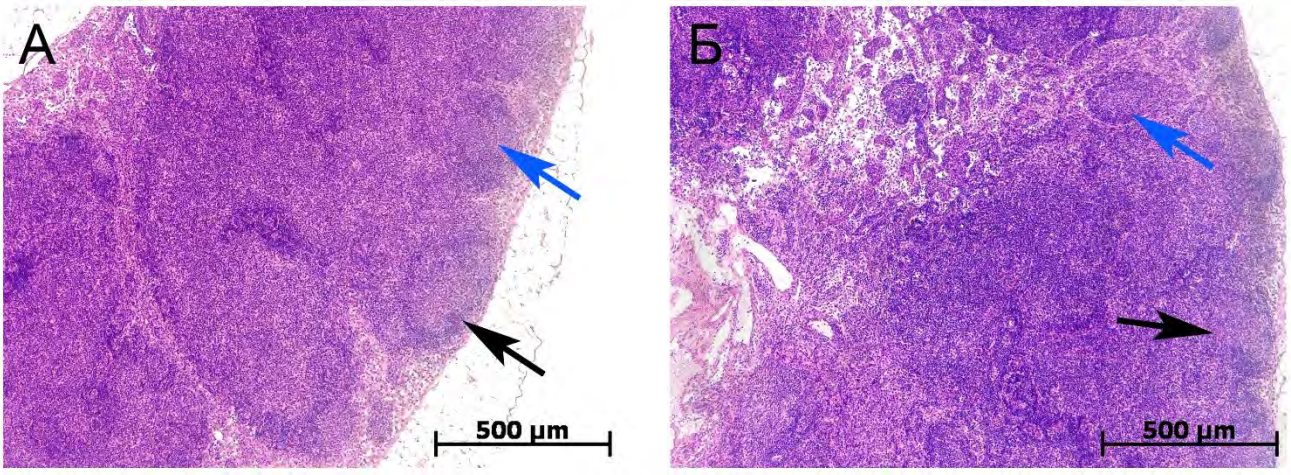


Рис. 3.5.11. Морфологическая характеристика брыжеечных лимфатических узлов через 70 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у ВУ (А) и НУ (Б) мышей. Как у ВУ, так и у НУ мышей лимфоидные узелки (черные стрелки) со светлыми центрами (синие стрелки). Метастазы не выявлены. Окраска гематоксилином и эозином

3.5.2. Клинический анализ крови через 70 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6

По данным клинического анализа крови в контрольной группе у НУ мышей по сравнению с ВУ были выше показатели количества лейкоцитов, абсолютного числа лимфоцитов и моноцитов (табл. 3.5.6 Приложения 5, рис. 3.5.12).

В опытных группах как у ВУ, так и у НУ мышей количество эритроцитов и содержание гемоглобина в крови снижались по сравнению с контрольными группами, при этом только у ВУ животных повышалось относительное количество моноцитов и их показатели были выше по сравнению с НУ. Только у НУ животных опытной группы по сравнению с контрольной снижалось абсолютное число лимфоцитов и моноцитов. Индексы LMR и NLR у ВУ и НУ животных как в контрольных, так и в опытных группах не различались, однако в контрольной группе НУ мышей по сравнению с ВУ в 1,3 раза был выше индекс SIRI (табл. 3.5.6 Приложения 5, рис. 3.5.13).

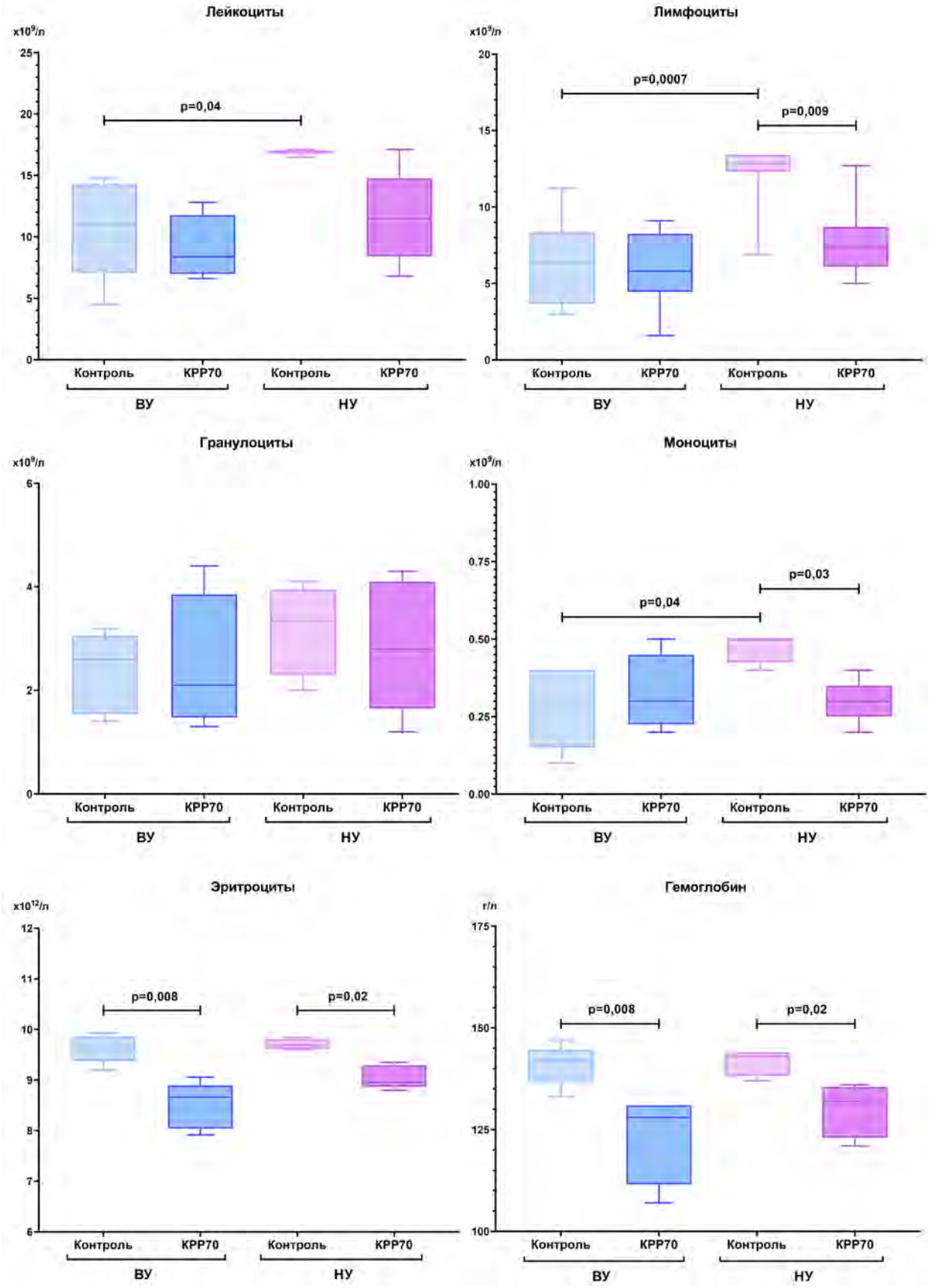


Рис. 3.5.12. Абсолютное число лейкоцитов, лимфоцитов, гранулоцитов, моноцитов, эритроцитов и содержание гемоглобина в крови в контрольных группах и при колоректальном раке (КРР70) у ВУ и НУ мышей, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

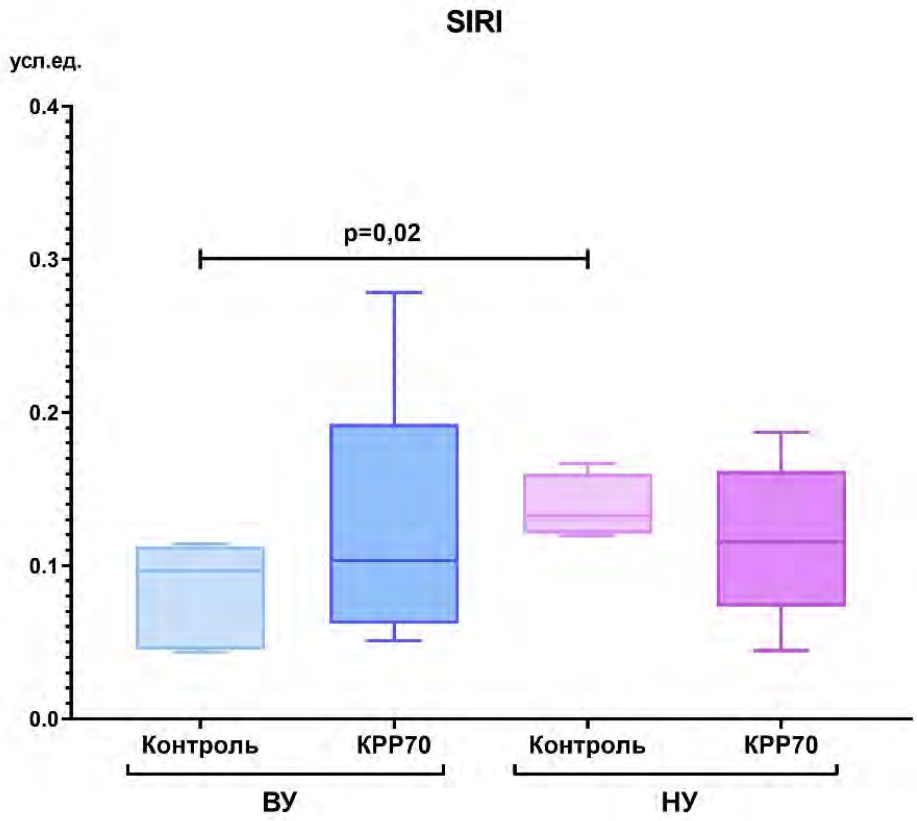


Рис. 3.5.13. Индекс SIRI в контрольных группах и при колоректальном раке (КРР70) у ВУ и НУ мышей, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Таким образом, через 70 сут после введения АОМ и потребления мышами трех циклов ДСН опухоли были представлены железистой интраэпителиальной неоплазией и аденокарциномами, а частота их развития и площадь не различались у ВУ и НУ мышей. Изменения числа эндокринных и бокаловидных клеток у животных с разной устойчивостью к гипоксии были сходными – наблюдалось увеличение числа эндокринных, но уменьшение содержания бокаловидных клеток в опухолях. Различия между ВУ и НУ мышами на данном сроке после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН выявлены только по показателям периферической крови. По сравнению с контрольными группами абсолютное количество эритроцитов и содержание гемоглобина у животных опытных групп снижалось как у ВУ, так и у НУ мышей, при этом только у ВУ животных – повышалось относительное количество моноцитов, а у НУ животных – снижалось абсолютное число лимфоцитов и моноцитов. Для выявления возможных различий в темпах прогрессии опухолей у животных с разной устойчивостью к гипоксии проведено моделирование колит-ассоциированного КРР на более позднем сроке после введения АОМ – 140 сут.

3.5.3. Динамика массы тела, морфологическая характеристика дистального отдела ободочной кишки, частота развития и площадь опухолей через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6

При клиническом наблюдении за животными, получавшими однократно АОМ и три цикла ДСН, через 140 сут после начала эксперимента как у ВУ, так и у НУ мышей отмечалась диарея с примесью крови. Максимальные клинические проявления колита выявлены после первого цикла потребления ДСН. Тем не менее, снижения массы тела по сравнению с началом эксперимента после потребления трех циклов ДСН не обнаружено, а к концу эксперимента масса тела увеличивалась как у ВУ, так и у НУ мышей, но была ниже по сравнению с животными контрольных групп (табл. 3.5.7, табл. 3.5.8). Гибели животных в течение эксперимента не наблюдалось.

Таблица 3.5.7

Показатели массы тела у ВУ и НУ мышей контрольных и опытных групп до и через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

Группы наблюдения	**Масса тела, г**				**p**
	Контрольные группы		**Опытные группы**		
	0-е сут (до начала эксперимента)[1]	**140-е сут[2]**	**0-е сут (до начала эксперимента)[3]**	**140-е сут[4]**	
ВУ	22,0 (21,0-22,0)	27,5 (26,0-28,0)	21,0 (21,0-22,0)	24,0 (24,0-25,0)	**0,0003**$^{1-2}$ 0,94$^{1-3}$ **0,0004**$^{2-4}$ **0,000003**$^{3-4}$
НУ	23,5 (22,0-24,5)	26,5 (25,5-27,5)	22,0 (21,5-24,0)	24,0 (24,0-25,0)	**0,04**$^{1-2}$ 0,70$^{1-3}$ **0,02**$^{2-4}$ **0,02**$^{3-4}$
p (ВУ-НУ)	0,12	0,47	0,13	0,83	

Таблица 3.5.8

Показатели массы тела в разные сроки после введения АОМ до 140 сут эксперимента у ВУ и НУ мышей, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

Группы наблюдения	**Масса тела в разные сроки эксперимента, г**								**p<0,05**
	0-е сут (до начала эксперимента)	**8-е сут**	**15-е сут**	**29-е сут**	**36-е сут**	**50-е сут**	**55-е сут**	**140-е сут**	
ВУ (n=17)	21,0 (21,0-22,0)	22,0 (21,0-23,0)	23,0 (22,0-24,0)	22,5 (21,0-25,0)	23,0 (22,0-24,0)	23,0 (22,0-24,0)	23,0 (23,0-25,0)	24,0 (24,0-25,0)	**0,001**$^{0\text{-}15}$ **0,003**$^{0\text{-}36}$ **0,0004**$^{0\text{-}50}$ **0,0003**$^{0\text{-}55}$ **0,0001**$^{0\text{-}140}$ **0,002**$^{8\text{-}140}$
НУ (n=10)	22,0 (21,5-24,0)	23,0 (22,0-24,0)	23,0 (22,0-25,0)	24,0 (24,0-25,0)	23,0 (22,0-24,0)	23,0 (22,0-24,0)	23,0 (23,0-24,0)	24,0 (24,0-25,0)	**0,02**$^{0\text{-}29}$ **0,02**$^{0\text{-}140}$
p (ВУ-НУ)	0,13	0,08	0,69	0,07	0,89	0,94	0,64	0,83	

При гистологическом исследовании во всех трех отделах ободочной кишки наблюдалась картина хронического колита: в слизистой оболочке определялись единичные эпителизированные язвы, крипты были деформированы, просветы их расширены, отмечались крипт-абсцессы. Наблюдалась воспалительная инфильтрация из лимфоцитов, макрофагов и плазмоцитов, наиболее выраженная в базальном отделе СПСО. 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 (табл. 3.5.9, рис. 3.5.14).

В дистальном отделе ободочной кишки опухоли у ВУ мышей были представлены железистой интраэпителиальной неоплазией, а также аденокарциномами, а у НУ животных – только аденокарциномами. Частота развития аденокарцином в дистальном отделе ободочной кишки была статистически значимо выше (p=0,0014) у НУ животных (табл. 3.5.9). В медиальном отделе ободочной кишки у 2 ВУ животных обнаружена железистая интраэпителиальная неоплазия, а у 1 НУ мыши – аденокарцинома. В проксимальном отделе ободочной кишки как у ВУ, так и у НУ животных опухоли не выявлены.

Таблица 3.5.9

Количество мышей с опухолями, частота развития железистой интраэпителиальной неоплазии и аденокарцином в дистальном отделе ободочной кишки через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у ВУ и НУ мышей, p – статистическая значимость различий, точный тест Фишера

Группы наблюдения / **Развитие опухолей**	**ВУ (n=17)**	**НУ (n=10)**	**p**
Да	7 из 17 (41%)	8 из 10 (80%)	0,11
Нет	10 из 17 (59%)	2 из 10 (20%)	
Группы наблюдения / **Тип опухолей**	**ВУ (n=7)**	**НУ (n=8)**	**p**
Железистая интраэпителиальная неоплазия	6 из 7 (86%)	0 из 8 (0%)	**0,0014**
Аденокарцинома	1 из 7 (14%)	8 из 8 (100%)	

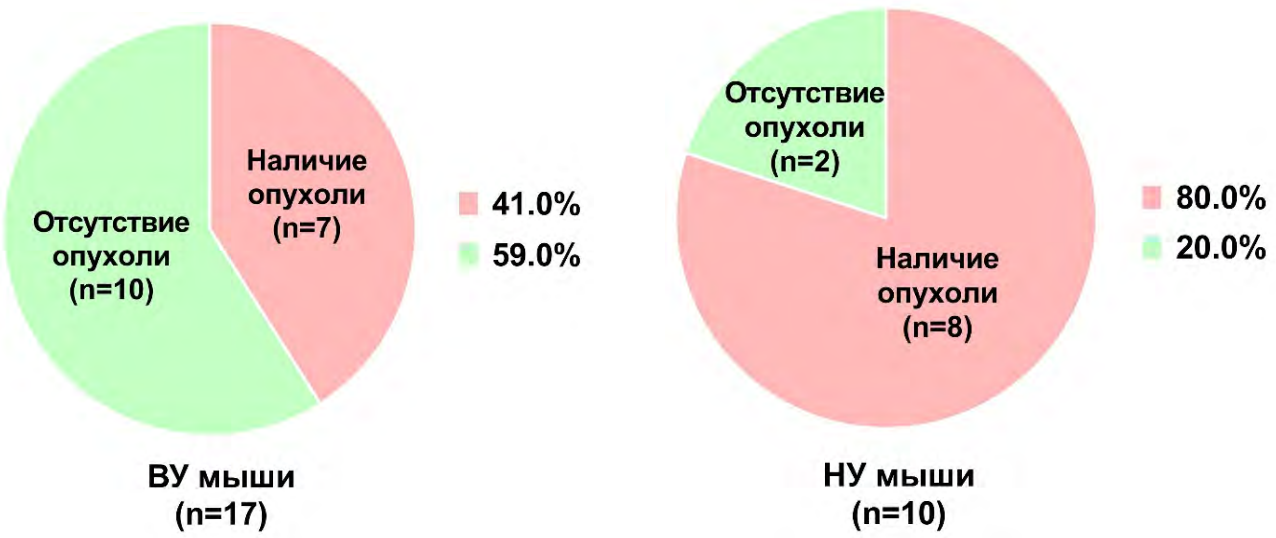


Рис. 3.5.14. Частота развития опухолей в дистальном отделе ободочной кишки через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у ВУ и НУ мышей

При морфологическом исследовании гистологических срезов 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. 3.5.15, А, Б, зеленые стрелки). Много бокаловидных клеток. Среди рыхлой волокнистой соединительной ткани СПСО обнаружено небольшое количество диффузно рассеянных клеточных элементов – лимфоцитов, гистиоцитов и единичных плазмоцитов. Подслизистая основа узкая, в ней небольшое количество клеток. Между ВУ и НУ животными контрольных групп по морфологическим особенностям ободочной кишки различий не выявлено.

При микроскопическом исследовании железистая интраэпителиальная неоплазия (рис. 3.5.15, В, рис. 3.5.16, А, синие стрелки) характеризовалась скоплениями нескольких крипт с расширенными и деформированными просветами, выстланных полиморфными атипичными клетками эпителия с гиперхромными ядрами. Все очаги железистой интраэпителиальной неоплазии располагались в пределах эпителиальной выстилки крипт. Наблюдалась воспалительная инфильтрация СПСО (рис. 3.5.15, В, черная стрелка).

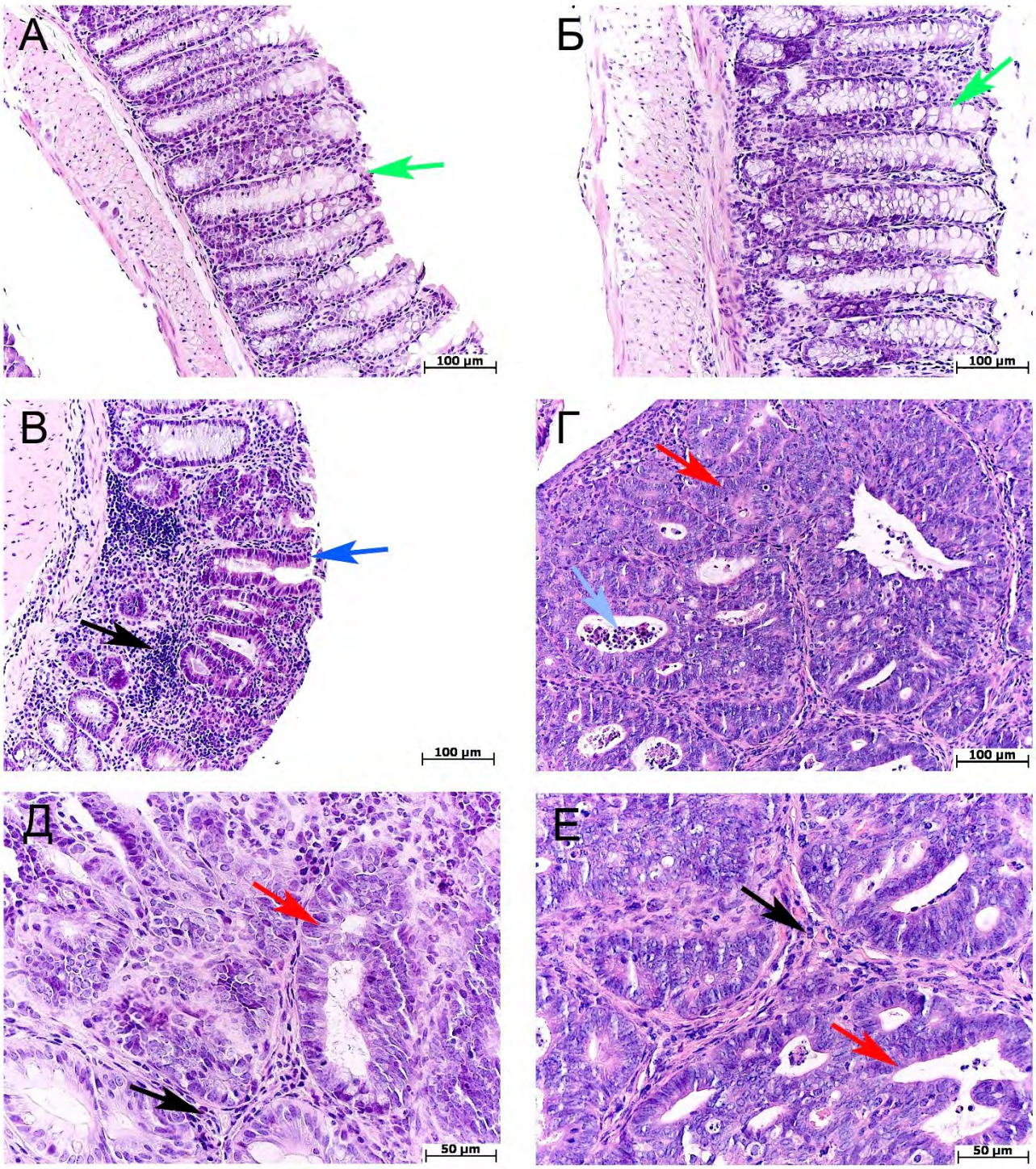


Рис. 3.5.15. Морфологическая характеристика дистального отдела ободочной кишки у ВУ и НУ мышей контрольных (А, Б) и опытных групп через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН (В-Е). А, В, Д – ВУ; Б, Г, Е – НУ. А, Б – эпителиальная выстилка сохранена, крипты глубокие и узкие (зеленые 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

Аденокарциномы (рис. 3.5.15, Г-Е, рис. 3.5.16, Б) были представлены опухолями с экзофитным ростом. Ни в одном из наблюдений не было выявлено прорастания опухоли в подслизистую основу. Микроскопически опухоли были представлены множеством желез, выстланных пролиферирующим атипичным эпителием (рис. 3.5.15, Г-Е, рис. 3.5.16, Б, красные стрелки), определялись крипт-абсцессы – просветы крипт были расширены и заполнены слизью с большим количеством нейтрофилов. Строма опухолей была представлена соединительной тканью с частично упорядоченно расположенными тонкими волокнами, отмечалась диффузная инфильтрация соединительной ткани нейтрофилами, лимфоцитами и гистиоцитами (рис. 3.5.15, Д, Е, рис. 3.5.17, черные стрелки).

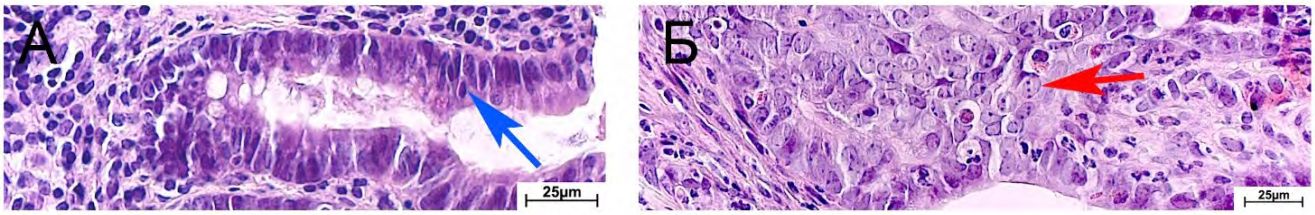


Рис. 3.5.16. Морфологическая характеристика дистального отдела ободочной кишки у ВУ и НУ мышей через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН. А – ВУ, Б – НУ; А – железистая интраэпителиальная неоплазия, атипичные клетки с гиперхромными ядрами, располагаются в пределах эпителиального пласта (синяя стрелка); Б – аденокарцинома, выраженная тканевая и клеточная атипия (красная стрелка)

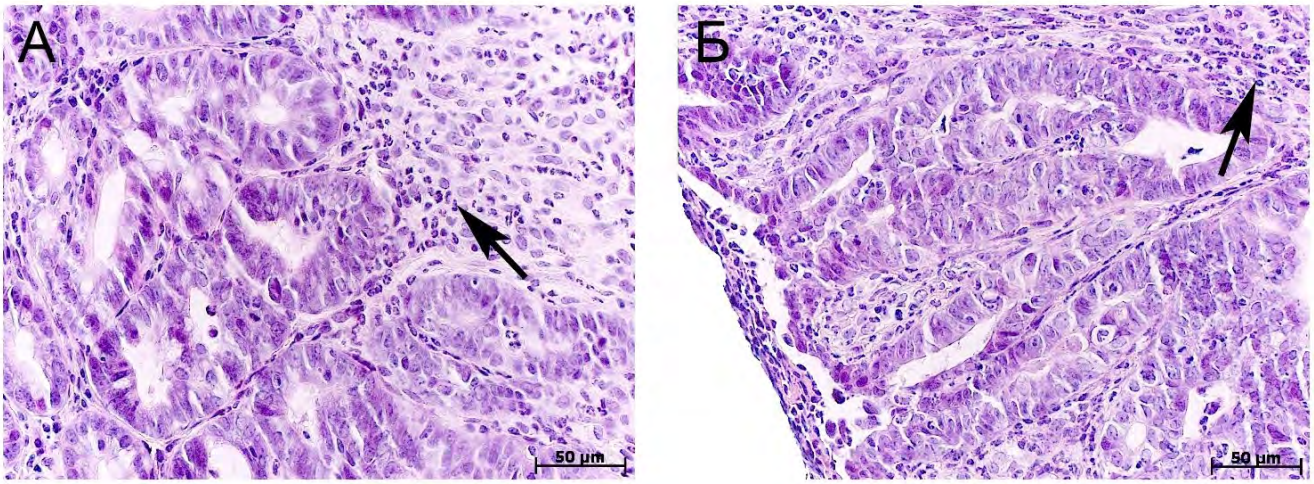


Рис. 3.5.17. Морфологическая характеристика дистального отдела ободочной кишки у ВУ (А) и НУ (Б) мышей через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН. Аденокарциномы, выраженная перитуморальная воспалительная инфильтрация из нейтрофилов, лимфоцитов и гистиоцитов (черные стрелки)

По данным морфометрического исследования ступенчато-серийных гистологических срезов показатели площади опухолей в дистальном отделе ободочной кишки у НУ мышей были в 14,5 раз выше по сравнению с ВУ (табл. 3.5.10, рис. 3.5.18).

Таблица 3.5.10

Площадь опухолей в дистальном отделе ободочной кишки через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у ВУ и НУ мышей, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Группы наблюдения / **Параметр**	**ВУ (n=7)**	**НУ (n=8)**	**p**
Площадь опухолей, мм^2	0,27 (0,05-2,29)	3,92 (2,86-11,59)	**0,02**

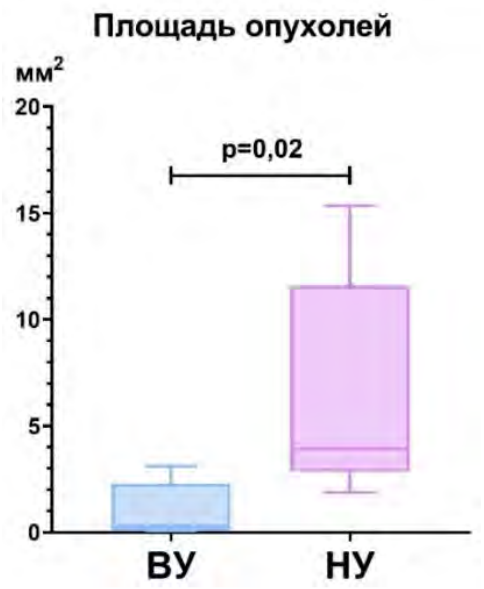


Рис. 3.5.18. Площадь опухолей в дистальном отделе ободочной кишки через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у ВУ (n=7) и НУ (n=8) мышей, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

3.5.4. Уровни экспрессии генов и иммуногистохимическое исследование в перитуморальной зоне и в опухолях дистального отдела ободочной кишки через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6

Гены, регулирующие ответ на гипоксию – Hif1a, Epas1, Hif3a* и *Vegf

Уровни экспрессии генов *Hif1a* и *Hif3a* в дистальном отделе ободочной кишки в контрольной группе были выше у НУ мышей по сравнению с ВУ, а генов *Epas1* и *Vegf* – статистически значимо не различались (табл. 3.5.11 Приложения 5, рис. 3.5.19).

В опытных группах животных оценивали экспрессию генов в тканях опухоли и перитуморальной зоны. В тканях опухоли по сравнению с контрольной группой у ВУ мышей уровни экспрессии генов *Epas1* и *Vegf* были ниже. В перитуморальной зоне по сравнению с опухолью у ВУ мышей уровни экспрессии генов *Hif1a*, *Epas1* и *Hif3a* были статистически значимо выше (табл. 3.5.11 Приложения 5, рис. 3.5.19).

В опухолях по сравнению с контрольной группой у НУ мышей был выше уровень экспрессии гена *Vegf*, но ниже – *Hif3a*, а уровни экспрессии генов *Hif1a* и *Epas1* не различались. Уровни экспрессии генов *Hif3a* и *Vegf* в опухолях были выше у НУ животных по сравнению с ВУ (табл. 3.5.11 Приложения 5, рис. 3.5.19).

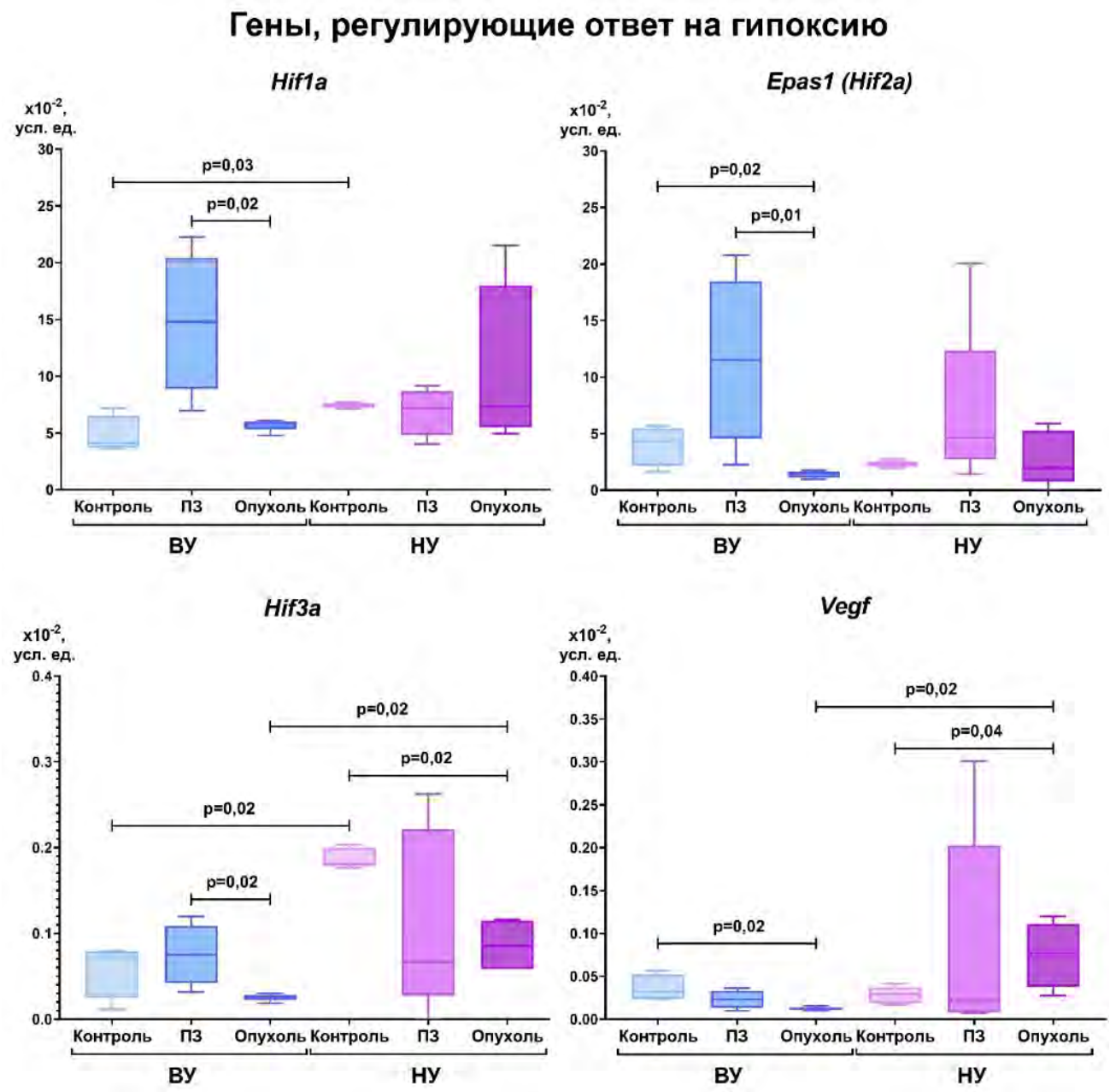


Рис. 3.5.19. Уровни экспрессии генов *Hif1a*, *Epas1*, *Hif3a* и *Vegf* в дистальном отделе ободочной кишки у ВУ и НУ мышей контрольных групп и через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни. ПЗ – ткань перитуморальной зоны у мышей опытных групп

Гены, регулирующие воспалительный ответ – Nfkb, Tnfa, Il1b, Il6, Il10 и Tgfb

В дистальном отделе ободочной кишки у НУ мышей контрольной группы по сравнению с ВУ были выше уровни экспрессии генов *Nfkb* и *Il10* (табл. 3.5.12, 3.5.13 Приложения 5, рис. 3.5.20).

По сравнению с контрольной группой у ВУ животных наблюдалось увеличение уровней экспрессии генов *Nfkb* и *Il1b* в опухолях, *Il1b* и *Il10* – в перитуморальной зоне. При этом у ВУ мышей уровни экспрессии генов *Il10* и *Tgfb* в перитуморальной зоне были статистически значимо выше по сравнению с тканью опухоли (табл. 3.5.12, 3.5.13 Приложения 5, рис. 3.5.20).

По сравнению с контрольной группой у НУ мышей наблюдалось увеличение уровней экспрессии генов *Tnfa* и *Il6* в опухоли, а также *Il1b* как в опухоли, так и в перитуморальной зоне. По сравнению с ВУ у НУ мышей в опухолях был выше уровень экспрессии гена провоспалительного цитокина *Tnfa* и противовоспалительных *Il10* и *Tgfb* (табл. 3.5.12, 3.5.13 Приложения 5, рис. 3.5.20).

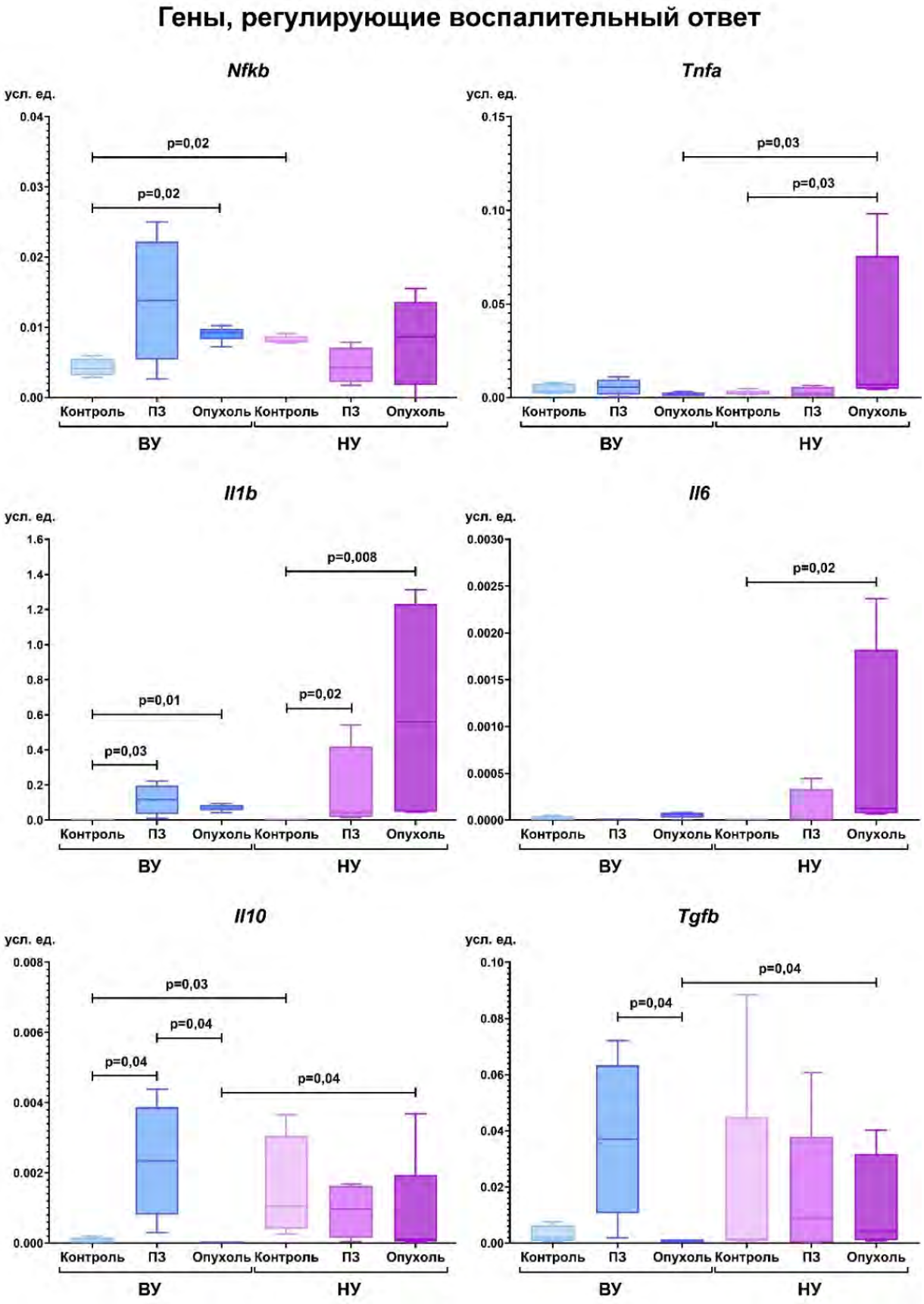


Рис. 3.5.20. Уровни экспрессии генов *Nfkb, Tnfa, Il1b, Il6, Il10* и *Tgfb* в дистальном отделе ободочной кишки у ВУ и НУ мышей контрольных групп и через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни. ПЗ – ткань перитуморальной зоны у мышей опытных групп

Гены, регулирующие клеточный цикл – Trp53, Pten, Egf, Egfr, Cmet, Mki67* и *Pcna

В дистальном отделе ободочной кишки у НУ мышей контрольной группы по сравнению с ВУ был выше уровень экспрессии гена *Trp53*, но ниже – *Pten, Egfr* и *Cmet*. По сравнению с контрольной группой у ВУ животных в опухоли повышались уровни экспрессии генов *Trp53* и *Pten*, а уровень экспрессии *Cmet* в перитуморальной зоне был выше, чем в опухоли. Уровни экспрессии генов *Egf*, *Egfr, Cmet*, *Mki67* и *Pcna* у ВУ животных в опухолях и перитуморальной зоне не отличались от контрольной группы (табл. 3.5.14 Приложения 5, рис. 3.5.21, рис. 3.5.22).

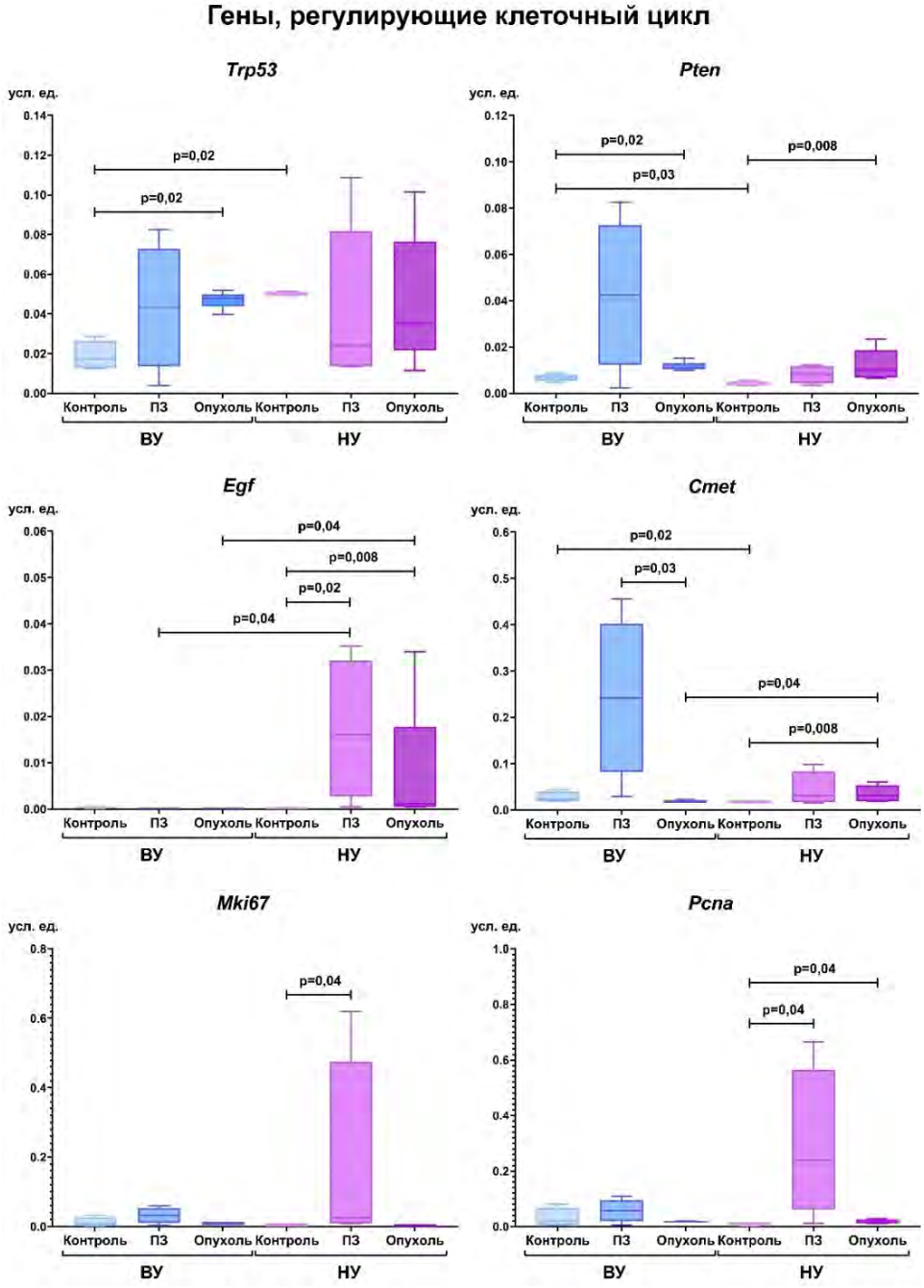


Рис. 3.5.21. Уровни экспрессии генов *Trp53, Pten, Egf, Cmet, Pcna* и *Mki67* в дистальном отделе ободочной кишки у ВУ и НУ мышей контрольных групп и через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни. ПЗ – ткань перитуморальной зоны у мышей опытных групп

По сравнению с контрольной группой у НУ мышей в опухолях выявлено увеличение уровней экспрессии генов *Pten*, *Egf, Egfr, Cmet* и *Pcna*, а в перитуморальной зоне – *Egf, Egfr, Mki67* и *Pcna.* По сравнению с ВУ в опухолях у НУ мышей были выше уровни экспрессии генов *Egf*, *Egfr* и *Cmet*, а в перитуморальной зоне – *Egf* (табл. 3.5.14 Приложения 5, рис. 3.5.21, 3.5.22). При выявлении белка EGFR более выраженная реакция обнаружена в опухолях у НУ животных по сравнению с ВУ (рис. 3.5.23, Г). По данным иммуногистохимического выявления белка Ki-67 более выраженная реакция обнаружена в перитуморальной зоне по сравнению с опухолями (рис. 3.5.24).

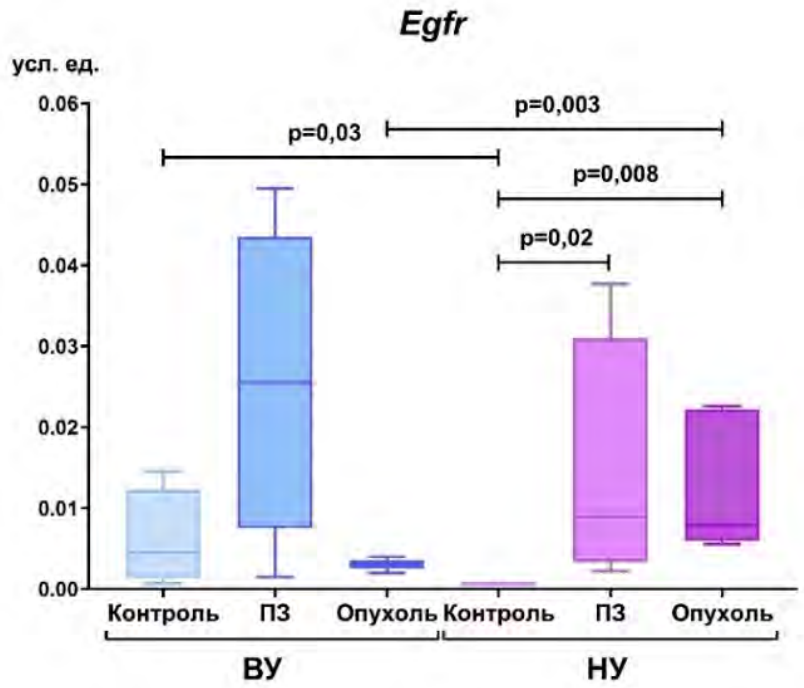


Рис. 3.5.22. Уровень экспрессии *Egfr* в дистальном отделе ободочной кишки у ВУ и НУ мышей контрольных групп и через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни. ПЗ – ткань перитуморальной зоны у мышей опытных групп

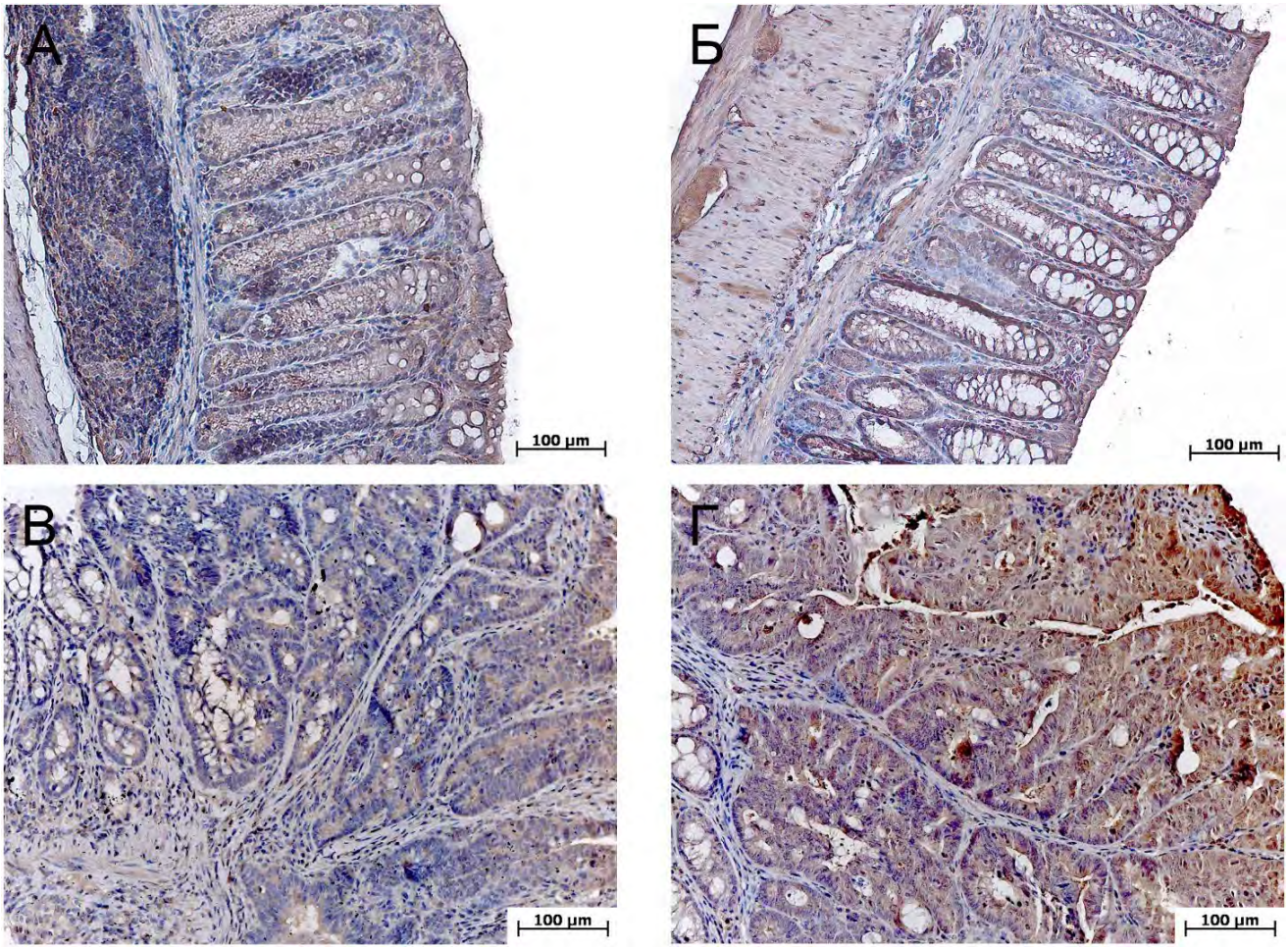


Рис. 3.5.23. Иммуногистохимическое выявление белка EGFR в дистальном отделе ободочной кишки у ВУ (А, В) и НУ (Б, Г) мышей. А, Б – контрольные группы, реакция слабо выражена; В – аденокарцинома, реакция слабо выражена; Г – аденокарцинома, реакция выражена. Иммуногистохимическая реакция с антителами к EGFR, докрашивание гематоксилином

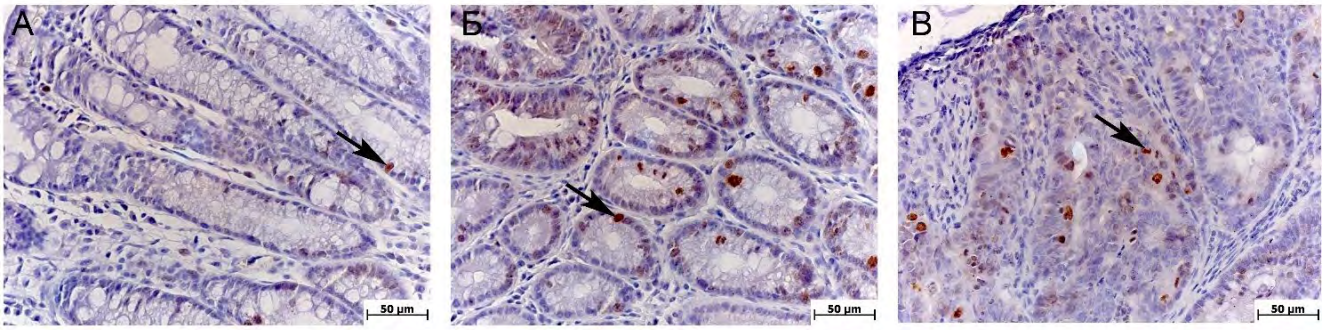


Рис. 3.5.24. Иммуногистохимическое выявление белка Ki-67 (черные стрелки) у мышей C57Bl/6 через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН. А – области вне опухолей, единичные Ki-67+ клетки; Б – перитуморальная зона, многочисленные эпителиальные клетки с иммунопозитивной реакцией Ki-67; В – область измененного эпителия, в опухоли многочисленные Ki-67+ клетки. Иммуногистохимическая реакция с антителами к Ki-67, докрашивание гематоксилином

Гены, регулирующие апоптоз – Bax и Bcl2

В дистальном отделе ободочной кишки у НУ мышей контрольной группы по сравнению с ВУ был выше уровень экспрессии *Bax*, но ниже – *Bcl2.* По сравнению с контрольной группой у ВУ животных в перитуморальной зоне повышался уровень экспрессии гена *Bcl2* и был выше по сравнению с опухолью.

По сравнению с контрольной группой у НУ мышей уровень экспрессии *Bcl2* был выше в тканях опухоли и перитуморальной зоны. По сравнению с ВУ у НУ мышей в опухолях уровень экспрессии гена *Bax* был статистически значимо выше, а *Bcl2* не различался (табл. 3.5.15 Приложения 5, рис. 3.5.25). Соотношение *Bax*/*Bcl2* было выше у НУ мышей контрольной группы по сравнению с ВУ. При оценке показателя в динамике, после моделирования колит-ассоциированного КРР, его статистически значимое снижение наблюдалось только у НУ мышей (табл. 3.5.15 Приложения 5, рис. 3.5.25).

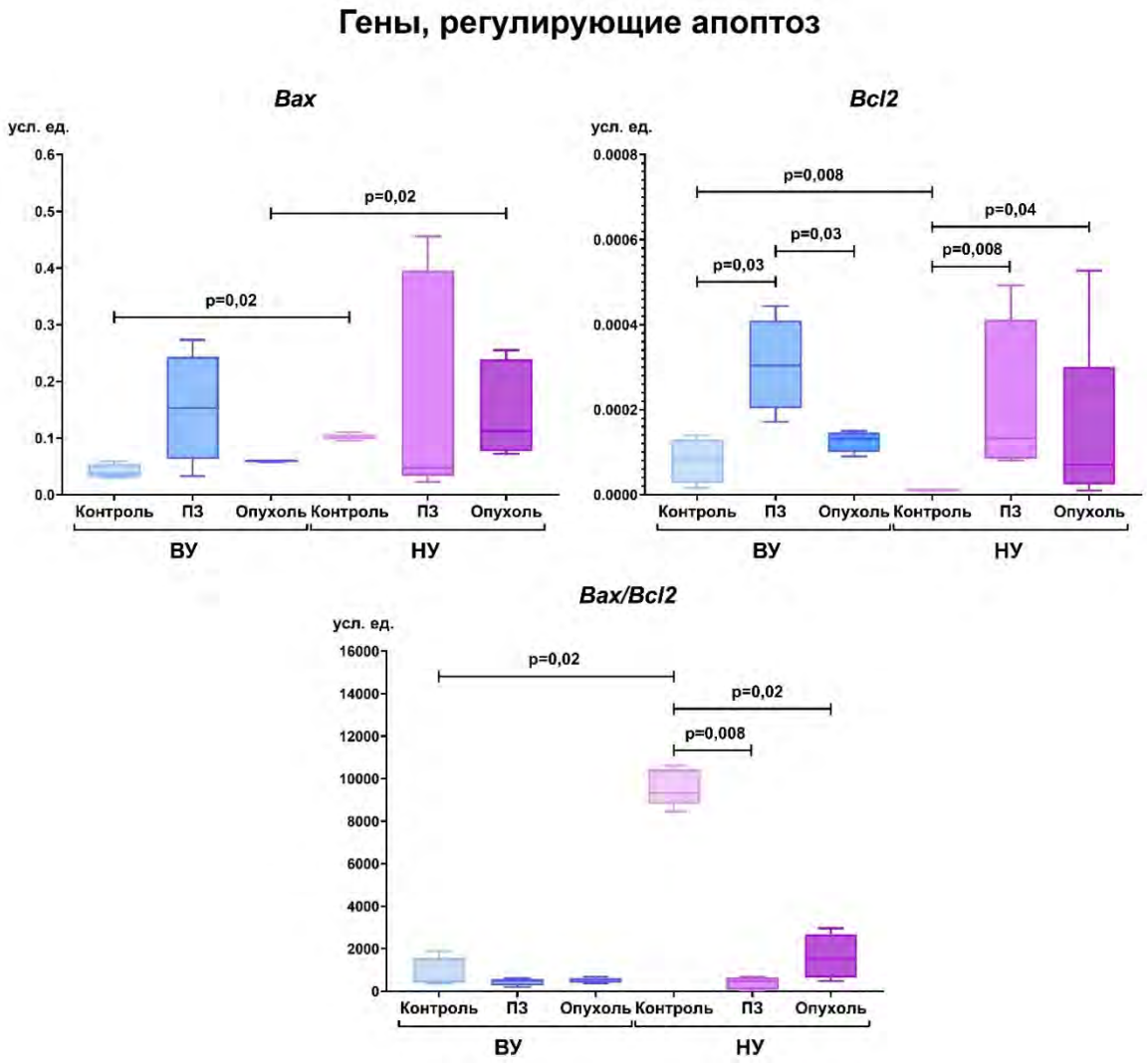


Рис. 3.5.25. Уровни экспрессии генов *Bax, Bcl2* и соотношение *Bax*/*Bcl2* в дистальном отделе ободочной кишки у ВУ и НУ мышей контрольных групп и через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни. ПЗ – ткань перитуморальной зоны у мышей опытных групп

Гены, кодирующие компоненты эпителиального барьера – Muc1, Muc13, Cldn2* и *Cldn7

В дистальном отделе ободочной кишки у НУ мышей контрольной группы по сравнению с ВУ был выше уровень экспрессии *Cldn2*, но ниже – *Muc1*, *Muc13* и *Cldn7* (табл. 3.5.16 Приложения 5, рис. 3.5.26).

По сравнению с контрольной группой у ВУ животных в опухолях выявлено снижение уровня экспрессии *Muc13* и увеличение экспрессии *Cldn2*. Уровень экспрессии *Muc13* в перитуморальной зоне был выше по сравнению с опухолью, но не отличался от контрольной группы (табл. 3.5.16 Приложения 5, рис. 3.5.26).

По сравнению с контрольной группой у НУ мышей в опухолях выявлено увеличение экспрессии *Muc1* и снижение экспрессии *Muc13*, а в перитуморальной зоне – увеличение экспрессии и *Muc1*, и *Muc13*. По сравнению с ВУ мышами в опухолях у НУ животных уровни экспрессии *Muc1* и *Cldn7* были выше (табл. 3.5.16 Приложения 5, рис. 3.5.26).

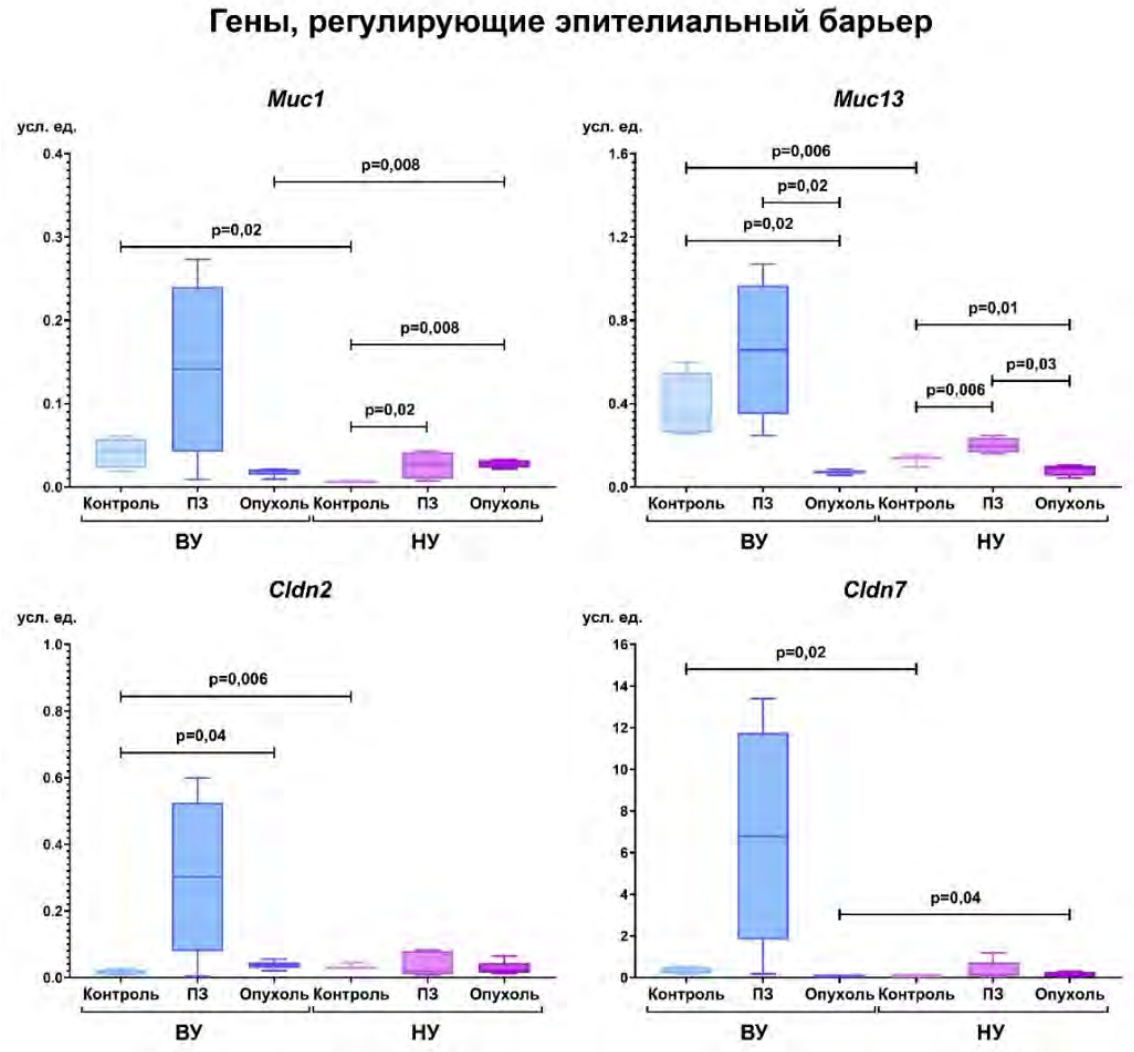


Рис. 3.5.26. Уровни экспрессии генов *Muc1*, *Muc13*, *Cldn2* и *Cldn7* в дистальном отделе ободочной кишки у ВУ и НУ мышей контрольных групп и через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни. ПЗ – ткань перитуморальной зоны у мышей опытных групп

3.5.5. Содержание HIF-1α и СРБ в сыворотке крови через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6

По результатам ИФА содержание HIF-1α в сыворотке крови в контрольной группе у НУ мышей было в 1,5 раза выше по сравнению с ВУ. При этом в опытных группах различий выявлено не было (табл. 3.5.17, рис. 3.5.27).

По содержанию С-реактивного белка различий как между контрольными и опытными группами, так и ВУ и НУ животными не выявлено (табл. 3.5.17).

Таблица 3.5.17

Содержание HIF-1α и СРБ в сыворотке крови у ВУ и НУ мышей контрольных групп и через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Группы наблюдения / **Параметры**	**Контрольные**		**Опытные**		**p**
	ВУ[1] (n=5)	**НУ[2] (n=5)**	**ВУ[3] (n=7)**	**НУ[4] (n=8)**	
Белок HIF-1α, пг/мл	629,0 (507,4-759,4)	962,0 (907,4-1002,0)	1107,0 (345,1-1649,0)	1105,0 (634,5-1305,0)	**0,008**[1-2]; 0,83[3-4] 0,52[1-3]; 0,69[2-4]
СРБ, нг/мл	4,41 (3,39-8,03)	8,32 (7,08-10,17)	6,98 (5,26-9,11)	2,73 (1,65-7,82)	0,06[1-2]; 0,13[3-4] 0,28[1-3]; 0,10[2-4]

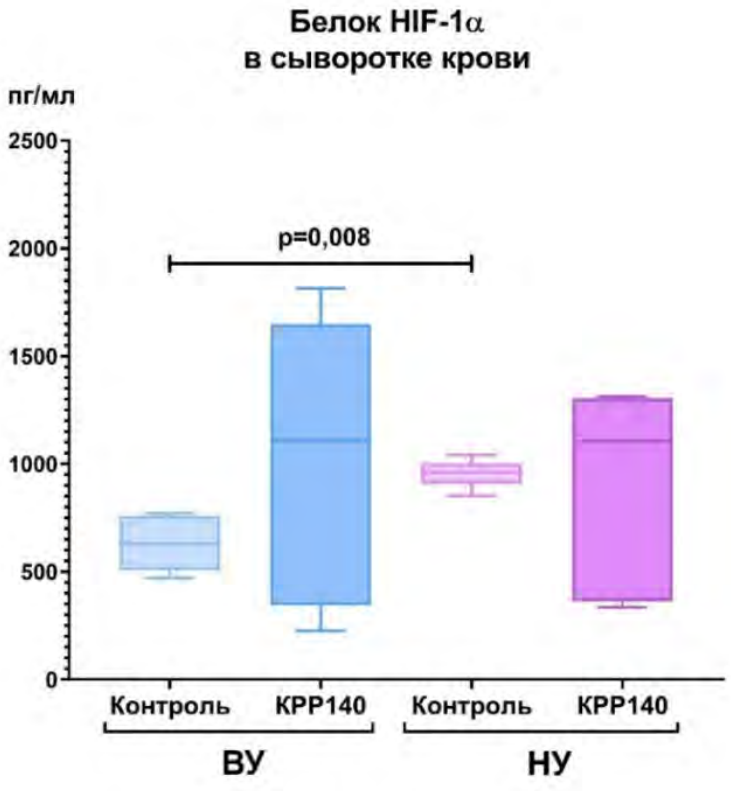


Рис. 3.5.27. Содержание HIF-1α в сыворотке крови в контрольных группах и при колоректальном раке (КРР140) у ВУ и НУ мышей, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

3.5.6. Субпопуляционный состав лимфоцитов и макрофагов в опухолях через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6

В популяции клеток, выделенных из опухолей дистального отдела ободочной кишки, у НУ мышей относительное и абсолютное количество цитотоксических Т-лимфоцитов было статистически значимо выше по сравнению с ВУ (табл. 3.5.18, рис. 3.5.28).

Статистически значимых различий по абсолютному и относительному количеству Т-хелперов, В-лимфоцитов, регуляторных Т-лимфоцитов, NK клеток и макрофагов в опухолях у животных с разной устойчивостью к гипоксии выявлено не было (табл. 3.5.18).

Таблица 3.5.18

Абсолютное и относительное количество Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, регуляторных Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, NK клеток и макрофагов в опухолях дистального отдела ободочной кишки у ВУ и НУ мышей через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН, Me (25-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Группы наблюдения / Параметры	**Опытные**		**p**
	ВУ (n=7)	**НУ (n=8)**	
Т-хелперы (CD3+CD4+), 10^6/мл	0,10 (0,03-0,39)	0,12 (0,06-0,17)	0,89
Т-хелперы (CD3+CD4+), %	4,9 (0,9-8,5)	1,9 (0,9-3,5)	0,69
Цитотоксические Т-лимфоциты (CD3+CD8+), 10^6/мл	0,001 (0,0001-0,006)	0,03 (0,009-0,111)	**0,03**
Цитотоксические Т-лимфоциты (CD3+CD8+), %	0,05 (0,008-0,11)	0,49 (0,14-2,35)	**0,04**
Регуляторные Т-лимфоциты (CD4+CD25+FOXP3+), 10^6/мл	0,005 (0,003-0,023)	0,03 (0,02-0,08)	0,11
Регуляторные Т-лимфоциты (CD4+CD25+FOXP3+), %	5,9 (2,5-18,2)	7,5 (5,8-11,5)	0,69
В-лимфоциты (CD3-CD19+), 10^6/мл	0,05 (0,02-0,39)	0,20 (0,17-0,38)	0,34
В-лимфоциты (CD3-CD19+), %	2,7 (0,4-7,4)	4,7 (1,6-9,2)	0,49
NK клетки (CD3-NK1.1+), 10^6/мл	0,03 (0,01-0,11)	0,01 (0,001-0,12)	0,49
NK клетки (CD3-NK1.1+), %	0,80 (0,47-1,46)	0,28 (0,02-1,14)	0,34
Макрофаги (F4/80+), 10^6/мл	0,09 (0,02-0,24)	0,06 (0,02-0,11)	0,69
Макрофаги (F4/80+), %	1,9 (1,1-2,5)	0,8 (0,6-1,0)	0,11

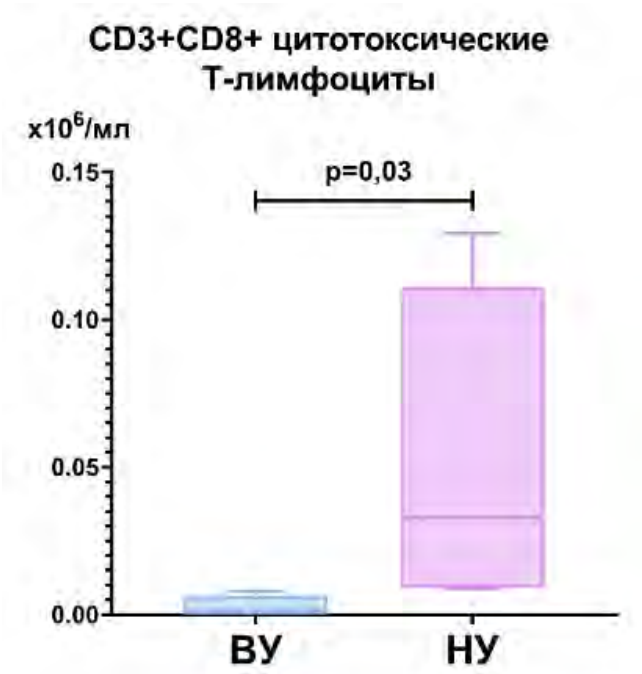


Рис. 3.5.28. Абсолютное количество CD3+CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов в опухолях дистального отдела ободочной кишки у ВУ (n=7) и НУ (n=8) мышей через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

3.5.7. Морфологическое и морфометрическое исследование тимуса и селезенки через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6

При морфологическом исследовании тимуса у ВУ и НУ мышей контрольных групп в дольках преобладало корковое вещество, плотно заселенное лимфоцитами (рис. 3.5.29, А, Б, черные стрелки). Границы между корковым и мозговым веществом были четкими (рис. 3.5.29, А, Б, синие стрелки).

При морфологическом исследовании в тимусе у ВУ мышей через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН по сравнению с контрольной группой выявлено расширение коркового вещества долек, границы между корковым и мозговым веществом были очагово нечеткими (рис. 3.5.29, В, Д, черные и синие стрелки). Тимические тельца состояли из 3-5 клеток, более 5 клеток, обнаружены многочисленные тимические тельца с кератогиалином и в виде кистоподобных полостей (рис. 3.5.29, В, Д, зеленые стрелки).

У НУ мышей выявлено очаговое опустошение коркового вещества долек тимуса, очагово нечеткие границы между корковым и мозговым веществом (рис. 3.5.29, Г, Е, черные и синие стрелки). Тимические тельца состояли из 3-5 клеток, более 5 клеток, обнаружены немногочисленные тимические тельца с кератогиалином и в виде кистоподобных полостей (рис. 3.5.29, Г, зеленая стрелка).

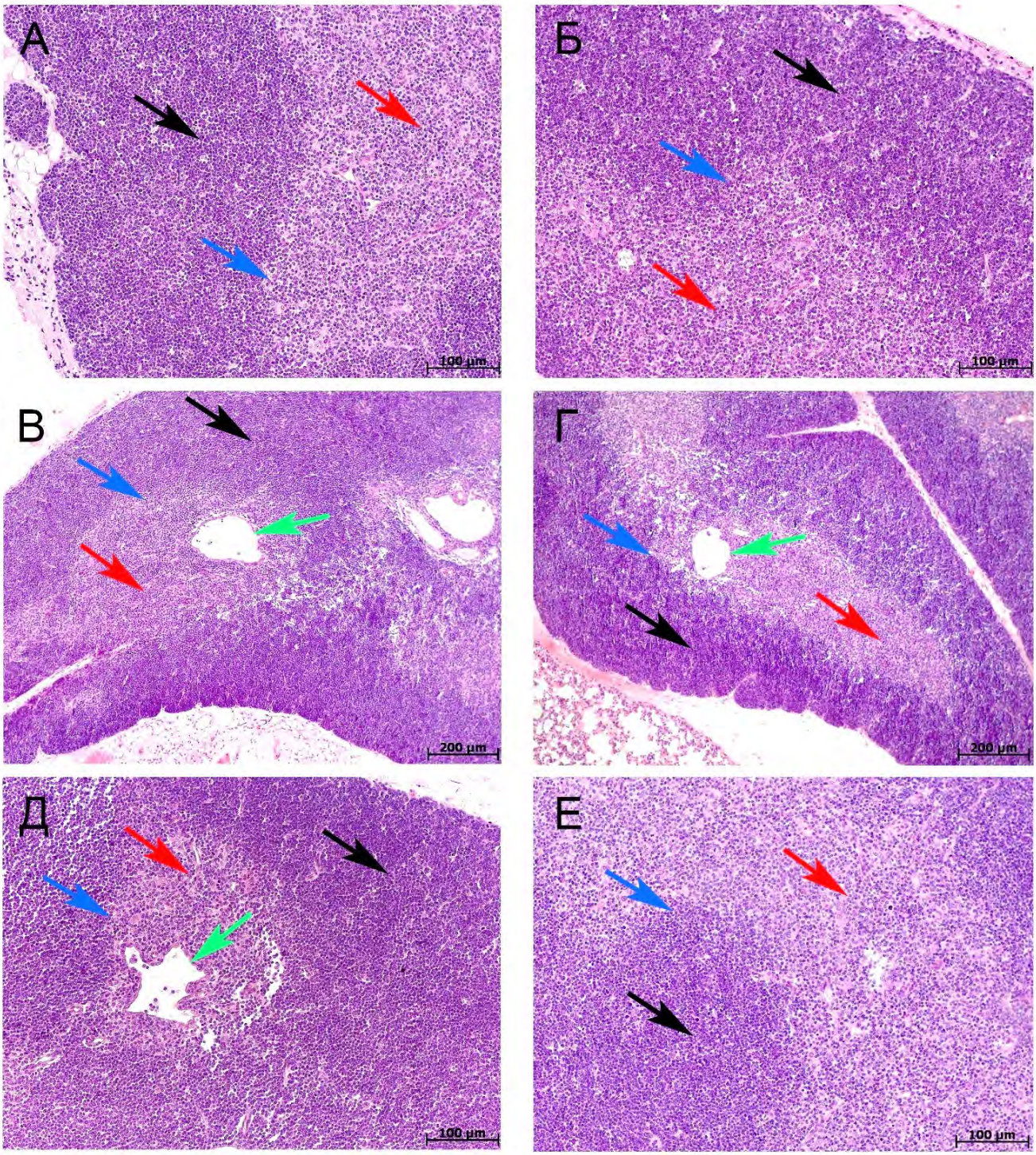


Рис. 3.5.29. Морфологическая характеристика долек тимуса у мышей контрольных групп (А, Б) и через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН (В-Е) у ВУ и НУ мышей. А, В, Д – ВУ; Б, Г, Е – НУ. А, Б – корковое вещество плотно заселено лимфоцитами (черные стрелки), границы между корковым и мозговым веществом четкие (синие стрелки), мозговое вещество (красные стрелки); В, Д – гиперплазия коркового вещества (черные стрелки), границы между корковым и мозговым веществом очагово нечеткие (синие стрелки), мозговое вещество (красные стрелки), тимические тельца в виде кистоподобных полостей (зеленые стрелки); Г, Е – корковое вещество плотно заселено лимфоцитами (черные стрелки), границы между корковым и мозговым веществом очагово нечеткие (синие стрелки), мозговое вещество (красные стрелки), тимическое тельце в виде кистоподобной полости (зеленая стрелка). Окраска гематоксилином и эозином

При морфометрическом исследовании тимуса у ВУ и НУ мышей контрольных групп различий не выявлено (табл. 3.5.19). Через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у ВУ мышей по сравнению с контрольной группой наблюдалось расширение коркового и сужение мозгового вещества долек тимуса, а у НУ животных опытной группы по сравнению с контрольной различий не выявлено. У ВУ животных опытной группы по сравнению с НУ объемная доля коркового вещества была больше, а мозгового – меньше (табл. 3.5.19).

Таблица 3.5.19

Морфометрические показатели объемной доли структурно-функциональных зон долек тимуса у ВУ и НУ мышей контрольных групп и через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Группы наблюдения / **Параметры**	**Контрольные**		**Опытные**		**p**
	ВУ[1] (n=5)	**НУ[2] (n=5)**	**ВУ[3] (n=7)**	**НУ[4] (n=8)**	
Корковое вещество, %	54,1 (51,0-56,0)	60,1 (55,2-64,9)	65,0 (59,5-69,8)	54,8 (50,6-58,1)	$0,12^{1-2}$; $\mathbf{0,001}^{1-3}$ $0,23^{2-4}$; $\mathbf{0,005}^{3-4}$
Мозговое вещество, %	45,9 (44,0-49,0)	39,9 (35,1-44,8)	35,0 (30,2-40,5)	45,2 (41,9-49,4)	$0,12^{1-2}$; $\mathbf{0,001}^{1-3}$ $0,23^{2-4}$; $\mathbf{0,005}^{3-4}$
Отношение коркового вещества к мозговому, усл.ед.	1,2 (1,1-1,4)	1,7 (1,3-2,1)	2,2 (1,6-2,8)	1,3 (1,1-1,7)	$0,11^{1-2}$; $\mathbf{0,001}^{1-3}$ $0,55^{2-4}$; $\mathbf{0,01}^{3-4}$

При морфометрическом исследовании тимических телец разного типа обнаружено увеличение числа телец в виде кистоподобных полостей только у ВУ животных через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН по сравнению с контрольной группой (табл. 3.5.20). При этом у ВУ мышей по сравнению с НУ их число также было статистически значимо выше (табл. 3.5.20).

Таблица 3.5.20

Доля тимических телец разного типа у ВУ и НУ мышей контрольных групп и через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Группы наблюдения / **Параметры**		**Контрольные**		**Опытные**		**p**
		ВУ[1] (n=5)	**НУ[2] (n=5)**	**ВУ[3] (n=7)**	**НУ[4] (n=8)**	
% от общего количества тимических телец	из 3-5 эпителиальных клеток	57,9 (42,1-75,0)	50,8 (41,7-60,0)	42,9 (38,1-55,0)	60,5 (52,6-68,4)	$0,66^{1-2}$; $0,07^{3-4}$ $0,55^{1-3}$; $0,23^{2-4}$
	из 5 и более эпителиальных клеток	10,0 (2,8-32,0)	13,3 (10,0-16,7)	15,4 (4,8-34,2)	12,5 (5,3-21,1)	$0,81^{1-2}$; $0,52^{3-4}$ $0,77^{1-3}$; $0,99^{2-4}$
	с кератогиалином	16,7 (10,3-24,3)	14,2 (8,3-20,0)	10,0 (8,9-13,9)	15,3 (7,1-16,7)	$0,44^{1-2}$; $0,51^{3-4}$ $0,06^{1-3}$; $0,69^{2-4}$
	в виде кистоподобных полостей	10,5 (10,0-22,2)	21,7 (10,0-33,3)	42,9 (36,8-48,9)	8,3 (5,1-37,2)	$0,68^{1-2}$; $\mathbf{0,02}^{3-4}$ $\mathbf{0,007}^{1-3}$; $0,66^{2-4}$

При морфологическом исследовании в селезенке через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН как у ВУ, так и у НУ мышей выявлены лимфоидные узелки без и с небольшими светлыми центрами (рис. 3.5.30, А-Г, черные и синие стрелки). ПАЛМ-зоны выражены. Количество мегакариоцитов увеличено (рис. 3.5.31, черные стрелки).

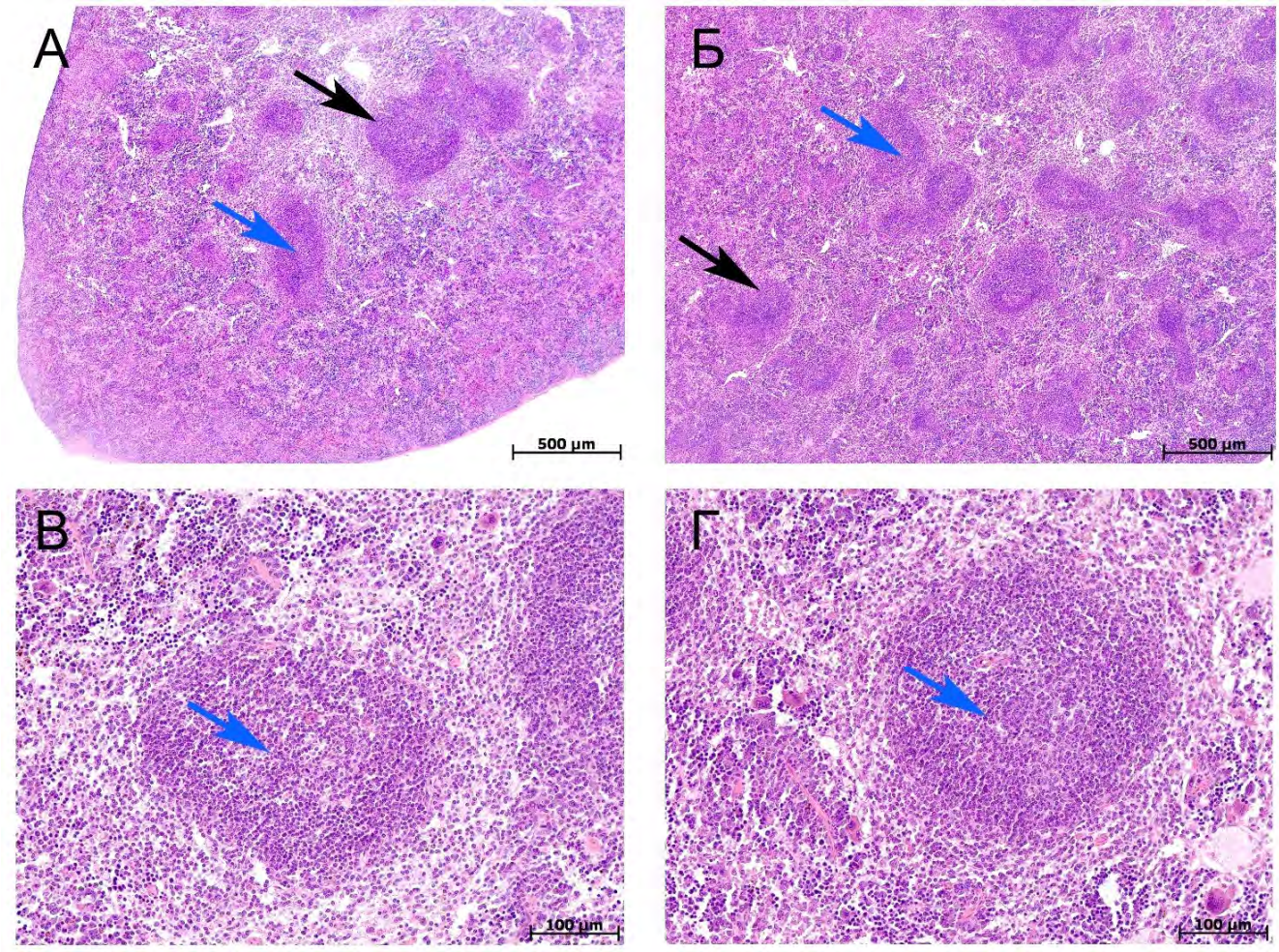


Рис. 3.5.30. Морфологическая характеристика селезенки у ВУ (А, В) и НУ (Б, Г) мышей через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН. А, Б – преобладает белая пульпа, представленная лимфоидными узелками (черные стрелки) со светлыми центрами (синие стрелки); В, Г – лимфоидные узелки со светлыми центрами (синие стрелки). Окраска гематоксилином и эозином

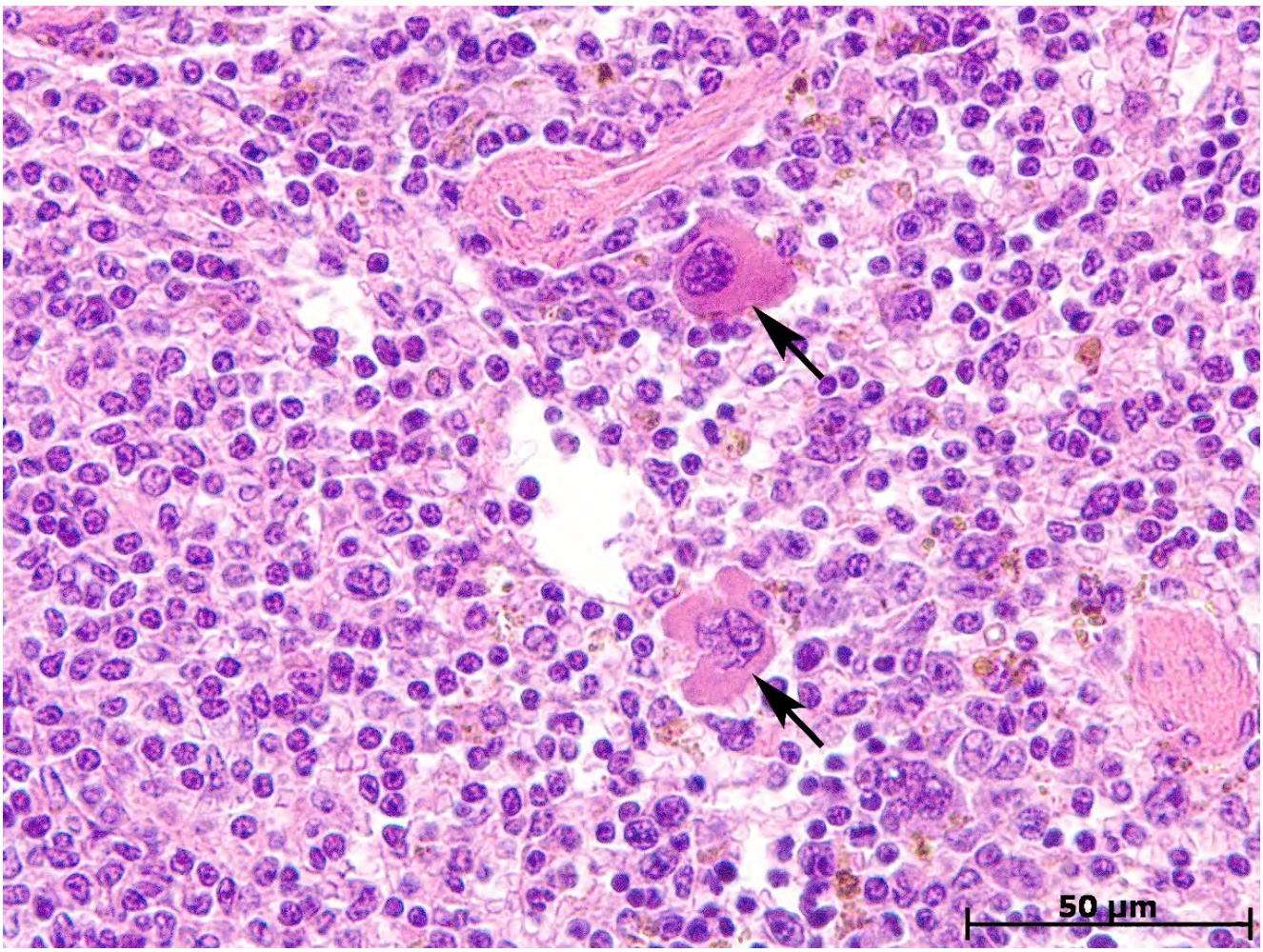


Рис. 3.5.31. Морфологическая характеристика селезенки у мышей через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН. Мегакариоциты (черные стрелки). Окраска гематоксилином и эозином

При морфометрическом исследовании селезенки у ВУ животных контрольной группы объемная доля лимфоидных узелков была больше, а ПАЛМ-зон меньше по сравнению с НУ (табл. 3.5.21 Приложения 5, рис. 3.5.32). Через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН как у ВУ, так и у НУ мышей опытных групп обнаружено увеличение объемной доли лимфоидных узелков и уменьшение ПАЛМ-зон, при этом расширение светлых центров лимфоидных узелков выявлено только у НУ животных (табл. 3.5.21 Приложения 5, рис. 3.5.32).

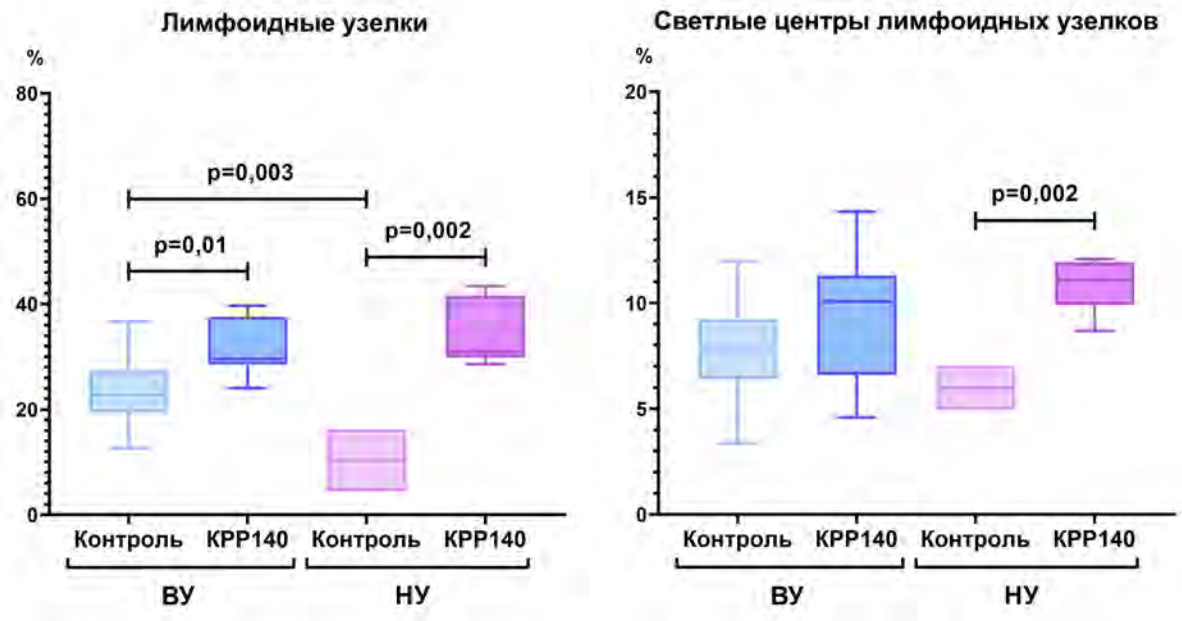


Рис. 3.5.32. Объемная доля лимфоидных узелков и светлых центров лимфоидных узелков в селезенке у ВУ и НУ мышей контрольных групп и при колоректальном раке (КРР140), Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

3.5.8. Морфологическое исследование брыжеечных лимфатических узлов, печени и легких через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6

При морфологическом исследовании БЛУ в контрольных группах как у ВУ, так и у НУ мышей реактивные изменения не выявлены. Лимфоидные узелки без и со светлыми центрами, в светлых центрах клетки расположены рыхло, представлены лимфобластами, лимфоцитами, макрофагами. Паракортикальная зона очагово опустошена, краевые синусы не расширены, в них – лимфоциты и макрофаги. Промежуточные синусы не выражены. В мозговом синусе отношение лимфоцитов и макрофагов 1:1. Строма мякотных тяжей заселена плотно расположенными лимфоцитами и макрофагами (рис. 3.5.33).

При морфологическом исследовании БЛУ через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН как у ВУ, так и у НУ мышей наружная кора и паракортикальная зона расширены, плотно заселены лимфоцитами. Лимфоидные узелки без и со светлыми центрами, в светлых центрах рыхло и плотно расположенные лимфобласты и лимфоциты, встречаются фрагменты ядер. В мякотных тяжах определялось большое количество плазмоцитов, а также лимфоциты и макрофаги. Краевой и мозговые синусы расширены, в них много лимфоцитов и макрофагов. Макрофаги с зернистым эозинофильным содержимым, встречаются единичные гигантские клетки инородных тел. Метастазов в БЛУ не выявлено (рис. 3.5.33, рис. 3.5.34, рис. 3.5.35).

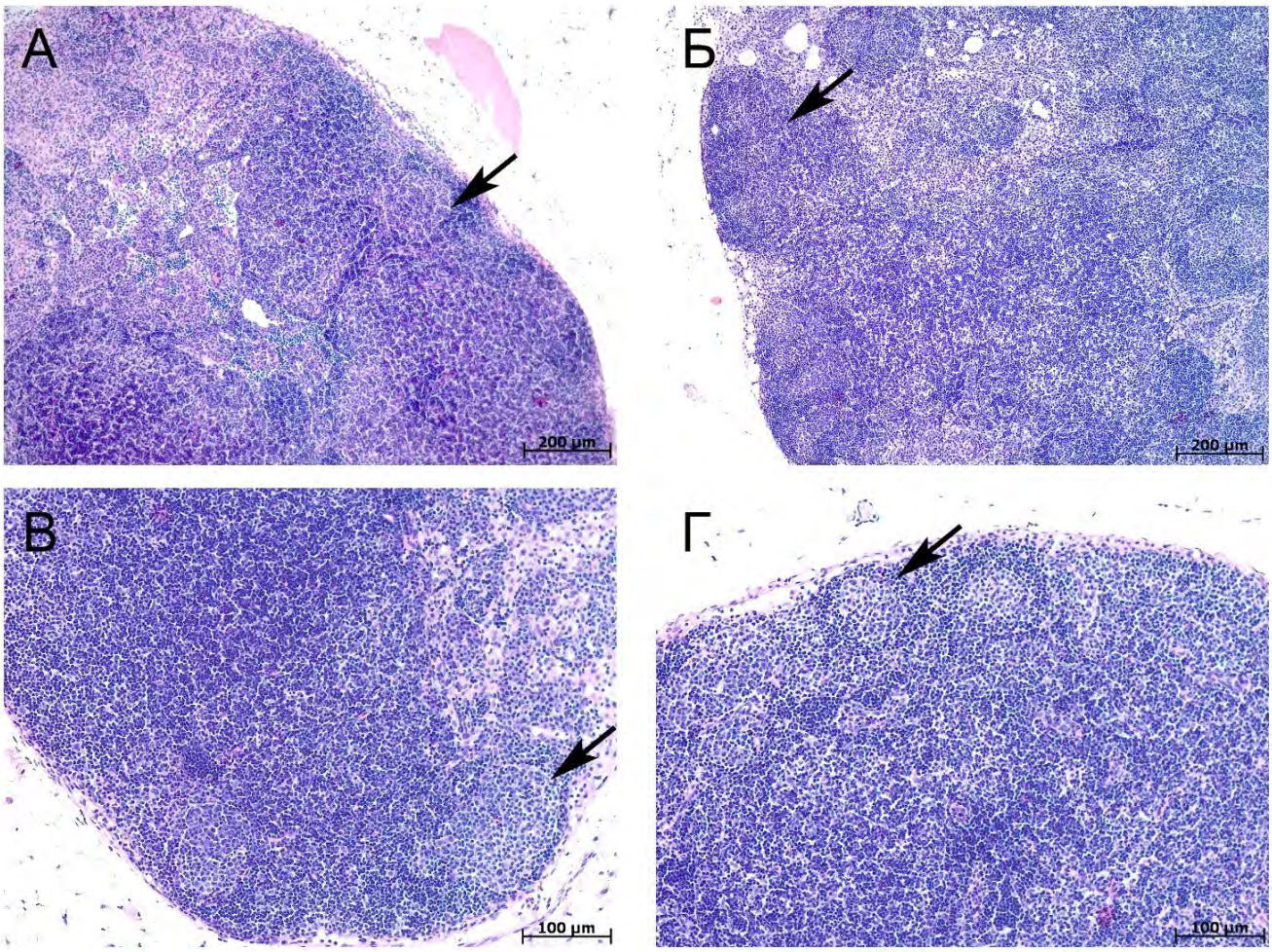


Рис. 3.5.33. Морфологическая характеристика брыжеечных лимфатических узлов у ВУ и НУ мышей контрольных групп (А, Б) и через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН (В, Г). А, В – ВУ; Б, Г – НУ. А, Б – в корковом веществе лимфоидные узелки (черные стрелки) со светлыми центрами, паракортикальная зона плотно заселена лимфоцитами; В, Г – в лимфоидных узелках (черные стрелки) светлые центры широкие, паракортикальная зона плотно заселена лимфоцитами. Метастазы не выявлены. Окраска гематоксилином и эозином

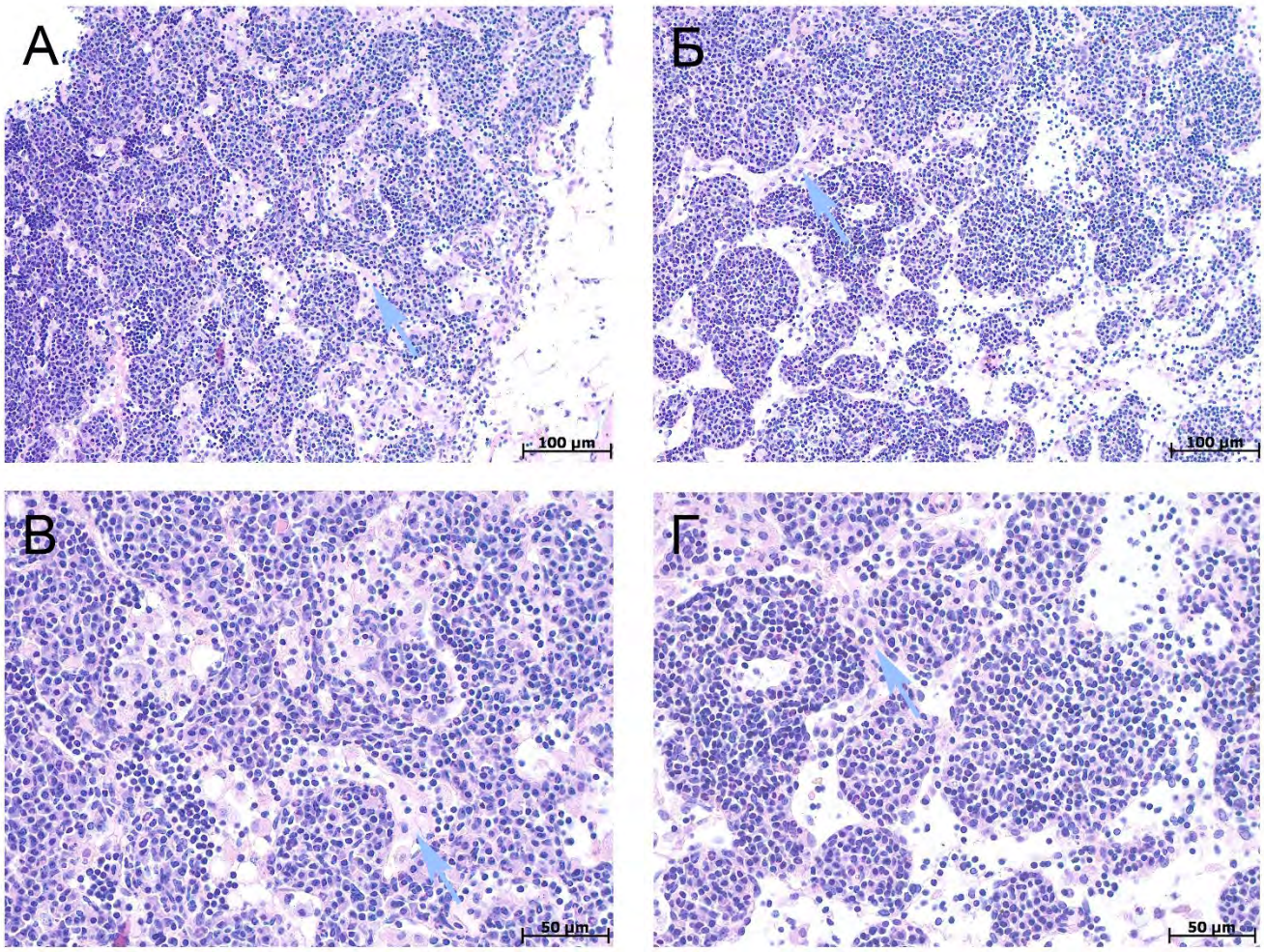


Рис. 3.5.34. Морфологическая характеристика брыжеечных лимфатических узлов у ВУ и НУ мышей через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН. А, В – ВУ; Б, Г – НУ. Мозговые синусы широкие (голубые стрелки), заполнены рыхло расположенными клетками. Метастазы не выявлены. Окраска гематоксилином и эозином

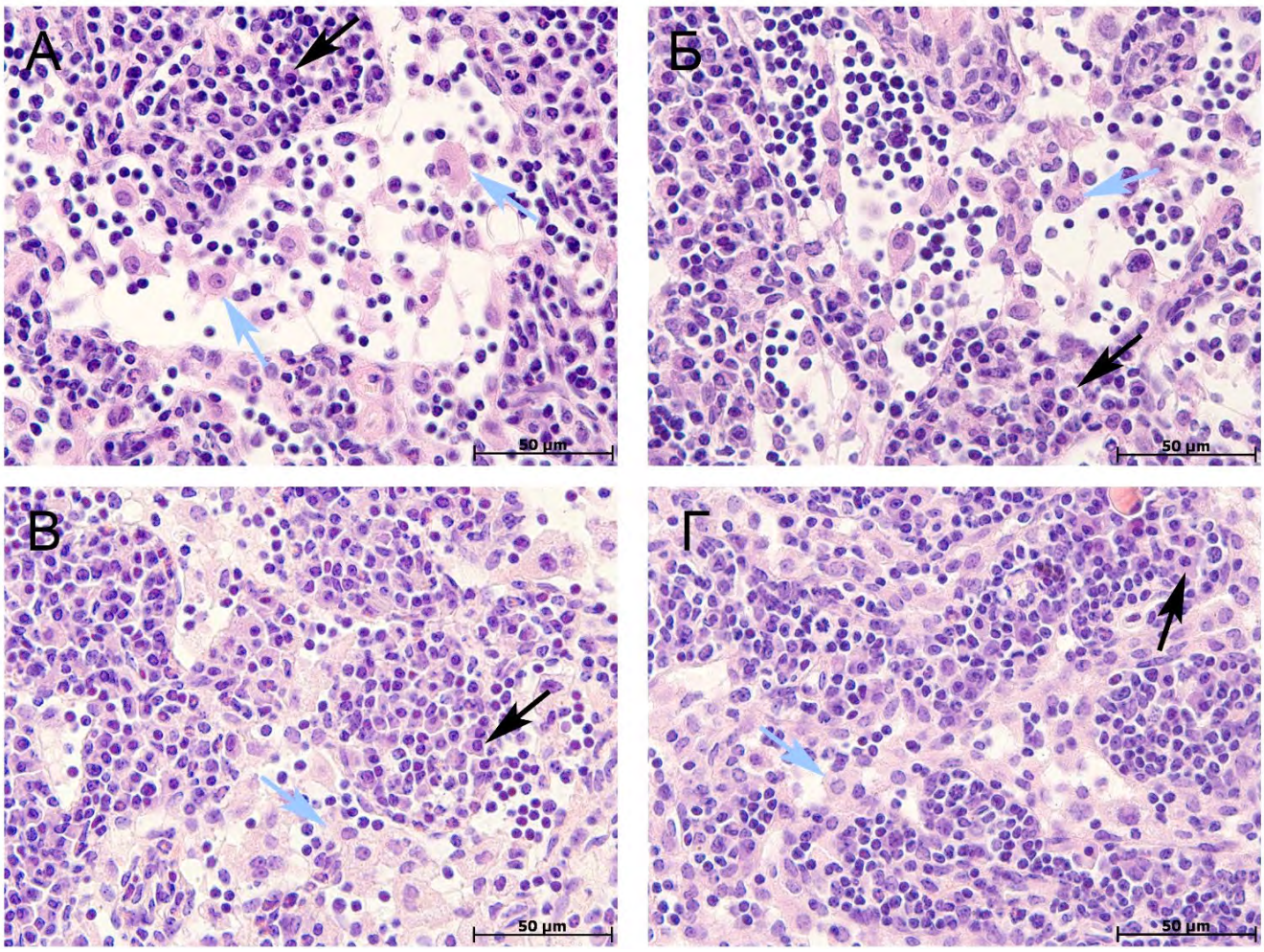


Рис. 3.5.35. Морфологическая характеристика брыжеечных лимфатических узлов у ВУ и НУ мышей через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН. А, В – ВУ; Б, Г – НУ. В мозговых синусах макрофаги (голубые стрелки) и лимфоциты. В мякотных тяжах (черные стрелки) лимфоциты, плазмоциты, гистиоциты. Метастазы не выявлены. Окраска гематоксилином и эозином

Таким образом, как у ВУ, так и у НУ половозрелых самцов мышей С57Bl/6 через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН по данным морфологического исследования БЛУ выявлена гиперплазия В- и Т-зон, выраженная макрофагальная реакция в синусах. В мякотных тяжах обнаружено большое количество плазмоцитов.

Печень и легкие ВУ и НУ мышей через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН имели нормальное строение. Метастазов в легких и печени не выявлено (рис. 3.5.36, рис. 3.5.37).

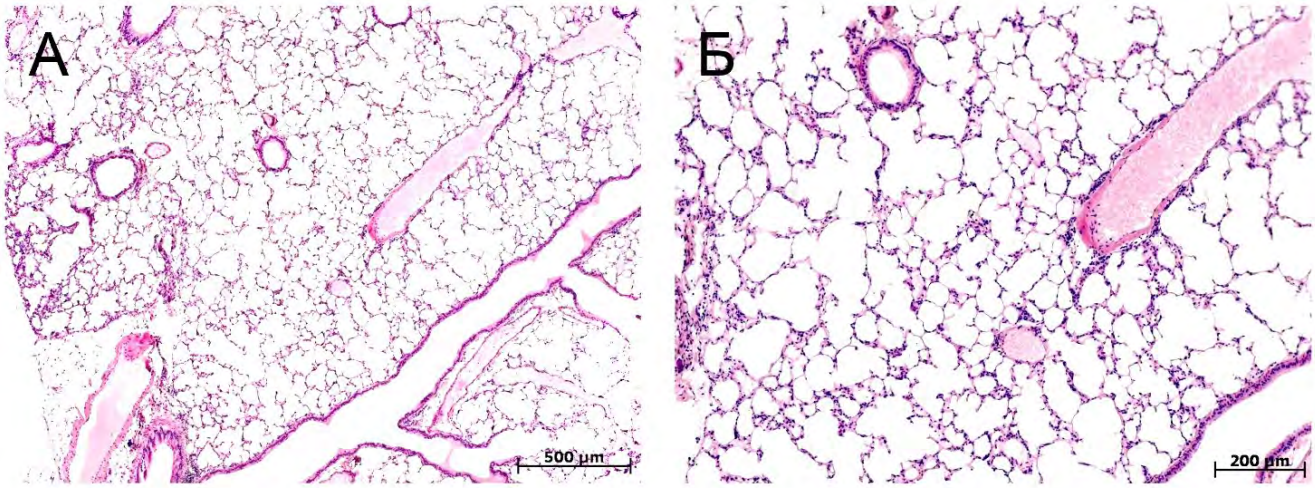


Рис. 3.5.36. Морфологическая характеристика легких у НУ самца мышей С57Bl/6 через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН. А, Б – бронхи второго и третьего порядков выстланы кубическим эпителием, их просветы свободны, структуры респираторного отдела равномерно воздушны. Межальвеолярные перегородки тонкие. Полнокровие сосудов. Метастазы не выявлены. Окраска гематоксилином и эозином

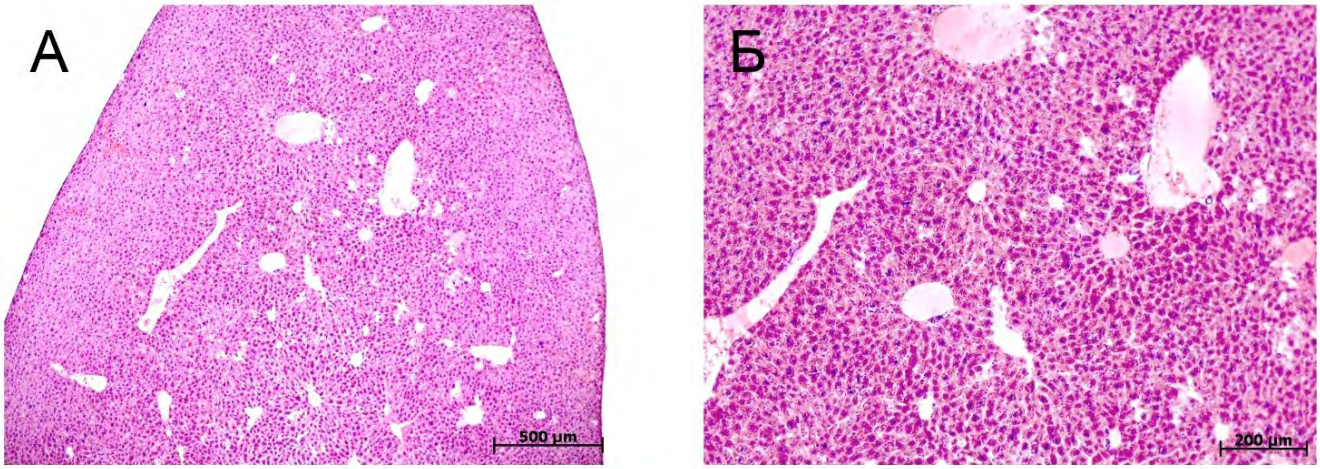


Рис. 3.5.37. Морфологическая характеристика печени у НУ самца мышей С57Bl/6 через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН. А, Б – дольковое и балочное строение сохранено, полнокровие. Метастазы не выявлены. Окраска гематоксилином и эозином

3.5.9. Субпопуляционный состав клеток брыжеечных лимфатических узлов через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у ВУ и НУ самцов мышей С57Bl/6

В контрольной группе у НУ мышей по сравнению с ВУ в БЛУ абсолютное количество CD4+ Т-лимфоцитов было ниже (табл. 3.5.22 Приложения 5, рис. 3.5.38, рис. 3.5.39).

Через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН по сравнению с контрольной группой у ВУ мышей изменений не наблюдалось, а у НУ животных повышалось относительное и абсолютное количество NK клеток и CD19+ В-лимфоцитов, абсолютное число цитотоксических CD8+ Т-лимфоцитов, но снижалось относительное число F4/80+ макрофагов. В БЛУ у НУ мышей опытной группы по сравнению с ВУ было выше относительное и абсолютное число NK клеток и CD19+ В-лимфоцитов (табл. 3.5.22 Приложения 5, рис. 3.5.38, рис. 3.5.39).

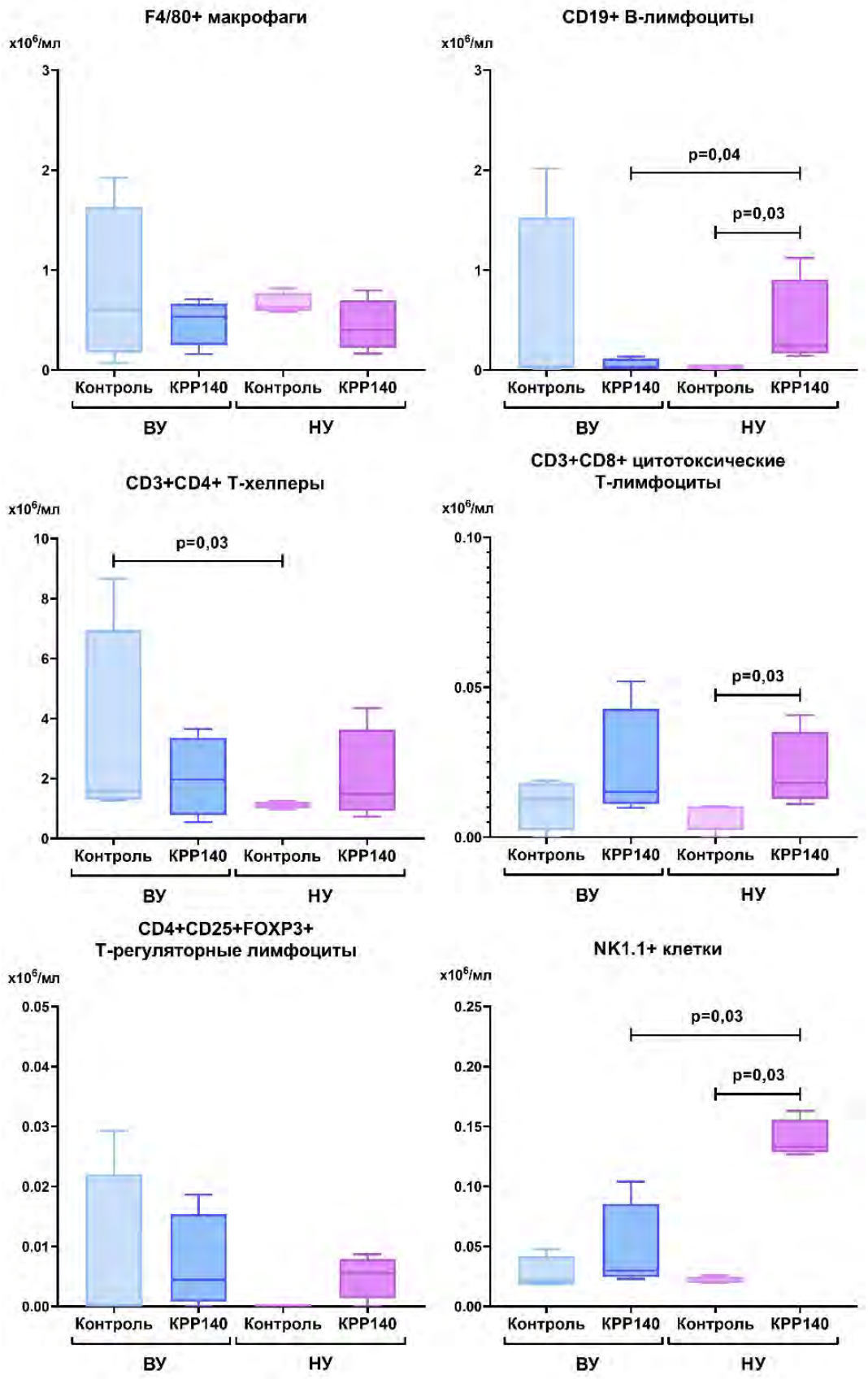


Рис. 3.5.38. Абсолютное количество F4/80+ макрофагов, CD3-CD19+ В-лимфоцитов, CD3+CD4+ Т-лимфоцитов, CD3+CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов, CD4+CD25+FOXP3+ Т-регуляторных лимфоцитов и CD3-NK1.1+ клеток в брыжеечных лимфатических узлах у ВУ и НУ мышей контрольных групп и при колоректальном раке (КРР140), Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

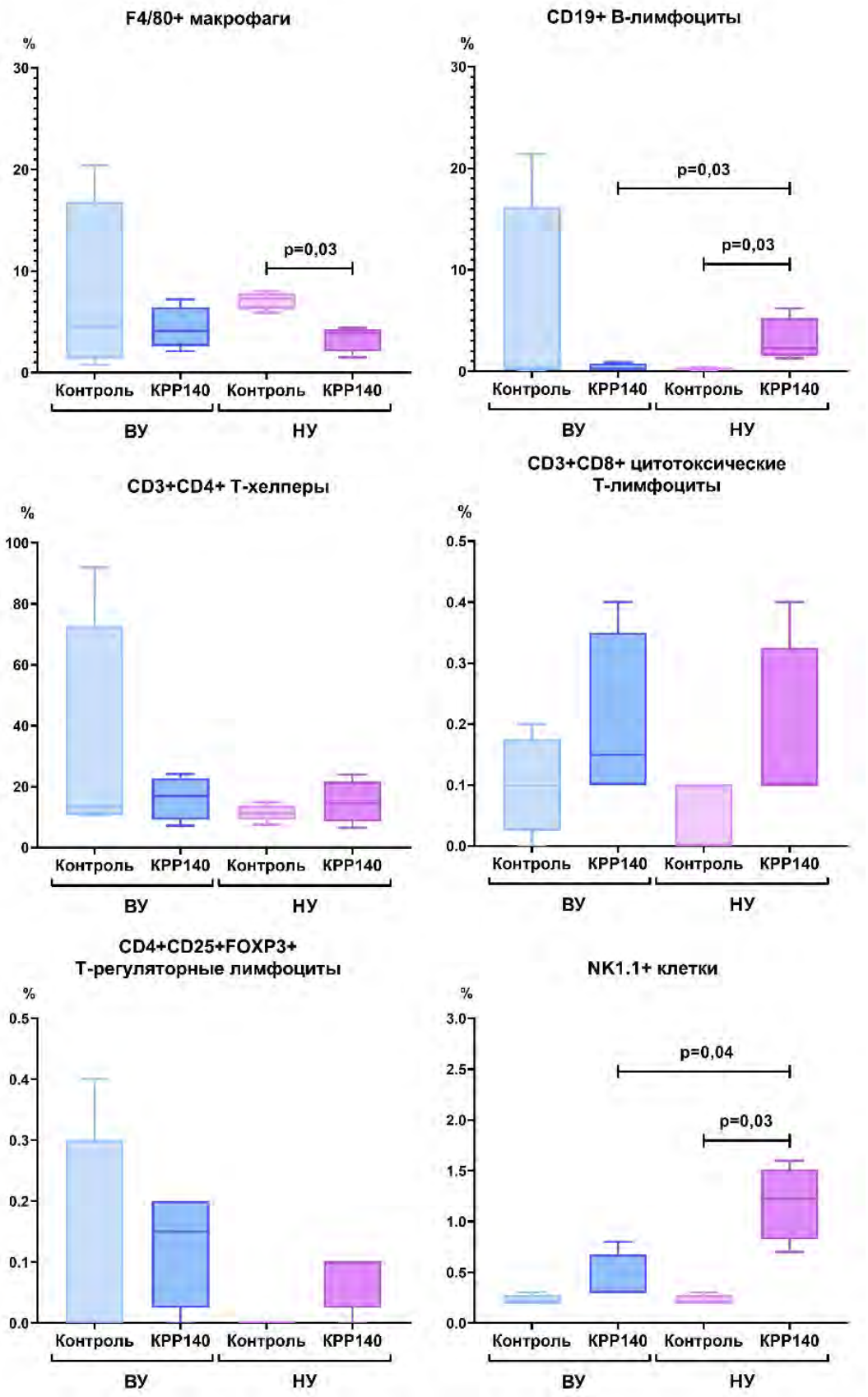


Рис. 3.5.39. Относительное количество F4/80+ макрофагов, CD3-CD19+ В-лимфоцитов, CD3+CD4+ Т-лимфоцитов, CD3+CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов, CD4+CD25+FOXP3+ Т-регуляторных лимфоцитов и CD3-NK1.1+ клеток в брыжеечных лимфатических узлах у ВУ и НУ мышей контрольных групп и при колоректальном раке (КРР140), Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

3.5.10. Клинический анализ и субпопуляционный состав клеток периферической крови через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6

По результатам клинического анализа крови в контрольной группе НУ мышей по сравнению с ВУ было выше число лейкоцитов, абсолютное и относительное количество лимфоцитов и моноцитов, концентрация гемоглобина и число эритроцитов (табл. 3.5.23 Приложения 5, рис. 3.5.40).

Через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН как у ВУ, так и у НУ мышей выявлено снижение количества эритроцитов, концентрации гемоглобина и МСН (табл. 3.5.23 Приложения 5, рис. 3.5.40). У ВУ мышей опытной группы выявлено увеличение относительного количества моноцитов, которое было выше по сравнению с НУ животными. Только у НУ мышей при колит-ассоциированном КРР наблюдалось статистически значимое снижение относительного содержания лимфоцитов по сравнению с контрольной группой (табл. 3.5.23 Приложения 5).

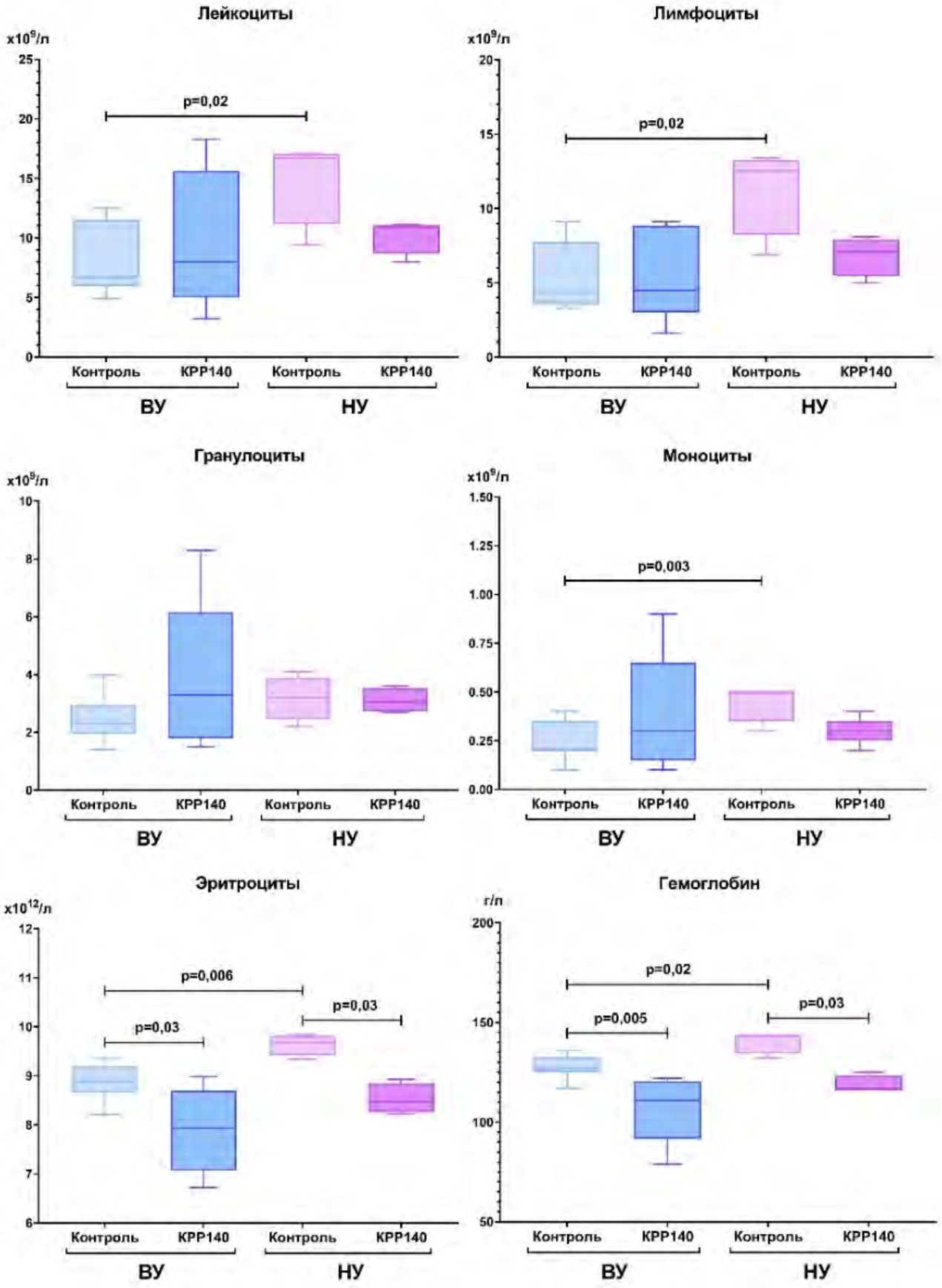


Рис. 3.5.40. Абсолютное число лейкоцитов, лимфоцитов, гранулоцитов, моноцитов, эритроцитов и содержание гемоглобина в крови у ВУ и НУ мышей контрольных групп и при колоректальном раке (КРР140), Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Только у НУ мышей опытной группы выявлено увеличение индекса NLR по сравнению с контрольной группой (табл. 3.5.24, рис. 3.5.41). При этом индекс SIRI не изменялся как у ВУ, так и у НУ мышей (табл. 3.5.24).

Таблица 3.5.24

Лимфоцитарно-моноцитарный (LMR), нейтрофильно-лимфоцитарный (NLR) индексы и индекс системного воспалительного ответа (SIRI) у ВУ и НУ мышей контрольных групп и через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Группы наблюдения / Параметры	**Контрольные**		**Опытные**		**p**
	ВУ[1] (n=5)	**НУ[2] (n=5)**	**ВУ[3] (n=7)**	**НУ[4] (n=8)**	
LMR, усл.ед.	19,8 (18,0-26,2)	25,1 (23,8-26,3)	16,0 (12,4-22,0)	24,8 (20,8-26,1)	$0,10^{1-2}$; $0,20^{1-3}$ $0,80^{2-4}$; $0,05^{3-4}$
NLR, усл.ед.	0,45 (0,36-0,58)	0,28 (0,24-0,33)	0,75 (0,47-0,92)	0,49 (0,36-0,55)	$0,003^{1-2}$; $0,06^{1-3}$ **$0,04^{2-4}$**; $0,20^{3-4}$
SIRI, усл. ед.	0,11 (0,09-0,14)	0,12 (0,10-0,16)	0,19 (0,09-0,52)	0,12 (0,10-0,19)	$0,50^{1-2}$; $0,24^{1-3}$ $0,89^{2-4}$; $0,91^{3-4}$

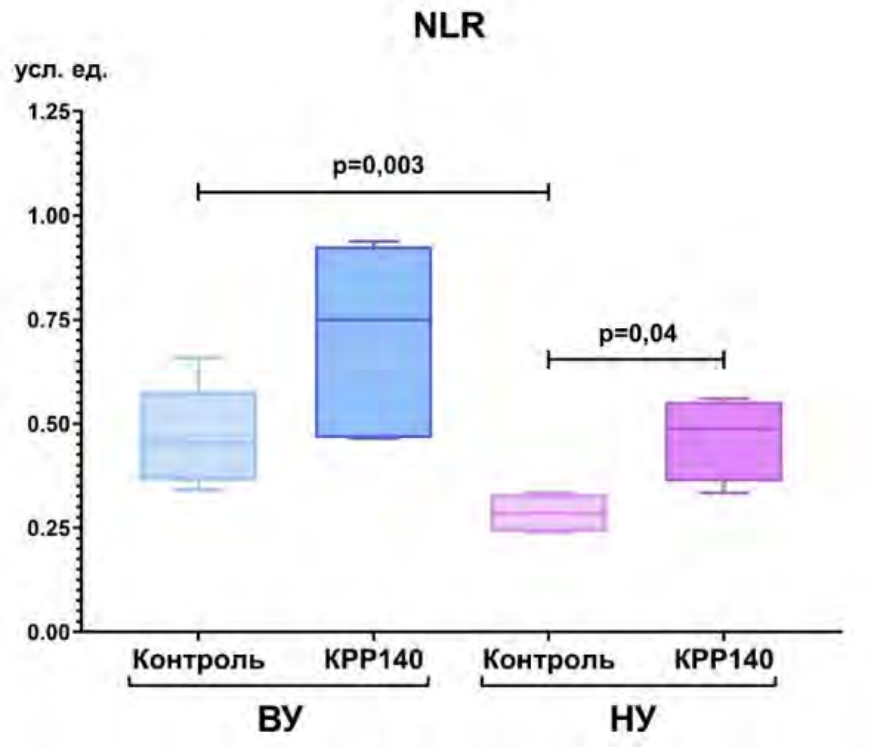


Рис. 3.5.41. Нейтрофильно-лимфоцитарный (NLR) индекс у ВУ и НУ мышей контрольных групп и при колоректальном раке (КРР140), Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

По данным проточной цитофлуориметрии показано, что в контрольной группе у НУ мышей по сравнению с ВУ было выше абсолютное число CD3+CD4+ Т-лимфоцитов, NK клеток в крови (табл. 3.5.25 Приложения 5, рис. 3.5.42, рис. 3.5.43). В опытных группах как у ВУ, так и у НУ

мышей по сравнению с контрольными в крови снижалось абсолютное число NK клеток и Т-регуляторных лимфоцитов и относительное количество CD3+CD4+ Т-лимфоцитов, при этом повышалось относительное число CD11b+ моноцитов. Только у ВУ мышей повышалось абсолютное число CD11b+ моноцитов и снижалось относительное число NK клеток и Т-регуляторных лимфоцитов (табл. 3.5.25 Приложения 5, рис. 3.5.42, рис. 3.5.43).

Однако только у НУ животных повышалось относительное и абсолютное количество CD3-CD19+ В-лимфоцитов и относительное – цитотоксических CD3+CD8+ Т-лимфоцитов, но снижалось абсолютное число CD3+CD4+ Т-лимфоцитов. Абсолютное и относительное число цитотоксических CD3+CD8+ Т-лимфоцитов и NK клеток в периферической крови при КРР было выше у НУ мышей по сравнению с ВУ (табл. 3.5.25 Приложения 5, рис. 3.5.42, рис. 3.5.43).

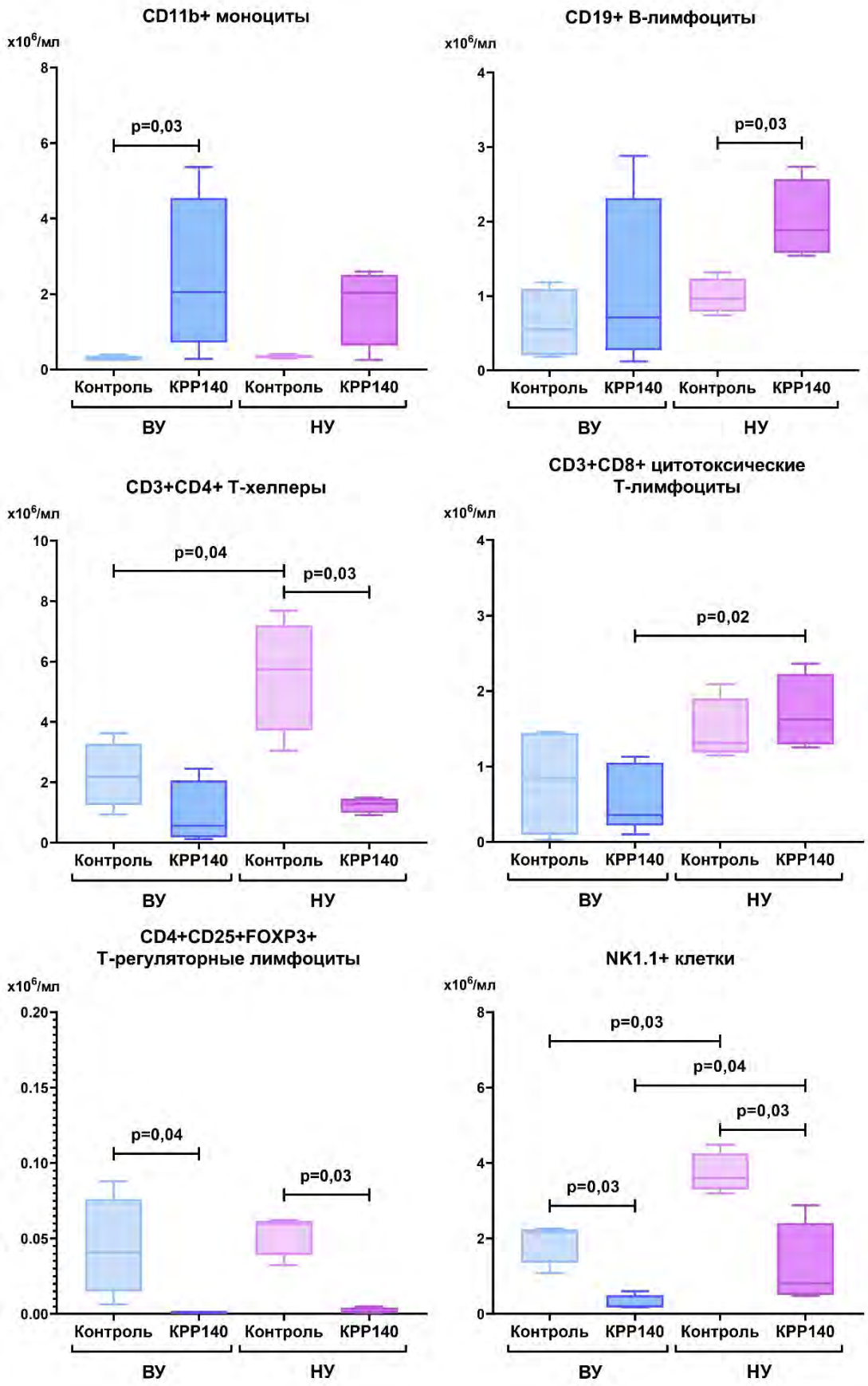


Рис. 3.5.42. Абсолютное число моноцитов, В-лимфоцитов, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, Т-регуляторных лимфоцитов и NK клеток в периферической крови у ВУ и НУ мышей контрольных групп и при колоректальном раке (КРР140), Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

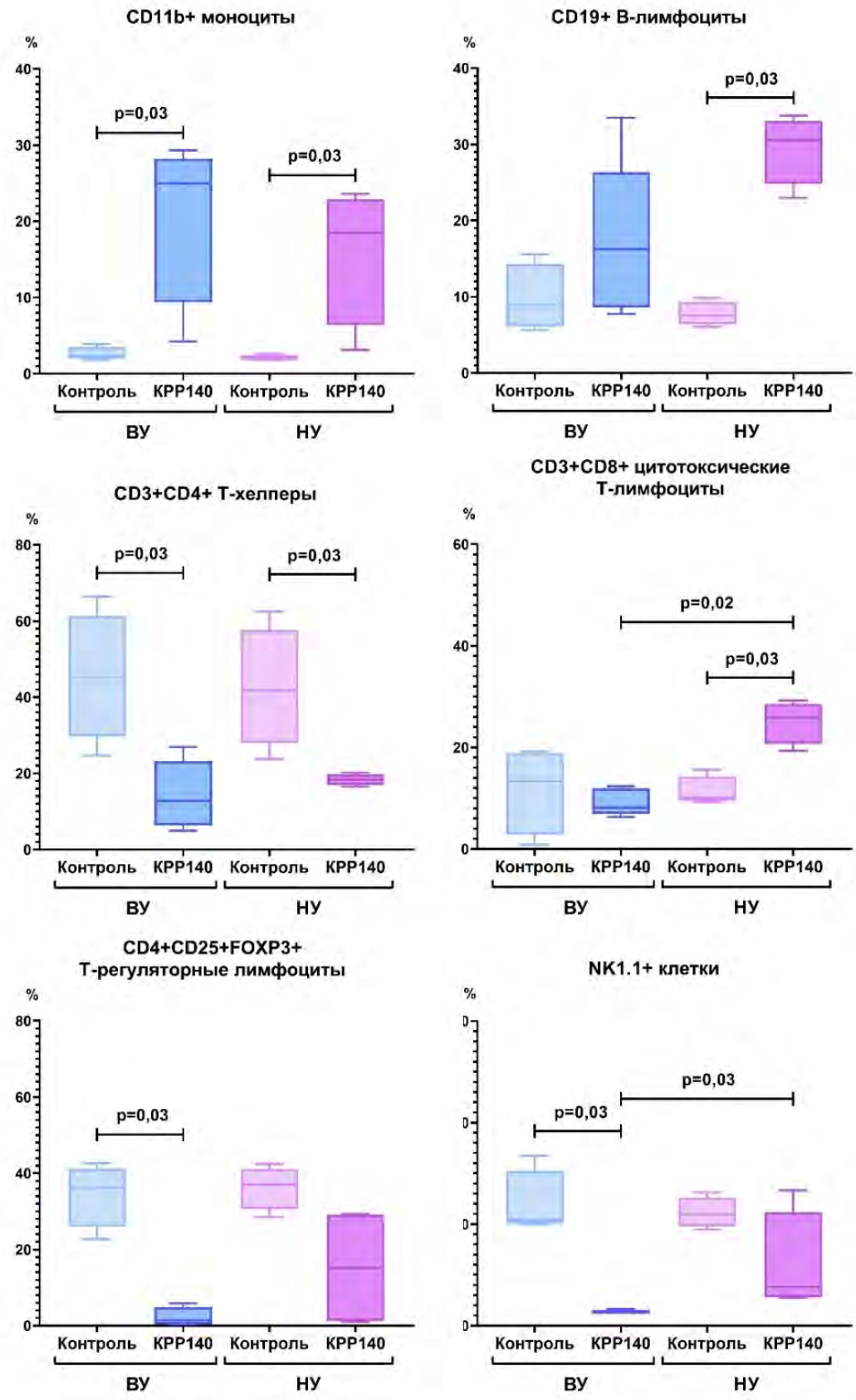


Рис. 3.5.43. Относительное число моноцитов, В-лимфоцитов, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, Т-регуляторных лимфоцитов и NK клеток в периферической крови у ВУ и НУ мышей контрольных групп и при колоректальном раке (КРР140), Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

3.5.11. Выявление железосодержащего пигмента гемосидерина в аденокарциномах дистального отдела ободочной кишки через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6

Через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН в опухолях у НУ мышей отмечалось накопление железосодержащего пигмента гемосидерина при окраске по Перлсу с усилением DAB и H_2O_2 (Meguro et al., 2003) (рис. 3.5.44, рис. 3.5.45). У ВУ животных накопления железосодержащего пигмента гемосидерина в опухолях выявлено не было.

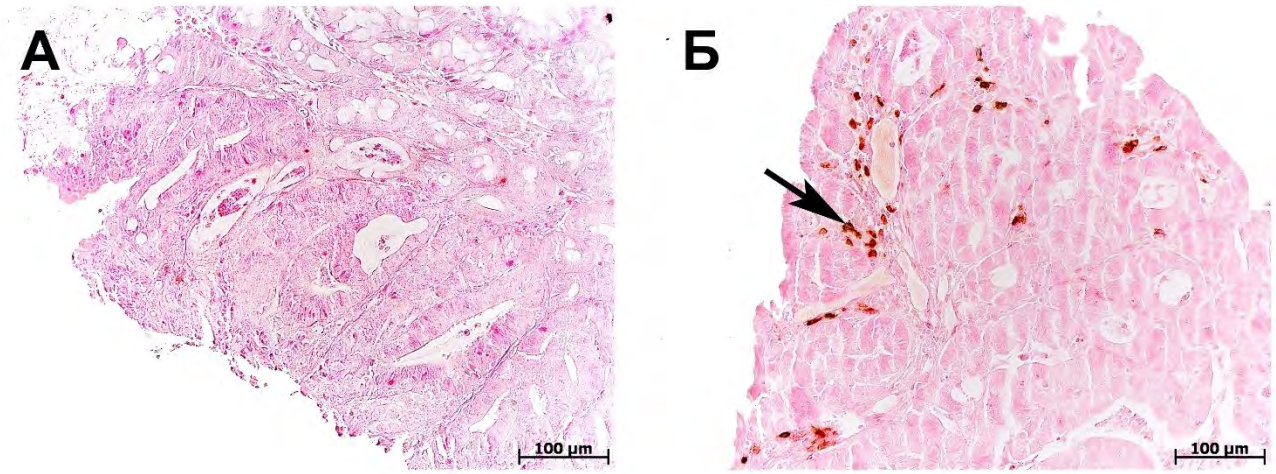


Рис. 3.5.44. Накопление железосодержащего пигмента гемосидерина (черная стрелка) в тканях опухолей у ВУ и НУ мышей через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН. А – ВУО; Б – НУО. Окрашивание по Перлсу с усилением DAB и H_2O_2 (Meguro et al., 2003)

Рис. 3.5.45. Накопление железосодержащего пигмента гемосидерина в тканях опухолей у НУ мышей через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН. Внутриклеточное и внеклеточное скопления гемосидерина. Окрашивание по Перлсу с усилением DAB и H_2O_2 (Meguro et al., 2003)

Заключение и обсуждение к 3.5

Таким образом, впервые показано, что темпы прогрессии колит-ассоциированного КРР, индуцированного АОМ и ДСН, у животных с разной устойчивостью к гипоксии варьируют. Через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН частота развития опухолей в дистальном отделе ободочной кишки у НУ мышей была в 2 раза выше по сравнению с ВУ. Кроме того, у НУ животных все опухоли (100%, 8 из 8) были представлены аденокарциномами, в то время как у ВУ – только 14% (1 из 7), а остальные – железистой интраэпителиальной неоплазией. Средняя площадь опухолей была статистически значимо выше у НУ животных по сравнению с ВУ. Только у НУ мышей выявлено накопление железосодержащего пигмента гемосидерина в опухолях (рис. 3.5.46). Изменения экспрессии генов, регулирующих ответ на гипоксию *Hif1a*, *Epas1*, *Hif3a, Vegf,* воспаление – *Nfkb*, *Tnfa*, *Il1b*, *Il6*, *Il10*, *Tgfb,* клеточный цикл и апоптоз – *Trp53*, *Pten*, *Cmet, Egf*, *Egfr*, *Pcna*, *Mki67*, *Bax, Bcl2,* а также генов, кодирующих компоненты эпителиального барьера *Muc1*, *Muc13*, *Cldn2* и *Cldn7* в опухолях и перитуморальной зоне зависели от исходной устойчивости мышей к недостатку кислорода. В опухолях у НУ мышей по сравнению с ВУ наблюдалась более высокая экспрессия *Hif3a, Vegf, Tnfa, Il10, Tgfb, Cmet, Egf, Egfr, Bax, Muc1* и *Cldn7*, а в перитуморальной зоне – только *Egf*. Таким образом, у НУ животных изменения экспрессии различных групп генов при колит-ассоциированном КРР более выражены, что свидетельствует о быстрых темпах прогрессии опухолевого процесса и менее благоприятном прогнозе по сравнению с ВУ (рис. 3.5.46).

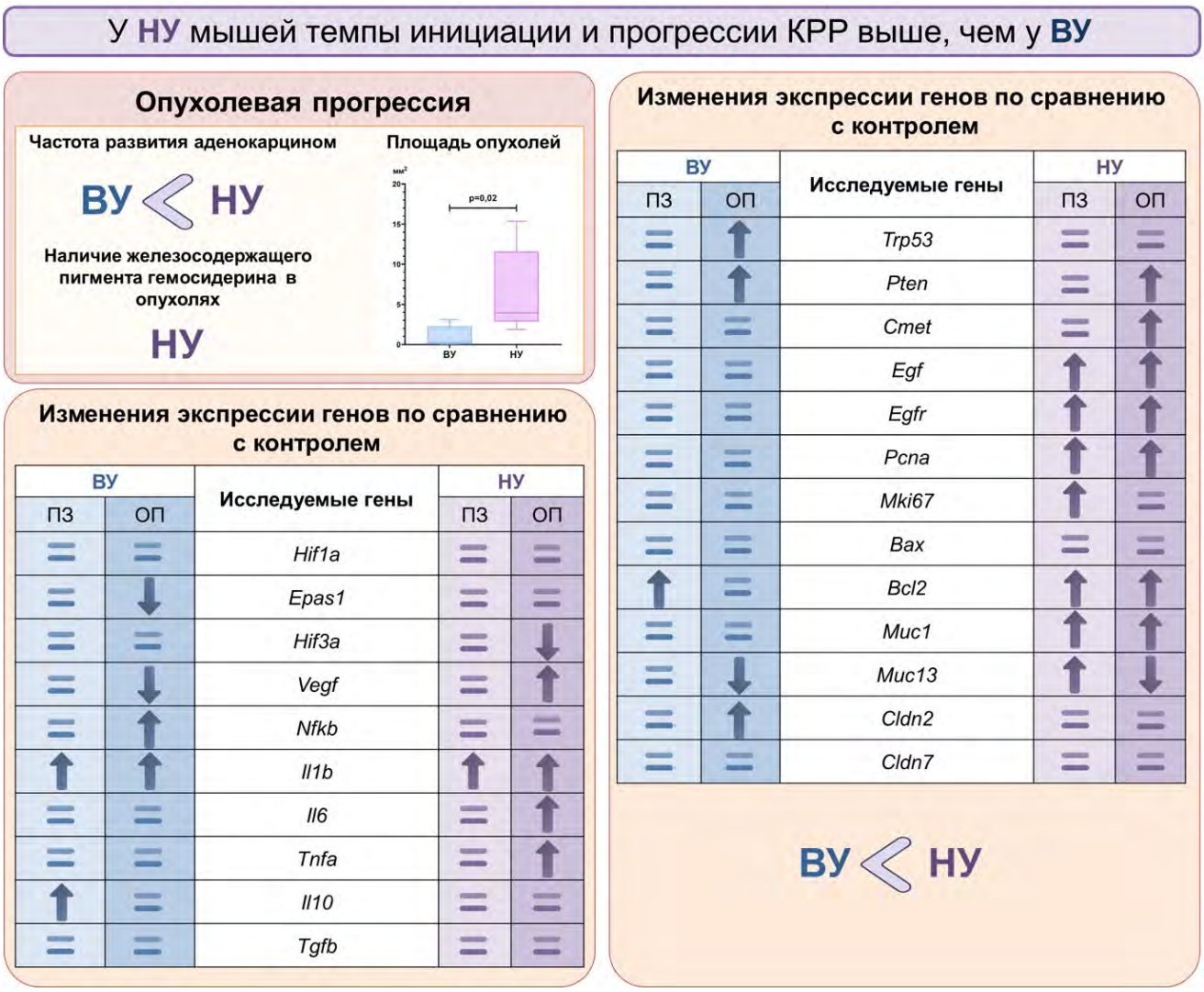


Рис. 3.5.46. Суммарные результаты исследования особенностей инициации и прогрессии колит-ассоциированного КРР у ВУ и НУ мышей. ОП – опухоль, ПЗ – перитуморальная зона, стрелки – изменения по сравнению с контрольной группой, < и > – различия между ВУ и НУ

В контрольной группе НУ мышей в ободочной кишке выявлены более высокие уровни экспрессии генов *Hif1a, Hif3a, Nfkb, Il10, Trp53, Bax* и *Cldn2,* в то время как у ВУ была выше экспрессия *Pten, Cmet, Egfr, Bcl2, Muc1, Muc13* и *Cldn7* (рис. 3.5.47).

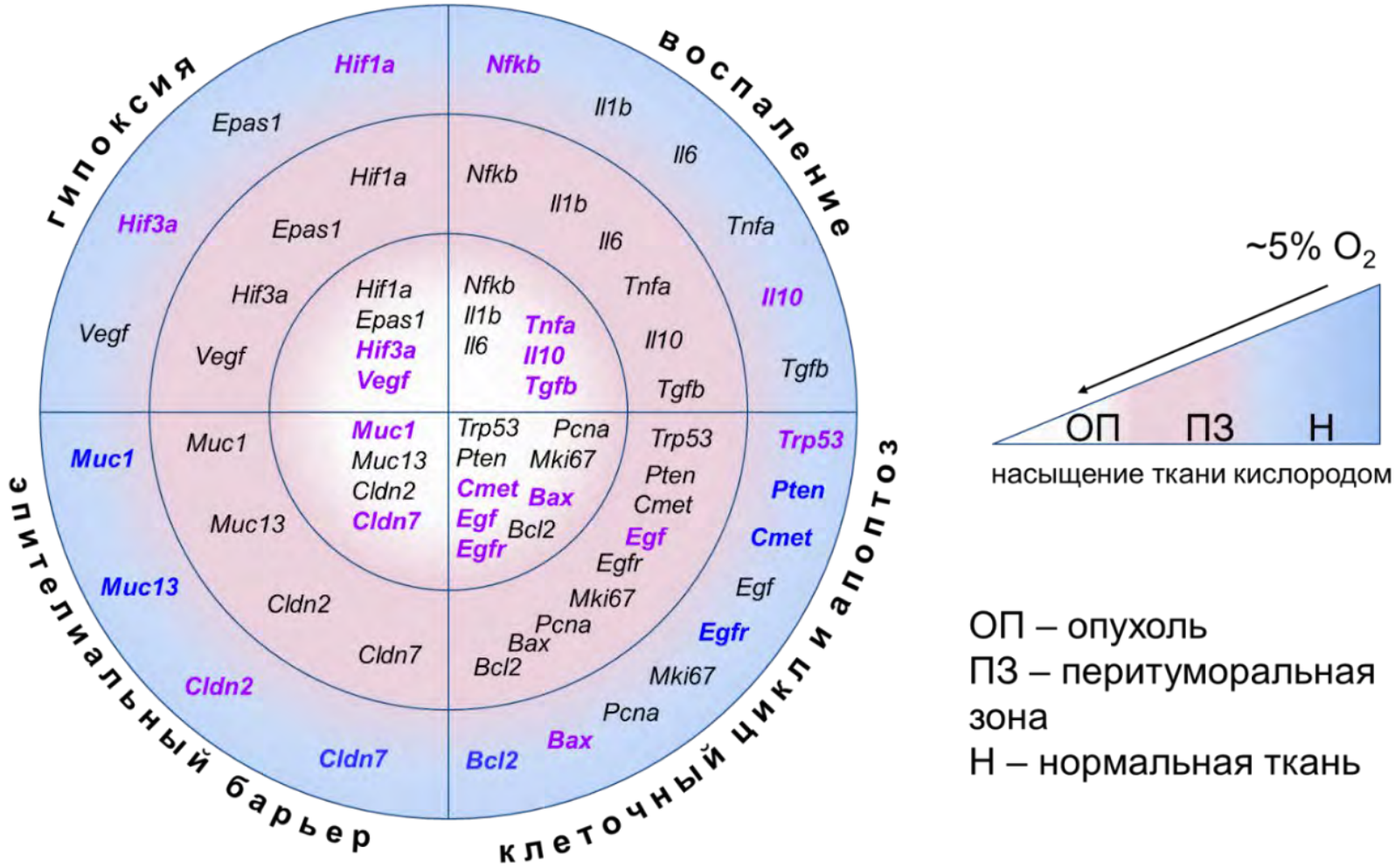


Рис. 3.5.47. Различия в экспрессии генов *Hif1a*, *Epas1*, *Hif3a*, *Vegf*, *Nfkb*, *Tnfa*, *Il1b*, *Il6*, *Il10*, *Tgfb*, *Trp53*, *Pten*, *Cmet*, *Egf*, *Egfr*, *Pcna*, *Mki67*, *Bax*, *Bcl2*, *Muc1*, *Muc13*, *Cldn2* и *Cldn7* в тканях ободочной кишки у ВУ и НУ мышей контрольных групп (Н, нормальная ткань), в опухолях (ОП) и перитуморальной зоне (ПЗ) у мышей опытных групп. За нормальное насыщение ткани принято среднее содержание кислорода в эпителиальных клетках толстой кишки (Zheng et al., 2015; Singhal и Shah, 2020). Жирный шрифт синего цвета – более высокий уровень экспрессии генов у ВУ животных, жирный шрифт фиолетового цвета – более высокий уровень экспрессии генов у НУ мышей

При колит-ассоциированном КРР только у ВУ мышей наблюдалось расширение коркового вещества долек тимуса по сравнению с контрольной группой, а у НУ изменений не выявлено. Только у ВУ животных через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН по сравнению с контрольной группой выявлено увеличение числа тимических телец в виде кистоподобных полостей, их число было статистически значимо выше по сравнению с НУ мышами. Только у НУ мышей обнаружено расширение светлых центров лимфоидных узелков селезенки. У НУ мышей выявлены более выраженные изменения субпопуляционного состава клеток БЛУ – только у них повышалось абсолютное и относительное число В-лимфоцитов и NK клеток, абсолютное количество цитотоксических Т-лимфоцитов, а также снижалось относительное число макрофагов. Содержание F4/80+ макрофагов, CD19+ В-лимфоцитов, CD3+CD4+ Т-лимфоцитов и NK клеток в опухолях у животных с разной устойчивостью к гипоксии не различалось, однако абсолютное и относительное число CD3+CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов было выше у НУ мышей. По данным проточной цитофлуориметрии только у НУ животных в опытной группе по сравнению с контрольной в крови повышалось относительное и абсолютное количество CD19+ В-лимфоцитов, относительное – CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов, но снижалось абсолютное число CD3+CD4+ Т-лимфоцитов. Абсолютное и относительное число CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов и NK клеток в периферической крови при колит-ассоциированном КРР было выше у НУ мышей по сравнению с ВУ. У ВУ мышей опытной группы выявлено увеличение относительного количества моноцитов, которое было выше по сравнению с НУ животными. Только у НУ мышей опытной группы выявлено увеличение нейтрофильно-лимфоцитарного индекса (NLR) по сравнению с контрольной группой (рис. 3.5.48).

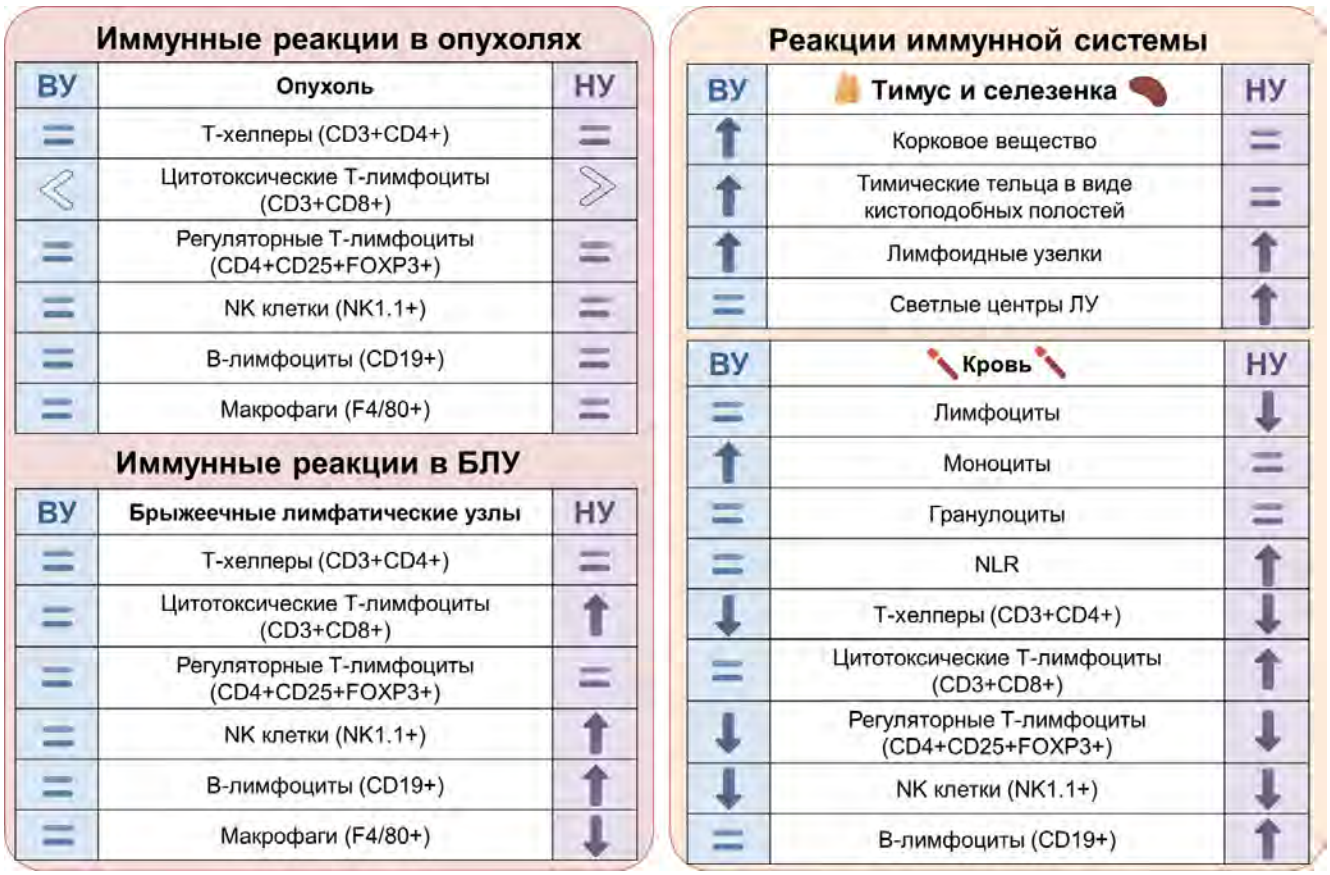


Рис. 3.5.48. Суммарные результаты исследования иммунных реакций при колит-ассоциированном КРР у ВУ и НУ мышей. БЛУ – брыжеечные лимфатические узлы, ЛУ – лимфоидные узелки, NLR – нейтрофильно-лимфоцитарный индекс, стрелки – изменения по сравнению с контрольной группой, < и > – различия между ВУ и НУ животными опытных групп

Среди всех опухолей КРР занимает третье место по заболеваемости и второе по смертности в мире (Bray et al., 2024). Известно, что колит-ассоциированный КРР толстой кишки развивается в результате дисплазии эпителия на фоне хронического воспаления у пациентов с хроническим ЯК, при этом риск его развития зависит от длительности течения ВЗК (Schmitt и Greten, 2021; Shah и Itzkowitz, 2022). Среднее время от установления диагноза ВЗК до КРР составляет 17 лет, при этом у 21% пациентов опухоли развивались в течение 10 лет после начала заболевания (Brackmann et al., 2009). Риск колит-ассоциированного КРР, по-видимому, связан с различными факторами, такими как возраст на момент постановки диагноза, длительность заболевания и тяжесть ЯК (Yamamoto-Furusho и Gutierrez-Herrera, 2025). Так как мы выявили различия в тяжести течения острого и хронического ЯК у ВУ и НУ мышей, вероятно, одним из факторов возникновения КРР на фоне хронического колита может быть индивидуальная устойчивость организма к гипоксии.

Поскольку через 70 сут после введения АОМ частота развития, площадь опухолей и их морфологические варианты не различались между ВУ и НУ мышами (Dzhalilova et al., 2024в), в связи с этим длительность эксперимента была увеличена в два раза, то есть до 140 сут, что позволило оценить различия в темпах прогрессии колит-ассоциированного КРР между

животными с разной устойчивостью к гипоксии (Dzhalilova et al., 2024a). В этот срок нами исследованы клеточные и молекулярно-биологические особенности опухолевого процесса и морфофункциональные различия реакций иммунной системы у животных с разной устойчивостью к гипоксии.

Показано, что через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН частота развития опухолей в дистальном отделе ободочной кишки у НУ мышей в 2 раза выше по сравнению с ВУ. Кроме того, у НУ животных все опухоли (100%, 8 из 8) были представлены аденокарциномами, в то время как у ВУ – только 14% (1 из 7), а остальные – железистой интраэпителиальной неоплазией (86%, 6 из 7). Площадь опухолей была статистически значимо выше у НУ животных. По данным морфологического исследования опухоли локализовались преимущественно в дистальном отделе ободочной кишки, что соответствует левосторонней локализации у человека (Stintzing et al., 2017). Большинство случаев КРР на фоне ЯК у человека развиваются из диспластических поражений, которые могут быть полиповидными, плоскими, локализованными или мультифокальными. Дисплазия определяется как неопластическое изменение эпителия, которое остается ограниченным базальной мембраной без инвазии в СПСО (Lakatos и Lakatos, 2008). При ЯК в большинстве случаев дисплазия возникает в левом или дистальном отделе толстой кишки (Pascal, 1994; Digestive System Tumours WHO Classification of Tumours, 5th Edition; Yamamoto-Furusho и Gutierrez-Herrera, 2025). Механизмы ЯК и колит-ассоциированного КРР тесно связаны, поэтому разделить их невозможно и КРР рассматривается как конечная стадия ЯК (Yamamoto-Furusho и Gutierrez-Herrera, 2025). Базовым стандартом наблюдения за дисплазией и неоплазией при ЯК является колоноскопия. В настоящее время контрольные колоноскопии проводят через 8-10 лет после постановки диагноза или появления симптомов ЯК в соответствии с последними рекомендациями, однако наблюдение должно быть персонализировано с учетом факторов риска развития КРР (Yamamoto-Furusho и Gutierrez-Herrera, 2025). В дальнейшем достижения в области молекулярной генетики и неинвазивных технологий диагностики позволят улучшить качество скрининга и эпидемиологического надзора за дисплазией среди населения с ЯК (Гусев, 2022). Нами показано, что одним из факторов возникновения КРР на фоне хронического ЯК является индивидуальная устойчивость организма к гипоксии. Железистая интраэпителиальная неоплазия является более ранним проявлением КРР, а аденокарцинома – более поздним, следовательно, темпы развития колит-ассоциированного КРР у ВУ мышей ниже. Очевидно, что у НУ организмов процесс опухолевой трансформации на фоне хронического воспаления происходит быстрее, поэтому для них необходима более ранняя диагностика и профилактика. Таким образом, необходим поиск неинвазивных способов определения индивидуальной устойчивости организма к гипоксии.

Быстрые темпы опухолевой прогрессии у НУ животных могут быть связаны как с особенностями экспрессии различных групп генов, так и с реакциями иммунной системы и тяжестью СВО.

Экспрессия тех или иных генов при опухолевых заболеваниях различна, поэтому ее определение является одним из способов диагностики, прогнозирования и оценки эффективности лечения в клинических условиях. Наиболее точным методом для такого анализа является секвенирование единичных клеток, однако этот способ требует большой технической базы и позволяет выполнить ограниченное количество исследований, что затрудняет его применение в клинической практике, где работа направлена на быстрое получение большого количества результатов (Sklavenitis-Pistofidis et al., 2021). На сегодняшний день разработано множество других технологических подходов для анализа экспрессии генов (Narrandes и Xu, 2018), одним из которых является используемый в нашей работе метод ПЦР в режиме реального времени. К его преимуществам можно отнести воспроизводимость, относительную простоту, низкую стоимость и высокую скорость анализа полученных данных, что делает его одним из основных методов, применяемых в клинической практике. Однако этот метод имеет свои недостатки и ограничения. Наиболее значимым из них является то, что материалом для исследования в условиях клиники обычно являются фиксированные в формалине парафинированные биопсийные образцы (FFPE, Formalin-Fixed Paraffin-Embedded). Несмотря на то, что существуют различные коммерческие наборы для выделения нуклеиновых кислот из таких проб (Belder et al., 2016), качество материала варьирует, что связано с большими потерями РНК в ходе экстракции и гетерогенностью ткани опухоли (Zhang et al., 2017). В данной работе забор фрагментов опухоли и перитуморальной зоны проводили под контролем бинокуляра (х7), материал для исследования немедленно переносили в фиксатор IntactRNA («Евроген», Россия), что не приводило к снижению выхода РНК на этапе выделения.

При прогрессии опухоли и достижении размера более 400 мкм, в ее центре создается гипоксическая среда, так как O_2 и питательные вещества способны диффундировать из крови в ткани только на 200 мкм (Grimes et al., 2014; Däster et al., 2017; Riffle и Hegde, 2017). В связи с этим, перитуморальную зону, состоящую из клеток в стадии опухолевой трансформации в условиях развивающейся гипоксии, можно назвать «переходной зоной» между неопухолевой тканью с достаточным кислородным снабжением, и собственно опухолью, находящейся в условиях хронической гипоксии (Aran et al., 2017; Curtius et al., 2018; Rastogi et al., 2023). Биоэнергетика клеток в этих зонах различается и зависит от длительности их пребывания в состоянии кислородного дефицита. Показано, что в прилегающих к опухоли тканях по сравнению с неопухолевыми образцами наблюдается активация различных клеточных процессов (организация везикул и переход из эндоплазматического ретикулума в аппарат Гольджи,

движение митохондрий, клеточное дыхание и катаболизм органических молекул) и их подавление (активация апоптоза) (Sorokin et al., 2023). Транскриптомы тканей перитуморальной зоны оказались более информативными при построении прогностических моделей рецидива у пациентов с КРР, чем измерения экспрессии генов непосредственно в опухоли (Kim et al., 2023). Поэтому мы проводили анализ экспрессии генов, регулирующих ответ на гипоксию, воспаление, контролирующих клеточный цикл, апоптоз и кодирующих компоненты эпителиального барьера как в опухолях, так и в перитуморальной зоне.

По нашим данным уровни экспрессии генов Hif1a и Hif3a в дистальном отделе ободочной кишки были выше у НУ мышей контрольной группы по сравнению с ВУ, а Epas1 (Hif2a) и Vegf – статистически значимо не различались. Содержание белка HIF-1α в сыворотке крови было выше у НУ мышей контрольной группы по сравнению с ВУ. По данным литературы и нашим предыдущим данным НУ животные характеризуются более высокой экспрессией *Hif1a* и содержанием белка HIF-1α в разных органах по сравнению с ВУ в условиях нормоксии (Kirova et al., 2013; Dzhalilova et al., 2019a), что согласуется с полученными нами данными. Однако сведений о зависимости уровня экспрессии *Epas1 (Hif2a)* и *Hif3a* от исходной устойчивости к гипоксии в литературе не представлено. На клеточных линиях человека показано, что HIF-1α регулирует ответ на острый недостаток кислорода (менее 2 ч при 0,5% O_2), а HIF-2α – на длительный (более 14 ч при 0,5% O_2), при этом за их переключение отвечает HIF-3α и некоторые микроРНК (Janaszak-Jasiecka et al., 2016; Silina et al., 2023). Впервые выявленная в нашей работе высокая экспрессия *Hif3a* в ободочной кишке у НУ мышей контрольной группы на фоне отсутствия различий в экспрессии *Epas1 (Hif2a)* по сравнению с ВУ животными может быть как предсуществующей, так и связанной с адаптацией к условиям сублетальной гипоксии при определении устойчивости организма к недостатку кислорода в барокамере, так как по данным M. Jaskiewicz и соавт. (2022) изоформа HIF-3α активна наиболее продолжительный промежуток времени (более 48 ч) после тяжелого гипоксического воздействия на клетки.

В тканях опухоли по сравнению с контрольной группой у ВУ мышей уровни экспрессии генов Epas1 (Hif2a) и Vegf были ниже. Показано, что высокая экспрессия *EPAS1* связана с меньшей выживаемостью во многих типах опухолей (Yazdani и Sirous, 2022). Активация HIF-2α выявлена во многих опухолях, что стимулирует VEGF (Toledo et al., 2023). Показано, что ингибирование HIF-2α способствует гибели опухолевых клеток и активации опухолевого супрессора p53, а также снижает содержание VEGF (Bertout et al., 2009; Wang et al., 2023г). Ингибирование VEGF в опухолях является одним из современных подходов к их терапии (Kang et al., 2024). В настоящее время разрабатываются препараты, направленные на снижение активности HIF-2α при развитии опухолей. Например, результаты клинических исследований II фазы показали, что применение Belzutifan (MK-6482), который селективно блокирует HIF-2α, ингибирует

прогрессию опухолей у пациентов со светлоклеточным раком почки (Jonasch et al., 2023). Он может использоваться для лечения взрослых пациентов с VHL-ассоциированным светлоклеточным раком почки, гемангиобластомой ЦНС и нейроэндокринными опухолями поджелудочной железы (Toledo et al., 2023; Zhang et al., 2023г).

При анализе биопсийных образцов пациентов с КРР получен противоречивый результат относительно прогностической значимости экспрессии *EPAS1* и содержания белка HIF-2α. Показано, что их увеличение коррелирует с неблагоприятным прогнозом (Yoshimura et al., 2004; Chen et al., 2013). Однако S. Rasheed и соавт. (2009) не выявлено взаимосвязи повышенного уровня экспрессии *EPAS1* и содержания белка HIF-2α, а Y. Baba и соавт. (2010) установлена обратная зависимость уровня экспрессии *EPAS1* от степени злокачественности опухоли, а также экспрессии *HIF1A*. На модели КРР, ассоциированного с хроническим ЯК, показано, что увеличение содержания HIF-1α в клетках эпителия кишки не приводит к прогрессии опухолей. При этом опосредованное HIF-2α воспаление способствует развитию опухолей ободочной кишки, а его активация при остром колите обусловливает тяжелое течение заболевания (Triner и Shah, 2016). Высокое содержание HIF-2α способствует окислительному стрессу, пролиферации клеток, росту опухоли, накоплению железосодержащего пигмента гемосидерина и прогрессии КРР (Ma et al., 2017; Singhal et al., 2021). Противоречивость данных о роли HIF-2α в прогрессии опухолей может быть обусловлена тем, что в исследованиях не учитывали индивидуальную устойчивость к гипоксии.

По нашим данным накопление железосодержащего пигмента гемосидерина в опухолях при окрашивании по Перлсу выявлено только у НУ мышей. По сравнению с контрольной группой в опухолях у НУ животных был выше уровень экспрессии гена Vegf, но ниже – Hif3a, а уровни экспрессии генов Hif1a и Epas1 не различались. В работе X. Xue и соавт. (2012) при анализе накопления железосодержащего пигмента гемосидерина в тканях с использованием окрашивания по Перлсу было показано значительное увеличение его накопления в опухолях толстой кишки (Xue et al., 2012). С использованием биопсийного материала показано, что накопление железа в аденомах и карциномах толстой кишки сопровождается высоким содержанием белка DMT-1 (Divalent Metal Transporter-1) (Xue et al., 2012). В свою очередь промотор гена, кодирующего этот белок, имеет сайт связывания для HIF-2α, регулирующего экспрессию *Dmt1a* (Shah et al., 2009). Вероятно, активация экспрессии *Epas1* у НУ мышей происходит в более ранние сроки после введения АОМ и способствует увеличению пролиферации клеток, нарушению метаболизма железа и его накоплению, а также активации экспрессии *Vegf* и, в конечном итоге, усилению роста опухоли. Высокий уровень экспрессии *Vegf*, возможно, связан с активацией его экспрессии изоформами HIF-1α и HIF-2α, которые реализуют ответ на недостаток кислорода в разные сроки гипоксического воздействия (Loboda et

al., 2010). VEGF является ранним прогностическим фактором неблагоприятного течения КРР, эффективности химиотерапии и лучевой терапии (Mazeda et al., 2020). Высокое содержание VEGF коррелирует с увеличением количества микрососудов в опухолях толстой кишки и взаимосвязано с метастазированием, неблагоприятным прогнозом и низкой выживаемостью пациентов (Balasubramanian et al., 2022; Kang et al., 2024; Zeng и Fu, 2025).

У НУ животных в опухолях по сравнению с контрольной группой снижался уровень экспрессии Hif3a, но был выше по сравнению с ВУ. Как обсуждалось выше, НУ животные контрольной группы по сравнению с ВУ характеризовались высоким уровнем экспрессии *Hif3a*. Вероятно, поэтому в опытной группе уровень экспрессии *Hif3a* также был повышен по сравнению с ВУ, однако снижался по сравнению с контрольной группой. Данные литературы о роли HIF-3α в прогрессии опухолей немногочисленны и противоречивы. Роль изоформы HIF-3α в развитии опухолевых заболеваний наименее изучена по сравнению с другими изоформами, однако существующие немногочисленные данные свидетельствуют о супрессорном эффекте этой изоформы по сравнению с HIF-1α и HIF-2α. По данным B. Yazdani и H. Sirous (2022) у пациентов с высоким уровнем экспрессии *HIF3A* в разных опухолях выживаемость выше. Напротив, при КРР высокая экспрессия *HIF3A* и содержание белка HIF-3α в опухолях коррелируют со снижением выживаемости, кроме того, HIF-3α способствует ЭМП и метастазированию (Xue et al., 2016; Villareal et al., 2024). Так как HIF-3α является наименее изученной изоформой HIF, необходимо проведение дополнительных исследований о его роли в развитии опухолей у ВУ и НУ животных.

В перитуморальной зоне по сравнению с опухолью у ВУ мышей уровни экспрессии генов Hif1a, Epas1 и Hif3a были статистически значимо выше, а у НУ – не различались. Вероятно, у ВУ мышей в перитуморальной зоне наблюдается переход от реакции на периодически возникающую острую гипоксию на нарушения метаболизма, характерные для хронической гипоксии (так называемый «HIF switch»), так как в норме разные изоформы α-субъединицы HIF активны в разные временные сроки гипоксического воздействия (Appelhoff et al., 2004; Heikkilä et al., 2011; Rastogi et al., 2023). В то же время изменений в экспрессии изоформ α-субъединицы *Hif* у НУ мышей не наблюдалось, так как, возможно, произошел синтез белков HIF-1α, HIF-2α и HIF-3α, которые за счет связывания с HREs в промоторе гена *Vegf* активировали его экспрессию (Budde et al., 2005), в то время как мРНК *Hif1a*, *Epas1* и *Hif3a* подверглись деградации.

Таким образом, процесс опухолевого роста у НУ мышей происходит быстрее, чем у ВУ и характеризуется различиями в уровне экспрессии генов, регулирующих ответ на гипоксию – *Hif1a, Epas1, Hif3a* и *Vegf.*

Известно, что в результате гипоксического воздействия может активироваться экспрессия *Nfkb* (Korbecki et al., 2021), а белок NF-κB имеет сайты связывания в гене, кодирующем белок

HIF-1α, за счет чего может регулировать его функционирование (Rius et al., 2008). Следовательно, клеточные ответы на гипоксию и воспаление взаимосвязаны.

В дистальном отделе ободочной кишки у НУ мышей контрольной группы по сравнению с ВУ были выше уровни экспрессии генов Nfkb и Il10. Вероятно, более высокая экспрессия *Nfkb* у НУ животных контрольной группы связана с высоким уровнем экспрессии *Hif1a* в ободочной кишке по сравнению с ВУ. Кроме того, согласно литературным данным, гипоксическое воздействие приводит к изменению репертуара микробиоты кишки (Qi et al., 2023), что может индуцировать развитие воспаления (Kole и Maloy, 2014). Фоновая активация NF-κB необходима для поддержания целостности кишечного барьера путем регуляции пролиферации, дифференцировки и выживаемости клеток, а также посредством взаимодействия между иммунной системой слизистой оболочки и резидентной микробиотой кишки (Kondylis et al., 2017). Более высокий уровень *Il10* у НУ животных связан с активацией противовоспалительного звена иммунного ответа и обусловлен компенсаторной реакцией на высокий уровень экспрессии *Nfkb* для нивелирования его эффектов (Papoutsopoulou et al., 2022). Таким образом, НУ животные контрольной группы характеризуются провоспалительным фенотипом клеток по сравнению с ВУ. Исходно высокий уровень экспрессии *Nfkb* и «провоспалительный фон» у НУ животных могут обусловливать быструю прогрессию опухолей, так как показано, что на ранних стадиях, в условиях достаточного содержания O_2, развитие опухолей во многом зависит от NF-κB (Rastogi et al., 2023).

В ткани опухолей у ВУ мышей выявлена высокая экспрессия Nfkb и Il1b, которая сочеталась с высокой экспрессией Il1b, Il10 и Tgfb в перитуморальной зоне. Известно, что экспрессия генов провоспалительных и противовоспалительных цитокинов зависит от активации NF-κB (Liu et al., 2017) и наблюдается на ранних этапах развития опухолей, возникающих на фоне хронического воспаления (Rastogi et al., 2023). Активация NF-κB и повышение содержания провоспалительного цитокина IL-1β способствуют выживаемости клеток и ингибированию апоптоза, в том числе за счет увеличения экспрессии *Bcl2* (Simonart и Van Vooren, 2002; Li et al., 2020б). Высокий уровень экспрессии противовоспалительных цитокинов *Il10* и *Tgfb* в перитуморальной зоне у ВУ животных может быть обусловлен регуляцией по типу отрицательной обратной связи для снижения высокого уровня провоспалительных цитокинов (Saraiva и O'Garra, 2010; Yun et al., 2019). По данным молекулярно-биологического исследования очевидно, что у ВУ мышей опухолевый процесс в ободочной кишке находится на начальных этапах, что подтверждается данными морфологического исследования.

По сравнению с контрольной группой у НУ мышей наблюдалось увеличение уровней экспрессии генов Tnfa и Il6 в опухоли, а также Il1b как в опухоли, так и в перитуморальной зоне. По сравнению с ВУ у НУ мышей в опухолях были выше уровни экспрессии провоспалительного

цитокина Tnfa и противовоспалительных Il10 и Tgfb. По данным литературы при моделировании колит-ассоциированного КРР, индуцированного с помощью АОМ и ДСН, наблюдается значительное увеличение содержания IL-1β и IL-10 в ободочной кишке (Kimura et al., 2023). Рост опухоли сопровождается ее инфильтрацией макрофагами, которые синтезируют TNF-α (Eisermann et al., 2013), а в экспериментах на культуре макрофагов нами показано, что для НУ животных характерна более высокая экспрессия провоспалительных цитокинов *Il1b* и *Tnfa* по сравнению с ВУ (Dzhalilova et al., 2023в). Таким образом, высокая экспрессия *Il1b* и *Tnfa* в опухолях и *Il1b* в перитуморальной зоне у НУ животных может быть связана с миграцией макрофагов в зону опухолевого роста, что подтверждается данными гистологического исследования, при котором была выявлена значительная инфильтрация стромы опухолей и перитуморальной зоны лимфоцитами и макрофагами. TNF-α, IL-1β и IL-6 в неопухолевых и опухолевых клетках могут активировать EGFR (Lee et al., 2015; Roy et al., 2024). IL-6 играет важную роль в процессах инвазивного роста и метастазирования злокачественных опухолей. Он способен активировать синтез VEGF и таким образом влиять на ангиогенез и васкуляризацию опухоли, а также индуцировать продукцию IL-10 как на местном, так и на системном уровнях, что способствует формированию иммуносупрессивного микроокружения и прогрессии опухоли (Hara et al., 2017; Carlini et al., 2023). Более высокий уровень противовоспалительных цитокинов *Il10* и *Tgfb* у НУ животных по сравнению с ВУ может быть также обусловлен регуляцией по типу отрицательной обратной связи (Saraiva и O'Garra, 2010; Yun et al., 2019). Таким образом, у НУ мышей рост опухолей сопровождается более выраженным локальным воспалением. При колит-ассоциированном КРР, индуцированном АОМ, наблюдается повышение синтеза провоспалительных цитокинов, продукции АФК, VEGF и активация PI3K/AKT/mTOR и MAPK путей (Kabel et al., 2021). Полученные нами данные о различиях темпов инициации и прогрессии колит-ассоциированного КРР в зависимости от устойчивости к гипоксии необходимо учитывать при проведении экспериментальных исследований на модели с использованием АОМ и ДСН, и при тестировании эффективности различных противоопухолевых препаратов на животных.

У ВУ мышей в опухолях повышалась экспрессия обоих опухолевых супрессоров – и Trp53, и Pten, в то время как у НУ – только Pten. В норме p53 и PTEN являются супрессорами роста опухоли, а также критическими факторами контрольных точек клеточного цикла (Levine и Oren, 2009; Fedorova et al., 2022). Известно, что p53 активируется в ответ на повреждение ДНК, окислительный стресс, избыток факторов роста и другие онкогенные стимулы и координирует ключевые клеточные реакции – апоптоз, аутофагию, остановку клеточного цикла, репарацию ДНК и т.д., которые ингибируют рост опухолей (Chen et al., 2020a; Liebl и Hofmann, 2021). Опухолевый супрессор p53 ингибирует PI3K/AKT/mTOR и MAPK, а также может снижать продукцию VEGF (Pal et al., 2001; Song et al., 2015), поэтому, вероятно, что снижение уровня

экспрессии *Vegf* у ВУ животных в опухолях обусловлено повышением экспрессии *Trp53.* Путем взаимодействия с p53, PTEN повышает его стабильность и транскрипционную активность, что приводит к остановке клеточного цикла (Salvatore et al., 2019).

В дистальном отделе ободочной кишки у ВУ мышей контрольной группы по сравнению с НУ были выше уровни экспрессии генов Egfr и Cmet. EGFR является рецептором для EGF, при связывании с которым в клетках запускаются сигнальные каскады (PI3K/AKT/mTOR, MAPK и др.), приводящие к пролиферации и миграции (Ghosh et al., 2010; Stefani et al., 2021). Известно, что эпителиальные клетки толстой кишки обновляются примерно за 4-7 сут (Fritsch et al., 2023). В норме рецептор c-MET активируется лигандом HGF (Hepatocyte Growth Factor, фактор роста гепатоцитов) и регулирует процессы регенерации, клеточной адгезии и дифференцировки (Armstrong et al., 2021). Вероятно, у ВУ мышей, как и у ВУ крыс, репаративные процессы более выражены, чем у НУ (Diatroptova et al., 2023), в том числе из-за наличия большего количества рецепторов на поверхности их эпителиальных клеток.

По сравнению с контрольной группой у НУ мышей в опухолях выявлено увеличение уровней экспрессии генов Pten, Egf, Egfr, Cmet и Pcna, а в перитуморальной зоне – Egf, Egfr, Mki67 и Pcna. При ИГХ выявлении белка EGFR более выраженная реакция обнаружена в опухолях у НУ животных по сравнению с ВУ. Высокая экспрессия как *Egf,* так и *Egfr* в опухолях и в перитуморальной зоне у НУ животных может быть связана с активной пролиферацией опухолевых клеток и, соответственно, более высокими темпами канцерогенеза. По данным литературы повышенная экспрессия *EGF* наблюдается в 70-75% случаев КРР (Khong et al., 2013), а *EGFR* – ассоциирована с различными типами рака, в том числе КРР, раком молочной железы и немелкоклеточным раком легких (Wang et al., 2020a). Повышенное содержание EGFR связано с более поздней стадией прогрессии опухоли и неблагоприятным прогнозом у пациентов с КРР (Pabla et al., 2015; Nemanqani et al., 2018). Активация таких сигнальных путей, как PI3K/AKT/mTOR и MAPK за счет связывания EGF с EGFR, ингибирует p53, который, напротив, ингибирует PI3K/AKT/mTOR и MAPK (Abraham и O'Neill, 2014; Song et al., 2015). Кроме того, к активации PI3K/AKT/mTOR приводит связывание c-MET с HGF (Hervieu и Kermorgant, 2018). Активируясь за счет связывания HGF, c-MET индуцирует ангиогенез, миграцию клеток, пролиферацию и ингибирует апоптоз (Comoglio et al., 2018). По данным литературы высокая экспрессия *MET*, кодирующего белок c-MET у человека, встречается при различных опухолевых заболеваниях и связана с неблагоприятным прогнозом (Rivas et al., 2022). Высокое содержание c-MET при раке молочной железы коррелирует с быстрым ростом опухоли, ее метастазированием, устойчивостью к лучевой терапии и низкой общей выживаемостью пациентов (De Bacco et al., 2011; Sierra и Tsao, 2011). По-видимому, в опухолях и перитуморальной зоне у НУ мышей за счет повышения экспрессии *Egf, Egfr* и *Cmet* активируется

PI3K/AKT/mTOR сигнальный путь, регулирующий пролиферацию клеток, выживаемость, способность к миграции и др. (Hervieu и Kermorgant, 2018). PI3K стимулирует синтез ДНК и прохождение клеточного цикла через взаимодействие регуляторной субъединицы p55PIK с PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) (Wang et al., 2013). EGFR способствует связыванию PCNA с ДНК и выживанию опухолевых клеток (Wang et al., 2024a). По данным литературы маркер пролиферации Ki-67 может отражать активацию сигнального пути PI3K/AKT/mTOR (Zhou et al., 2021). Поэтому мы исследовали уровни экспрессии *Mki67*, а также другого маркера пролиферации – *Pcna*.

Только у НУ мышей как в опухолях, так и в перитуморальной зоне наблюдалась высокая экспрессия Pcna, а экспрессия Mki67 увеличивалась только в перитуморальной зоне. При этом у ВУ животных статистически значимых различий по сравнению с контрольной группой выявлено не было. По данным ИГХ выявления белка Ki-67 более выраженная реакция обнаружена в перитуморальной зоне по сравнению с опухолями. Маркером пролиферации клеток является Ki-67, оценка содержания которого используется для диагностики различных злокачественных новообразований (Li et al., 2015; Sun и Kaufman, 2018). Прогностическая значимость этого маркера при злокачественных опухолях остается спорной, так как в работах разных авторов показано как увеличение экспрессии и неблагоприятный исход, так и уменьшение экспрессии и улучшение прогноза (Liu et al., 2023). В исследованиях, проведенных на экспериментальной модели КРР, индуцированного АОМ и ДСН, показано, что содержание Ki-67 было выше при ЯК и колит-ассоциированной дисплазии по сравнению с нормальной тканью (Principi et al., 2014). При этом в образцах аденокарцином пациентов число Ki-67+ клеток было выше вне фронта инвазии, в котором пролиферация опухолевых клеток снижена (Jung et al., 2001). Белок PCNA играет важную роль в прогрессии КРР и может использоваться в качестве одного из маркеров риска злокачественной трансформации колоректальных аденом, поскольку его содержание коррелирует со степенью дисплазии и размером опухолей (Qasim et al., 2012). В экспериментах на мышах с КРР, индуцированным АОМ и ДСН, и клеточной линии рака толстой кишки мышей CT26 показано, что содержание белка PCNA в опухолевых клетках увеличено (Tan et al., 2020). По данным метаанализа высокое содержание белка PCNA связано с неблагоприятным прогнозом и может служить надежным прогностическим биомаркером у пациентов с КРР (Zhou et al., 2018).

Помимо пролиферации клеток одну из основных ролей в прогрессии опухолей играет митохондриальная дисфункция, приводящая к ингибированию внутреннего пути апоптоза. Белки BAX и Bcl-2, выполнящие проапоптотическую и антиапоптотическую функции, являются основными регуляторами данного процесса (Pryczynicz et al., 2014; Khodapasand et al., 2015), поэтому в работе проведена оценка уровней экспрессии генов *Bax* и *Bcl2*, а также соотношения *Bax*/*Bcl2*.

В дистальном отделе ободочной кишки у НУ мышей контрольной группы по сравнению с ВУ был выше уровень экспрессии проапоптотического гена Bax, но ниже – антиапоптотического Bcl2. Известно, что экспрессия и содержание BAX варьирует как внутри одного органа, так и у разных организмов (Yao et al., 2022). Высокий уровень экспрессии *Bax* в ободочной кишке у НУ мышей может быть обусловлен реакцией на сублетальное гипоксическое воздействие при определении устойчивости к гипоксии. Кроме того, высокий уровень экспрессии *Bax* в ободочной кишке у НУ мышей контрольной группы может быть связан с высокой экспрессией *Trp53* у этих животных. Известно, что p53 регулирует проапоптотический белок BAX (Chipuk et al., 2004). При этом показано, что результат активации p53 во многом определяется динамикой изменения его содержания – быстрая индукция p53 способствует апоптозу, тогда как медленная связана с выживанием клеток за счет регуляции антиапоптотических генов (Paek et al., 2016).

В нашей работе увеличения экспрессии гена Bax в опытных группах как у ВУ, так и у НУ мышей не выявлено. У ВУ животных уровень экспрессии гена Bcl2 повышался в перитуморальной зоне, а у НУ – как в перитуморальной зоне, так и в опухолях. Статистически значимое снижение соотношения Bax/Bcl2 наблюдалось как в перитуморальной зоне, так и в опухолях у НУ мышей, в то время как у ВУ животных изменений не выявлено. Продукт гена *Bcl2* белок Bcl-2 является антиапоптотическим фактором, участвующим в регуляции пролиферации клеток. Увеличение его активности приводит к ингибированию апоптоза, опухолевой трансформации и развитию злокачественных опухолей (Sadowska et al., 2014). Таким образом, в перитуморальной зоне как у ВУ, так и у НУ мышей происходит опухолевая трансформация клеток, характеризующаяся увеличением экспрессии *Bcl2*. По данным литературы, корреляции между экспрессией *Bax* и *Bcl2* и клинико-патологическими параметрами КРР не обнаружено, однако выявлена корреляция для показателя соотношения *Bax*/*Bcl2* (Khodapasand et al., 2015). 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).

В развитии ВЗК и колит-ассоциированного КРР важную роль играет нарушение барьерной функции эпителия (Antoni et al., 2014). Первым уровнем эпителиального барьера являются кишечная слизь и гликокаликс, состоящий из муцинов (Zolotova et al., 2019). Охарактеризовано более 20 генов, кодирующих муцины, основной функцией которых является защита апикальной мембраны от механических повреждений. Трансмембранные муцины, такие как MUC1, MUC3, MUC4, MUC13 и MUC17, локализуются на апикальных поверхностях эпителиальных клеток и образуют гликокаликс, который действует как защитный барьер между секретируемыми муцинами и нижележащими эпителиальными клетками (Grondin et al., 2020).

Другим важным компонентом эпителиального барьера толстой кишки являются клаудины – белки, образующие плотные контакты между клетками (Merga et al., 2014). Снижение содержания клаудинов выявлено при многих типах злокачественных опухолей, включая клаудин-2 и клаудин-6 при раке молочной железы и клаудин-18 при раке желудка (Jun et al., 2014; Jia et al., 2019). Предполагается, что снижение содержания белков плотных контактов, наблюдаемое во многих типах опухолей, способствует инвазии опухолевых клеток, нарушению гистоархитектоники и дифференцировки клеток. В то же время существуют данные о повышении содержания клаудинов при злокачественных опухолях (Cox et al., 2024).

Для оценки изменений барьерной функции эпителия ободочной кишки при прогрессии колит-ассоциированного КРР определяли уровни экспрессии генов *Muc1*, *Muc13*, *Cldn2* и *Cldn7*.

В дистальном отделе ободочной кишки у НУ мышей контрольной группы по сравнению с ВУ был выше уровень экспрессии Cldn2, но ниже – Muc1, Muc13 и Cldn7. Гипоксическое воздействие способно приводить к развитию воспалительных реакций в организме, в том числе в кишке (Du et al., 2019), поэтому определение устойчивости к недостатку кислорода могло оказать такой эффект на животных, однако на морфологическом уровне воспалительных изменений нами выявлено не было, поэтому, очевидно, что полученные данные отражают предсуществующие особенности организмов ВУ и НУ мышей. По данным литературы высокая экспрессия *Cldn2* способствует активации регенераторных процессов в слизистой оболочке толстой кишки (Ahmad et al., 2023), а *Cldn7* – поддержанию целостности эпителиального барьера (Marincola Smith et al., 2021). K. Wang и соавт. (2021) показано, что нокаут *Cldn7* способствовал развитию ДСН-индуцированного колита и КРР, он усугублял клинические симптомы, увеличивая воспалительные реакции в слизистой оболочке и повреждение эпителия, сопровождающиеся нарушением баланса пролиферации клеток и апоптоза. Целостность эпителиального барьера у нокаутных по *Cldn7* мышей была нарушена, а межклеточная проницаемость увеличена (Wang et al., 2021). Вероятно, у НУ мышей за счет более низкой экспрессии *Cldn7* может быть повышена проницаемость эпителиального барьера и чувствительность к развитию колита и КРР. Более высокая экспрессия *Muc1* и *Muc13* в контрольной группе у ВУ мышей по сравнению с НУ, очевидно, обеспечивает защиту эпителиальных клеток от повреждающих агентов, таких как ДСН.

По сравнению с контрольной группой у ВУ животных в опухолях выявлено снижение уровня экспрессии Muc13 и увеличение Cldn2. Уровень экспрессии Muc13 в перитуморальной зоне был выше по сравнению с опухолями, но не отличался от контрольной группы. Низкая экспрессия гена *Muc13* и высокое содержание белка MUC13 характерны для ВЗК (Sheng et al., 2011). Содержание MUC13 повышается при КРР, он может активировать NF-κB и ингибировать апоптоз, однако другие его функции недостаточно изучены (Sojka et al., 2023). С использованием

модели колит-ассоциированного КРР, индуцированного АОМ и ДСН, на мышах показано, что повышенное содержание CLDN2, с одной стороны, взаимосвязано с регенерацией эпителия крипт, а с другой стороны, препятствует развитию КРР (Ahmad et al., 2023). Вероятно, высокая экспрессия *Cldn2* у ВУ животных способствует регенерации эпителия крипт в ответ на воздействие АОМ и ДСН, а хроническое воспаление приводит к снижению количества бокаловидных клеток и, как следствие, экспрессии *Muc13*. *Следует отметить, что по нашим данным через 70 сут после введения АОМ и трех циклов потребления ДСН как у ВУ, так и у НУ мышей по сравнению с контрольными группами в зонах опухолей содержание бокаловидных клеток снижалось.* Выявленное нами снижение объемной доли бокаловидных клеток в опухолях согласуется с данными литературы (Wibowo et al., 2022) и, по-видимому, обусловливает снижение показателя экспрессии *Muc13* в опухолях.

По сравнению с контрольной группой у НУ мышей в опухолях выявлено снижение экспрессии Muc13, а в перитуморальной зоне – ее увеличение. Уровень экспрессии гена Muc1 повышался у НУ мышей как в опухолях, так и в перитуморальной зоне по сравнению с контрольной группой, и в опухолях был выше по сравнению с ВУ животными. Трансмембранный гликопротеин I типа – MUC1, в физиологических условиях участвует в адгезии и дифференцировке эпителиальных клеток, а при различных типах злокачественных опухолей опосредует их рост и прогрессию. Высокая экспрессия *Muc1* в процессе роста опухоли связана с усилением инвазии опухолевых клеток и метастазирования (Pinzón Martín et al., 2019; Szlendak et al., 2020). MUC1 может быть одним из факторов, активирующих EGFR (Ma et al., 2021). На нескольких опухолевых клеточных линиях показано, что EGFR активирует MUC1 (Dharmaraj et al., 2013), а MUC1 в свою очередь активирует EGFR (Engel et al., 2016). MUC1 взаимодействует с EGFR на клеточной мембране, с одной стороны, индуцируя его активацию, а с другой – активируя PI3K/AKT/mTOR путь, что было показано на клеточных линиях рака молочной железы человека (Kufe, 2013; Piyush et al., 2017).

Таким образом, НУ животные опытной группы характеризовались более интенсивным опухолевым ростом, что, предположительно, привело бы к их более ранней гибели по сравнению с ВУ. Выявленные различия в темпах инициации и прогрессии колит-ассоциированного КРР у животных с разной устойчивостью к гипоксии связаны с несколькими факторами. По данным литературы устойчивость к гипоксии коррелирует с общей физической активностью, способностью к инактивации токсинов, стрессоустойчивостью, а также пластичностью иммунной системы организма (Безруков и соавт., 2012). Кроме того, ВУ и НУ организмы характеризуются различиями в структурной организации и функциональной активности митохондрий в клетках коры головного мозга, печени и сердца, которые указывают на большую активность дыхательной цепи у ВУ животных по сравнению с НУ. Предполагается, что

энергетический обмен является одним из факторов, определяющих индивидуальную устойчивость к гипоксии и связанную с ней тяжесть течения различных заболеваний (Pavlik et al., 2018; Mironova et al., 2019). Кроме того, инициация, промоция и прогрессия опухолей у ВУ и НУ животных могут зависеть от функционирования иммунной системы. Как показано нами ранее, реакции клеточного и врожденного иммунитета были более выражены у ВУ крыс, а гуморального – у НУ (Dzhalilova et al., 2019б). Вероятно, эффективные защитные механизмы, включая более высокую активность ферментов антиоксидантной защиты, белков теплового шока и иммунного ответа, у ВУ животных способствуют меньшим темпам роста опухолей на фоне хронического воспаления по сравнению с НУ.

В последние годы увеличивается популярность гипотезы – «злокачественная опухоль как незаживающая рана», которая была выдвинута четыре десятилетия назад (Dvorak, 1986). Нормальная эпителиальная ткань существует в состоянии гомеостаза, где регенерация осуществляется за счет эпителиальных стволовых клеток, расположенных в высокоспециализированных нишах. Во время повреждения тканей восполнение потери эпителиальных клеток обеспечивается пролиферацией стволовых клеток в ответ на провоспалительные цитокины и факторы роста (Eming et al., 2007). Многочисленные факторы роста, продуцируемые макрофагами и лимфоцитами во время заживления ран, способствуют пролиферации клеток. Многие сигнальные пути и молекулярные механизмы, которые имеют решающее значение для заживления ран, вовлечены в пролиферацию опухолевых клеток и метастазирование (Sundaram et al., 2018). Пролиферация и миграция клеток – два ключевых процесса, необходимых для заживления ран и прогрессии опухолей, – во многом зависят от активации EGFR. Молекулы, участвующие как в заживлении ран, так и в онкогенезе, включают EGF, VEGF, TGF-β, HGF/c-Met, FGF и др. (Sundaram et al., 2018).

Нами показано, что экспрессия генов, регулирующих синтез EGF, VEGF, TGF-β и c-Met, была выше в опухолях у НУ мышей по сравнению с ВУ. При этом в контрольной группе НУ мышей по сравнению с ВУ в ободочной кишке была ниже экспрессия Cldn7, что может обусловливать высокую проницаемость эпителиального барьера кишки и чувствительность к развитию колита и КРР (Wang et al., 2021). Высокая экспрессия *Cldn2* в контрольной группе у НУ мышей по сравнению с ВУ, который в норме способствует заживлению слизистой оболочки кишки и регенерации крипт (Ahmad et al., 2023), может приводить к избыточной регенерации эпителия крипт и предрасположенности к развитию КРР.

Важную роль в более тяжелом течении колит-ассоциированного КРР у НУ мышей может также играть провоспалительный фенотип их клеток. В дистальном отделе ободочной кишки у НУ мышей контрольной группы по сравнению с ВУ были выше уровни экспрессии генов *Nfkb* и *Il10*, а также *Hif1a* и *Hif3a*. Вероятно, более высокая экспрессия *Nfkb* у НУ животных контрольной

группы связана с высоким уровнем экспрессии *Hif1a* по сравнению с ВУ. Исходно высокий уровень экспрессии *Hif1a, Nfkb* и «провоспалительный фон» могут обусловливать более высокие темпы инициации и прогрессии опухолей, так как показано, что они во многом зависят от активации HIF-1α и NF-κB (Rastogi et al., 2023).

В развитии опухолей ключевую роль играют реакции иммунной системы и активация противоопухолевого иммунитета. В опухолях развиваются воспалительные и иммунные реакции, сопровождающиеся системными проявлениями, которые могут быть выражены в разной степени. При значительной выраженности СВО он во многом определяет прогноз заболевания (Diakos et al., 2014).

По нашим данным содержание F4/80+ макрофагов, CD19+ B-лимфоцитов, CD3+CD4+ T-лимфоцитов и NK клеток в опухолях у животных с разной устойчивостью к гипоксии не различалось, однако число CD3+CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов в тканях опухолей у НУ мышей было статистически значимо выше по сравнению с ВУ. Вероятно, это свидетельствует о более выраженной активации противоопухолевого иммунитета у НУ мышей в ответ на быстрый процесс инициации и прогрессии опухолей. В то же время при КРР наблюдается значительное снижение противоопухолевого иммунитета, в основном за счет «ускользания» опухолевых клеток от иммунных (McLean et al., 2011; Shi et al., 2015). Показана роль различных типов иммунных клеток в стимуляции или ингибировании противоопухолевого иммунного ответа (Jin et al., 2021; Senosain et al., 2021). Инфильтрация опухолей цитотоксическими Т-лимфоцитами может определять прогноз выживаемости пациентов и ответ на иммунотерапию, однако недостаточно изучено, почему у некоторых пациентов наблюдается высокая инфильтрация опухолей цитотоксическими Т-лимфоцитами, а у других она практически отсутствует (Prokhnevska et al., 2023). Относительно взаимодействия Т-лимфоцитов с прогрессирующими опухолями предполагается, что CD8+ Т-лимфоциты становятся дисфункциональными (толерантными) в ходе онкогенеза и не вырабатывают эффекторные цитокины (IFN-γ и TNF-α) и цитотоксические молекулы, такие как гранзимы и перфорин (Hellstrom и Hellstrom, 2019). Поэтому несмотря на инфильтрацию CD8+ Т-лимфоцитами, опухоли прогрессируют (Philip и Schietinger, 2022). Например, массивная инфильтрация CD8+ Т-лимфоцитами при почечно-клеточном раке считается неблагоприятным прогностическим фактором (Dai et al., 2021).

Как через 70, так и через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН, метастазов в БЛУ, печени и легких как у ВУ, так и у НУ мышей не выявлено. В целом на модели КРР, индуцированного АОМ и ДСН, достаточно редко можно выявить метастазы, так как для их формирования необходим длительный срок после введения АОМ (Tanimura et al., 2021; Dzhalilova et al., 2023г). Для исследования поздних стадий прогрессии опухолей и процессов метастазирования преимущественно используют другие экспериментальные модели, например,

глиобластомы и карциномы легких Льюис (Janker et al., 2018; Skurikhin et al., 2022; Alekseeva et al., 2023; Sentyabreva et al., 2024).

Как уже упоминалось, одним из факторов, определяющих течение опухолевого процесса могут быть реакции иммунной системы и активация противоопухолевого иммунитета. Морфофункциональное состояние иммунной системы у ВУ и НУ животных как в контрольных, так и в опытных группах различалось.

*В контрольной группе у НУ мышей по сравнению с ВУ выявлена бо**л**ьшая объемная доля ПАЛМ-зон и меньшая объемная доля лимфоидных узелков в белой пульпе селезенки, большее число лейкоцитов, абсолютное и относительное количество лимфоцитов и моноцитов, абсолютное число NK клеток и CD3+CD4+ Т-лимфоцитов в периферической крови, а также меньшее абсолютное число CD3+CD4+ Т-лимфоцитов в БЛУ.* Полученные нами данные согласуются с нашими предыдущими исследованиями, выполненными на крысах Вистар с разной устойчивостью к недостатку кислорода (Dzhalilova et al., 2018, 2019a, б) и свидетельствуют о провоспалительном фенотипе иммунных клеток у НУ организмов.

Нарушения функционирования органов иммунной системы считаются важными факторами, определяющими тяжесть течения как хронических воспалительных, так и опухолевых процессов. Иммуносупрессивное действие опухоли на организм отчетливо проявляется в период опухолевой прогрессии. Установлено, что в процессе роста опухоли, особенно на этапе ее прогрессии, преимущественно нарушается клеточный иммунитет. В периферической крови отмечаются снижение абсолютного и относительного содержания Т-лимфоцитов, нередко с увеличением количества Т-регуляторных клеток (Saleh и Elkord, 2020). Сложность иммунологических отношений организма и опухоли, их недостаточная изученность на структурном уровне определяют важность детального морфологического и иммуноморфологического изучения реакций органов иммунной системы на опухолевый рост. Не менее важным остается изучение закономерностей роста, дифференцировки и прогрессии опухолей с учетом их антигенной структуры и уровня функционирования иммунной системы. Морфологическая картина иммунных реакций на опухоль складывается из реакций центральных (тимус) и периферических (селезенка, лимфатические узлы, организованные лимфоидные скопления ЖКТ, миндалины) органов иммунной системы, а также локальных иммунных реакций, характеризующихся перитуморальной лимфоидной инфильтрацией. В условиях целостного организма гистологическая оценка тимуса, селезенки, лимфатических узлов не позволяет относить реактивные изменения этих органов исключительно к проявлениям противоопухолевого иммунитета, поскольку они отражают не только иммунный ответ на опухоль, но и на разнообразные антигены инфекционной и неинфекционной природы, которые попадают в организм в результате местных воспалительных и деструктивных процессов,

сопровождающих опухолевый рост. Реактивные изменения органов иммунной системы отражают наличие у онкологических больных вторичного иммунодефицита, обусловленного иммуносупрессивным влиянием опухоли. Для вторичных иммунодефицитных состояний характерны изменения тимуса в виде его акцидентальной инволюции и редукция или гиперплазия периферических лимфоидных органов (Хаитов и соавт., 2010; Мельников и соавт., 2015).

В нашей работе только у ВУ мышей опытной группы наблюдалась гиперплазия коркового вещества долек тимуса с увеличением числа тимических телец в виде кистоподобных полостей, что характерно для хронического воспалительного процесса, в то время как у НУ обнаружена тенденция к снижению объемной доли коркового вещества, то есть развитию острой акцидентальной инволюции тимуса. По данным литературы морфологические изменения в тимусе при хроническом ЯК проявляются гиперплазией коркового вещества долек, более выраженной в поздние сроки развития заболевания, и появлением тимических телец в виде кистоподобных полостей (Postovalova et al., 2019). При этом показана взаимосвязь между инволюцией тимуса и прогрессией опухоли (Wang et al., 2020б; Lagou и Karagiannis, 2023). Инволюция тимуса приводит к снижению продукции наивных Т-лимфоцитов и ограничению репертуара Т-клеточных рецепторов, потенциально ослабляя иммунный надзор за неоплазией (Schreiber et al., 2020). Считается, что снижение периферического иммунного надзора и противоопухолевого иммунитета благоприятствует развитию предопухолевых поражений и избеганию иммунного ответа трансформированными опухолевыми клетками (Wang et al., 2020б; Lagou и Karagiannis, 2023). Очевидно, что морфологические особенности реакций тимуса у животных с разной устойчивостью к гипоксии связаны с разными темпами прогрессии опухолей. Известно, что колит-ассоциированный КРР развивается в результате дисплазии эпителия на фоне хронического воспаления с последующим формированием опухолей (Zhang et al., 2023a). У ВУ животных изменения в тимусе (гиперплазия коркового вещества долек и увеличение числа тимических телец в виде кистоподобных полостей) характерны преимущественно для хронического воспалительного процесса, при этом по данным морфологического исследования дистального отдела ободочной кишки выявлена более ранняя стадия колит-ассоциированного КРР.

При исследовании селезенки как у ВУ, так и у НУ мышей опытных групп наблюдалось увеличение объемной доли лимфоидных узелков, но только у НУ выявлено расширение их светлых центров. Это свидетельствует о более выраженной антигенной стимуляции и активации В-зависимой зоны (Bronte и Pittet, 2013). Ранее нами установлено, что при СВО, индуцированном ЛПС, только у НУ животных наблюдается активация преимущественно гуморального звена иммунитета (Dzhalilova et al., 2019б), что также сопровождается расширением светлых центров

лимфоидных узелков селезенки и увеличением числа В-лимфоцитов в крови. В работе S.H. Cho и соавт. (2016) показано, что изменения содержания O_2 в лимфоидных органах и активация HIF-зависимых генов, регулирующих развитие В-лимфоцитов при различных патологических процессах, могут влиять на гуморальный иммунитет. Вероятно, эти процессы более выражены у НУ мышей.

Только у НУ мышей в периферической крови увеличивалось относительное и абсолютное число CD19+ В-лимфоцитов. Это также свидетельствует об активации реакций гуморального звена адаптивного иммунитета у этих животных при прогрессии КРР и согласуется с данными литературы (Zhang et al., 2022в).

По данным проточной цитофлуориметрии только у НУ животных в БЛУ выявлено снижение относительного количества F4/80+ макрофагов, но повышение абсолютного числа CD3+CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов, относительного и абсолютного количества NK клеток и В-лимфоцитов по сравнению с контрольной группой. Относительное и абсолютное количество NK клеток и В-лимфоцитов в БЛУ у НУ животных было выше по сравнению с ВУ. У ВУ животных изменений субпопуляционного состава клеток БЛУ при колит-ассоциированном КРР не выявлено. Полученные данные свидетельствуют об активации реакций как врожденного иммунитета, так и гуморального звена адаптивного иммунитета у НУ животных при прогрессии КРР (Graham et al., 2024). Снижение числа макрофагов в БЛУ у НУ мышей может быть связано с миграцией этих клеток в зоны воспаления и опухолевого роста и подтверждается данными морфологического исследования – наличием диффузной инфильтрации стромы опухоли лимфоцитами и макрофагами.

По нашим данным как через 70 сут, так и 140 сут после введения АОМ как у ВУ, так и у НУ мышей по сравнению с контрольными группами снижалось количество эритроцитов и содержание гемоглобина. Снижение числа эритроцитов и концентрации гемоглобина в периферической крови у пациентов с КРР считается фактором неблагоприятного прогноза заболевания (Dunne et al., 2002; Mörner et al., 2017). 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 МСН. При анализе гематологических показателей у пациентов при прогрессии злокачественных опухолей выявляется нормо- или микроцитарная, нормо- или гипохромная анемия (Li et al., 2020a). По нашим данным как у ВУ, так и у НУ мышей развивалась нормоцитарная гипохромная анемия, которая только у НУ животных в тканях опухоли сочеталась с накоплением железосодержащего пигмента гемосидерина, выявленного с использованием окрашивания по Перлсу.

Только у ВУ животных опытных групп в оба срока эксперимента повышалось относительное количество моноцитов и их показатели были выше по сравнению с НУ. Это

может быть связано с миграцией моноцитов в слизистую оболочку ободочной кишки при хроническом колите, а также в опухоль, и дифференцировкой в макрофаги (Locati et al., 2020). Повышение числа моноцитов в крови может свидетельствовать об активации противоопухолевого иммунитета у ВУ мышей. На ранних этапах развития опухоли макрофаги осуществляют противоопухолевый иммунитет (Кадагидзе и Черткова, 2016; Chanmee et al., 2014). В тоже время моноциты, М2-макрофаги и MDSCs подавляют эффекторные функции и пролиферацию Т-лимфоцитов (Kanterman et al., 2012).

По нашим данным количество CD3+CD4+ Т-лимфоцитов и NK клеток в периферической крови как у ВУ, так и у НУ мышей опытных групп снижалось по сравнению с контрольными. Вероятно, снижение количества CD3+CD4+ Т-лимфоцитов и NK клеток в периферической крови связано с нарушением их пролиферации на фоне хронического воспаления и/или их миграцией во вторичные лимфоидные органы и зону опухолевого роста, что также согласуется с увеличением числа NK клеток в БЛУ у НУ животных с КРР.

Как у ВУ, так и у НУ мышей опытных групп число регуляторных Т-лимфоцитов в периферической крови уменьшалось по сравнению с контрольными, в то же время у НУ мышей количество цитотоксических Т-лимфоцитов в периферической крови увеличивалось. Известно, что регуляторные Т-лимфоциты являются супрессорами CD8+ Т-клеток (Biswas и Mantovani, 2010). Предполагается, что при уменьшении числа Т-регуляторных клеток CD8+ Т-лимфоциты могут восстанавливать свою противоопухолевую активность (Olguín et al., 2018). Высокая плотность Т-регуляторных клеток, инфильтрирующих опухоль, коррелирует с неблагоприятным прогнозом при раке молочной железы, яичников, легких, поджелудочной железы, желудка и шейки матки (Gao et al., 2007; Perrone et al., 2008; Li et al., 2009). Однако в течение многих лет клинические и экспериментальные исследования не подтверждают эту зависимость при КРР, а также при опухолях головы и шеи (Ladoire et al., 2011; deLeeuw et al., 2012; Lam et al., 2021; Li et al., 2024). Возможно, снижение количества регуляторных Т-клеток в периферической крови как у ВУ, так и у НУ мышей связано с их миграцией в зону опухоли, а увеличение количества цитотоксических Т-лимфоцитов в опухолях, БЛУ и крови у НУ животных сопровождается активацией противоопухолевого иммунитета.

При экспериментальном КРР только у НУ мышей выявлено увеличение индекса NLR по сравнению с контрольной группой, что согласно данным литературы свидетельствует о более выраженных системных проявлениях воспаления (Nøst et al., 2021). Показана высокая прогностическая значимость повышения NLR для выявления пациентов с более поздними стадиями прогрессии опухолей ЖКТ (Nora et al., 2018). NLR является независимым маркером низкой выживаемости у пациентов, получающих химиотерапию при распространенном КРР (Chua et al., 2011). При КРР у НУ животных наряду с высокой экспрессией *Tnfa, Il6, Il10* и *Tgfb* в

опухолях нами выявлено увеличение индекса NLR по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует о более поздней стадии прогрессии опухолей и системных проявлениях ассоциированного с опухолью воспаления.

Изменения массы тела через 70 и 140 сут после введения АОМ были сходными – масса тела ВУ и НУ мышей опытных групп увеличивалась по сравнению с началом эксперимента, но была ниже по сравнению с массой мышей контрольных групп (через 70 сут – только у НУ животных). Снижение массы тела может быть следствием как хронического воспалительного процесса, в частности, хронического колита, так и КРР (Elsherif et al., 2014; Kocarnik et al., 2017). Известно, что при развитии злокачественных опухолей, особенно на поздних стадиях заболевания, часто наблюдается снижение массы тела – кахексия, как одно из проявлений паранеопластического синдрома (Tomasin et al., 2019). Кахексия встречается у 61% пациентов с КРР и раком легких, у 87% с раком желудка и поджелудочной железы (Loberg et al., 2007). Таким образом, через 70 сут после введения АОМ более выраженные проявления хронического колита и КРР – снижение массы тела – выявлены у НУ мышей, а через 140 сут не различались у ВУ и НУ животных.

Различий по содержанию СРБ как между контрольными и опытными группами, так и ВУ и НУ животными не выявлено. СРБ – неспецифический маркер повреждения тканей при воспалении, некрозах и различных травмах (Reghefaoui et al., 2023). Ранее нами показано, что уровень СРБ увеличивался только у НУ крыс Вистар через 24 ч после моделирования СВО, индуцированного ЛПС (Dzhalilova et al., 2019a). По данным литературы уровень СРБ значительно повышается через 10-12 ч и достигает пика через 24-48 ч после воздействия (Ng et al., 1997; Hofer et al., 2012; Slaats et al., 2016). Вероятно, отсутствие статистически значимых различий между контрольными и опытными группами ВУ и НУ мышей в нашей работе обусловлено сроками эксперимента. По данным анализа 780 985 пациентов с КРР роль СРБ как предиктора течения заболевания не подтверждена и его не предложено включать в модель прогнозирования риска КРР (Han et al., 2023).

Таким образом, через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН частота развития опухолей, их площадь, распространенность среди них аденокарцином в дистальном отделе ободочной кишки у НУ мышей были выше по сравнению с ВУ. В контрольной группе НУ мышей выше уровни экспрессии генов *Hif1a, Hif3a, Nfkb, Il10, Trp53, Bax, Cldn2,* в то время как у ВУ выше экспрессия *Pten, Cmet, Egfr, Bcl2, Muc1, Muc13* и *Cldn7*. 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*. По сравнению с ВУ у НУ животных изменения экспрессии различных групп генов при колит-ассоциированном КРР более выражены, что свидетельствует о более тяжелом течении и

менее благоприятном прогнозе. При КРР у НУ мышей наблюдается активация реакций как врожденного иммунитета, так и гуморального звена адаптивного иммунитета – по сравнению с ВУ у них выше число цитотоксических Т-лимфоцитов в опухолях, выше относительное число CD8+ и NK клеток в периферической крови, выше относительное и абсолютное количество NK клеток и В-лимфоцитов в БЛУ. При КРР 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 ассоциированного с опухолью воспаления. По сравнению с ВУ животными колит-ассоциированный КРР у НУ мышей характеризуется высокими темпами инициации и прогрессии, активацией врожденного иммунитета и гуморального звена адаптивного иммунитета, а также развитием СВО (Джалилова и соавт., 2025; Dzhalilova et al., 2024a, 2025). Полученные нами данные подтверждают необходимость учета исходной устойчивости организмов к гипоксии при разработке новых подходов к диагностике и лечению опухолевых заболеваний, а также при проведении экспериментальных исследований с использованием модели КРР, основанной на введении АОМ и потреблении ДСН.

3.6. Морфологические, иммуногистохимические и молекулярно-биологические особенности прогрессии глиобластомы 101.8 у ВУ и НУ самцов крыс Вистар[6]

Применение индуцируемой модели колит-ассоциированного КРР для исследования процессов опухолевой прогрессии и метастазирования сопряжено с рядом трудностей. В частности, формирование первичной индуцированной опухоли, а затем метастазов, может занимать значительное время, что продлевает сроки эксперимента. Для изучения опухолевой прогрессии у животных более релевантными и воспроизводимыми по сравнению с моделью колит-ассоциированного КРР являются модели более агрессивных опухолей, таких как глиобластома 101.8 крыс. Глиобластома является самой агрессивной первичной опухолью головного мозга, она характеризуется быстрым ростом, выраженным ангиогенезом и устойчивостью к терапии (Huang et al., 2018; Alpuim Costa et al., 2022). По морфологическим характеристикам глиобластома 101.8 является низкодифференцированной диффузной астроцитомой с высокой митотической активностью, высокой плотностью опухолевых клеток на единицу площади и псевдопалисадообразными некрозами. По морфологической картине и степени злокачественности глиобластома 101.8 крыс сходна с глиобластомой человека (Авцын и соавт., 1988; Alekseeva et al., 2023).

При прогрессии опухолей развивается СВО, индуцируемый окислительным стрессом и некротической гибелью опухолевых клеток вследствие недостаточного кровоснабжения. Воспаление, связанное с развитием опухолей, является ключевым фактором их быстрой прогрессии (Grivennikov et al., 2010; de Visser и Joyce, 2023). Тяжесть течения и прогноз опухолевых заболеваний во многом зависит от выраженности СВО (Diakos et al., 2014). Тем не менее, в литературе отсутствуют данные о выраженности СВО при прогрессии опухолей у ВУ и НУ животных. Задачей данного раздела было оценить прогрессию глиобластомы у ВУ и НУ крыс Вистар, а также выраженность СВО при развитии опухолей.

---

[6]При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении научных степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования (в скобках приведен импакт-фактор журнала, объем публикации в условных печатных листах/вклад автора в условных печатных листах):

1. **Dzhalilova D.Sh.**, Zolotova N.A., Mkhitarov V.A., Kosyreva 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 WoS (JIF), Q1 (0,90/0,70)

По результатам определения устойчивости к гипоксии в барокамере по «времени жизни» на «высоте» 11 500 м среди половозрелых крыс Вистар 21,7% оказались ВУ со «временем жизни» более 240 с, 40% – НУ со «временем жизни» менее 80 с (рис. 3.6.1).

Рис. 3.6.1. Результаты разделения половозрелых крыс Вистар в барокамере на критической «высоте» 11 500 м на ВУ, СУ и НУ

3.6.1. Гибель животных и динамика массы тела на 11-е и 15-е сут после трансплантации глиобластомы у ВУ и НУ самцов крыс Вистар

После трансплантации глиобластомы 101.8 животных случайным образом разделили на две подгруппы – крыс из подгруппы 1 выводили из эксперимента на 11-е сут, а из подгруппы 2 – на 15-е сут. Формирование опухолей наблюдалось у всех ВУ и НУ животных (100%). По данным литературы развитие выраженных клинических симптомов происходит на 14-18-е сут после трансплантации глиобластомы 101.8 (Wohlfart et al., 2011). В нашей работе на 15-е сут у животных развивалась вялость, уменьшалась двигательная активность, наблюдалась взъерошенность шерстного покрова, парез и паралич конечностей. В обеих подгруппах ВУ крыс во все сроки эксперимента гибель составила 0% (на 11-е сут выжили все 7 крыс, на 15-е – все 6 животных), в то время как гибель НУ животных на 11-е сут после трансплантации глиобластомы составила 15% (погибло 2 животных из 13), а на 15-е сут – 45% (погибло 5 животных из 11), показатели статистически значимо различались на 15-е сут эксперимента (табл. 3.6.1, рис. 3.6.2).

Таблица 3.6.1

Гибель ВУ и НУ крыс Вистар, которых выводили из эксперимента на 11-е (подгруппа 1) и 15-е (подгруппа 2) сут после трансплантации глиобластомы 101.8, p – статистическая значимость различий, точный тест Фишера

Подгруппа 1 (выведение из эксперимента на 11-е сут)			
Группы наблюдения / **Гибель**	**11-е сут эксперимента**		**p**
	ВУ (n=7)	**НУ (n=13)**	
Выжило	7 (100%)	11 (85%)	0,184
Погибло	0 (0%)	2 (15%)	
Подгруппа 2 (выведение из эксперимента на 15-е сут)			
Группы наблюдения / **Гибель**	**15-е сут эксперимента**		**p**
	ВУ (n=6)	**НУ (n=11)**	
Выжило	6 (100%)	6 (55%)	**0,012**
Погибло	0 (0%)	5 (45%)	

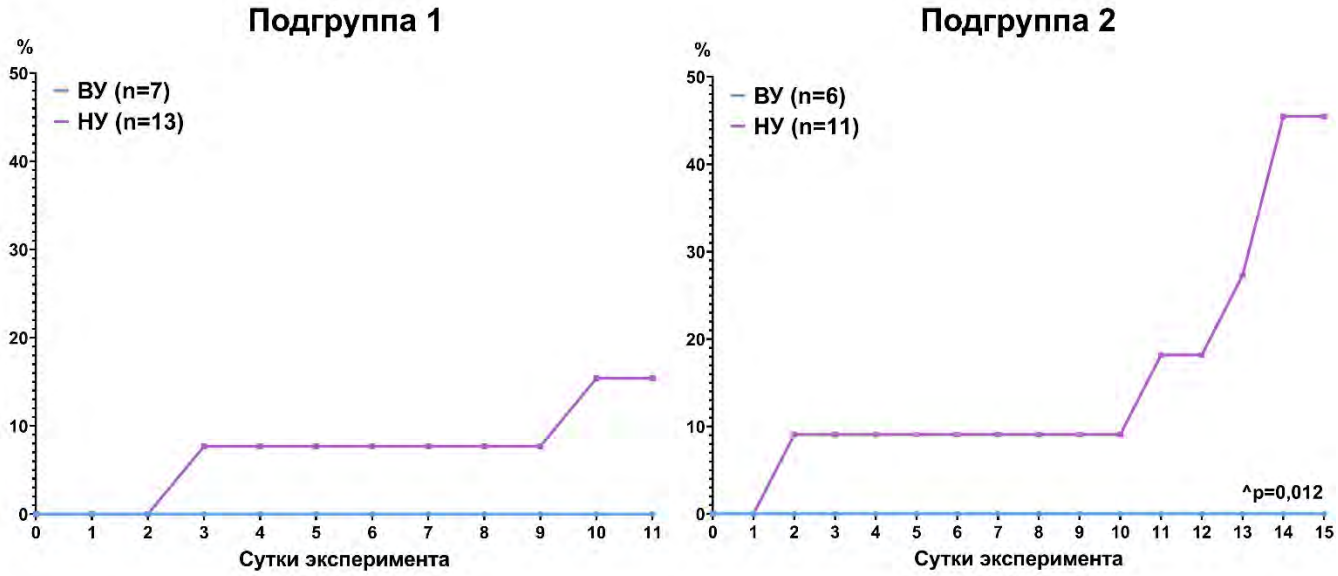


Рис. 3.6.2. Гибель ВУ и НУ крыс Вистар, которых выводили из эксперимента на 11-е (подгруппа 1) и 15-е (подгруппа 2) сут после трансплантации глиобластомы 101.8. ^ – статистически значимые различия (p<0,05) по сравнению с НУ мышами, точный тест Фишера

Масса тела животных, которых выводили из эксперимента на 11-е сут после трансплантации глиобластомы (подгруппа 1), не изменялась в течение эксперимента и не различалась у ВУ и НУ крыс Вистар (табл. 3.6.2).

Масса тела животных, которых выводили из эксперимента на 15-е сут после трансплантации глиобластомы, также не изменялась в течение эксперимента, хотя у НУ крыс заметно снижение массы тела к концу эксперимента на 7%, в то время как у ВУ – увеличение на 4%. При этом на 10-е сут после трансплантации глиобластомы масса тела НУ крыс подгруппы 2 была статистически значимо ниже по сравнению с ВУ животными (табл. 3.6.2).

Таблица 3.6.2

Динамика массы тела у ВУ и НУ крыс Вистар, которых выводили из эксперимента на 11-е (подгруппа 1) и на 15-е (подгруппа 2) сут после трансплантации глиобластомы, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

Сроки эксперимента	**Масса тела, г**		**p**
	Подгруппа 1 (выведение из эксперимента на 11-е сут)		
	ВУ (n=7)	**НУ (n=11)**	
До трансплантации глиобластомы (0-е сут)	315,0 (300,0-400,0)[1]	340,0 (340,0-350,0)[2]	0,50[1-2]
10-е сут	310,0 (255,0-400,0)[3]	348,0 (320,0-371,0)[4]	0,41[3-4]
p	0,70[1-3]	0,84[2-4]	
Сроки эксперимента	**Подгруппа 2 (выведение из эксперимента на 15-е сут)**		**p**
	ВУ (n=6)	**НУ (n=6)**	
До трансплантации глиобластомы (0 сут)	350,0 (345,0-350,0)[1]	310,0 (297,0-344,0)[2]	0,17[1-2]
10-е сут	370,0 (360,0-373,0)[3]	299,0 (284,0-327,0)[4]	**0,037**[3-4]
14-е сут	365,0 (327,0-370,0)[5]	290,0 (263,0-320,0)[6]	0,16[5-6]
p	0,29[1-3]; 0,99[1-5]; 0,99[3-5]	0,99[2-4]; 0,35[2-6]; 0,99[4-6]	

3.6.2. Морфологическое исследование глиобластомы 101.8 на 11-е и 15-е сут после трансплантации у ВУ и НУ самцов крыс Вистар

На 11-е сут после трансплантации глиобластомы 101.8 при морфологическом исследовании в головном мозге у ВУ и НУ крыс выявлены небольшие опухоли с полиморфными атипичными клетками (рис. 3.6.3, А, Б). Обнаружено множество митотически делящихся опухолевых клеток и небольшие зоны некрозов, а также мелкие очаги кровоизлияний. Сосуды были представлены щелевидными полостями с тонкими стенками, отмечалась очаговая пролиферация эндотелия.

На 15-е сут после трансплантации глиобластомы 101.8 при морфологическом исследовании в головном мозге у ВУ и НУ крыс наблюдались опухоли с высокой клеточностью и выраженной атипией опухолевых клеток (рис. 3.6.3, В, Г). Опухолевые клетки были с гиперхромными ядрами, полиморфные по форме и размерам. Определялись митотически делящиеся и гибнущие клетки. В опухолях обнаружены распространенные некрозы и небольшие очаговые кровоизлияния. Во всех опухолях определялось множество кровеносных сосудов, образующих сосудистые розетки – скопления из 3-5 сосудов. Сосуды были тонкостенные, их размеры и форма варьировали, определялась очаговая пролиферация эндотелия.

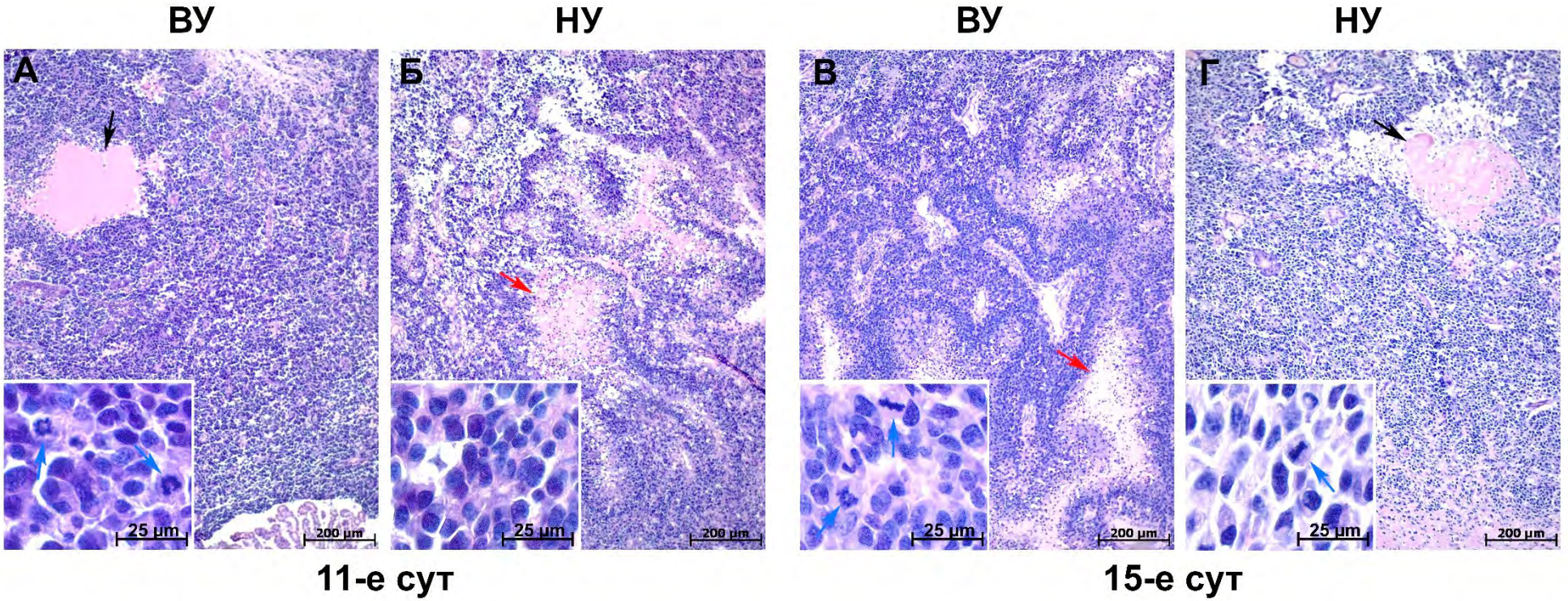


Рис. 3.6.3. Морфологическая характеристика глиобластомы 101.8 на 11-е и 15-е сут после трансплантации у ВУ и НУ крыс Вистар. А, В – ВУ; Б, Г – НУ. А – опухоль состоит из атипичных клеток, очаги кровоизлияний (черная стрелка); Б – опухоль состоит из атипичных клеток, множество некрозов с палисадообразным расположением опухолевых клеток (красная стрелка); В – опухоль из атипичных клеток, некрозы с палисадообразным расположением опухолевых клеток (красная стрелка); Г – опухоль из атипичных клеток, кровоизлияния (черная стрелка). На врезках – атипичные и полиморфные опухолевые клетки, митозы (синие стрелки). Окраска гематоксилином и эозином

3.6.3. Волюмометрическая оценка опухолей с помощью 3D реконструирования на 11-е и 15-е сут после трансплантации глиобластомы у ВУ и НУ самцов крыс Вистар

Объективная оценка темпов роста различных опухолей, в том числе при воздействии лекарственных препаратов, в клинической практике основывается преимущественно на данных ультразвукового исследования, компьютерной томографии (КТ) и магнитно-резонансной томографии (МРТ). Для работы с лабораторными животными применение этих методов ограничено высокой стоимостью, малой доступностью оборудования, а также относительно невысоким разрешением (2-3 мм) (Eichoff, 2003). Оценку размеров опухолей на экспериментальных моделях проводят преимущественно постмортально.

При форме опухоли, близкой к сфере или эллипсоиду, обычно измеряют максимальные размеры опухолевого узла в трех взаимно перпендикулярных проекциях. Однако в большинстве случаев форма опухоли значительно отличается от сферической и размеры, получающиеся в результате таких измерений, далеки от истинных. В настоящее время в экспериментальных исследованиях широко применяется компьютерная морфометрия по оцифрованным микрофотографиям. В результате появления специальных компьютерных программ (3D – Reconstructor, 3D-Doctor и т.п.) появилась возможность осуществлять объемную (3D) реконструкцию исследуемого объекта по ступенчато-серийным гистологическим срезам (Funnell и Maysinger, 2006; Marcos et al., 2012). Метод 3D реконструирования по ступенчато-серийным гистологическим срезам при помощи морфометрической программы Image-Pro Premiere 3D («Media Cybernetics», США) позволяет получить точные данные о размерах и форме опухолей при проведении экспериментальных и доклинических исследований (Мхитаров и соавт., 2015; Beato et al., 2021; Xiu et al., 2022). 3D реконструирование проводили по ранее охарактеризованной методике (Мхитаров и соавт., 2015). В результате были получены графические объемные изображения опухолей у ВУ и у выживших НУ крыс Вистар на 11-е и 15-е сут после трансплантации глиобластомы 101.8.

Объемы опухолей, полученные с помощью 3D реконструирования, значительно варьировали в исследуемых группах, но у ВУ крыс опухоли визуально были больше по сравнению с НУ (рис. 3.6.4, А).

По данным морфометрического исследования на 11-е сут после трансплантации объем опухолей у ВУ и выживших НУ крыс не различался (табл. 3.6.3 Приложения 6, рис. 3.6.4, Б). Как у ВУ, так и у НУ животных объем опухолей увеличивался на 15-е сут эксперимента по сравнению с 11-ми сут. При этом на 15-е сут после трансплантации глиобластомы показатель объема опухолей был статистически значимо выше у ВУ крыс по сравнению с НУ (табл. 3.6.3 Приложения 6, рис. 3.6.4, Б).

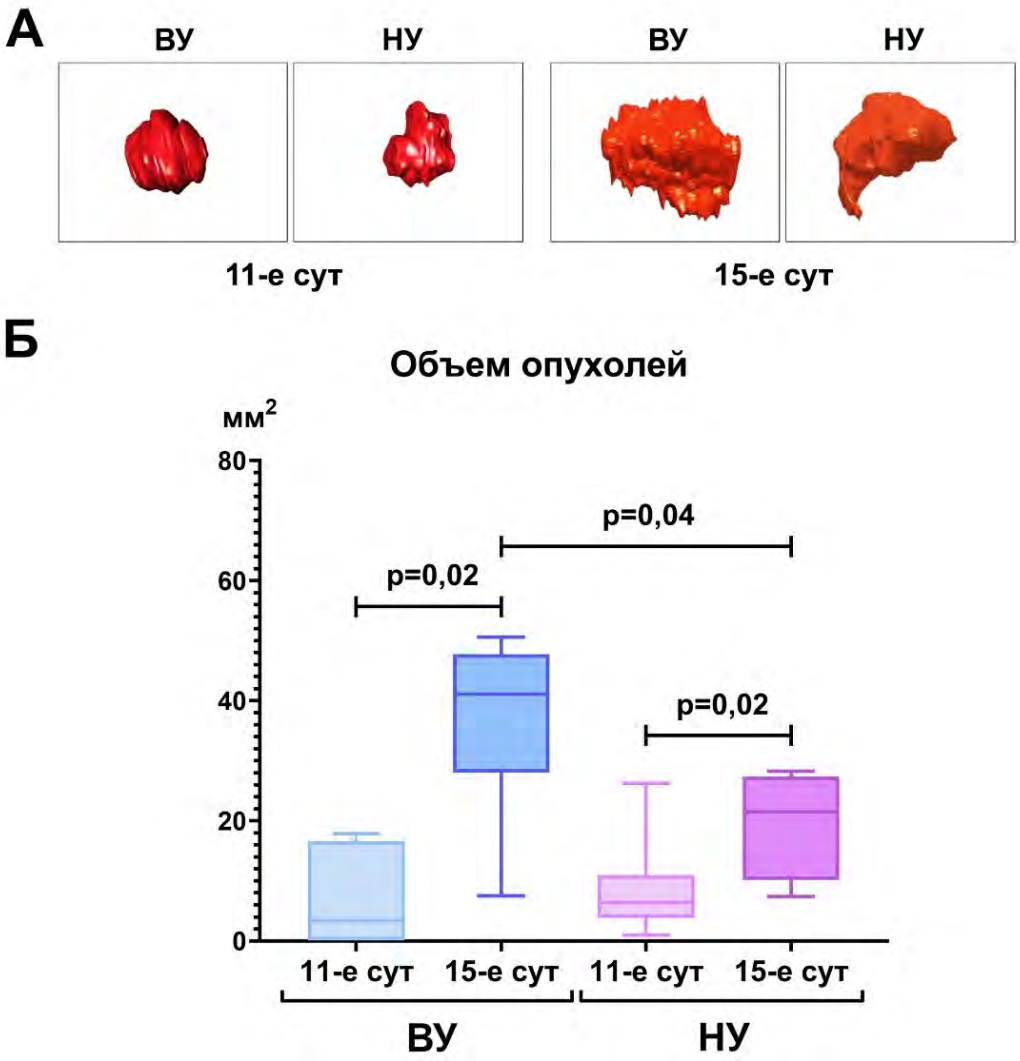


Рис. 3.6.4. А – 3D изображения опухолей ВУ и НУ крыс Вистар после реконструкции на 11-е и 15-е сут после трансплантации глиобластомы; Б – объем опухолей у ВУ и НУ крыс на 11-е и 15-е сутки после трансплантации глиобластомы, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

3.6.4. Оценка абсолютного числа кровеносных сосудов и площади некрозов в опухолях на 11-е и 15-е сут после трансплантации глиобластомы у ВУ и НУ самцов крыс Вистар

Глиобластомы характеризуются высокой степенью новообразованных сосудов, что способствует их агрессивному росту (Weidner, 2000). Дополнительным диагностическим критерием глиобластомы высокой степени злокачественности является наличие обширных участков некроза в опухоли. Этот гистологический признак используют как маркер неблагоприятного прогноза (Barker et al., 1996).

Методом точечного счета оценивали число визуализируемых сосудов в опухолях. Показатели количества сосудов не различались у ВУ и НУ крыс как на 11-е, так и на 15-е сут эксперимента (табл. 3.6.4). Площадь некрозов в опухолях на 11-е сут эксперимента в сравниваемых группах также не различалась, а на 15-е сут была статистически значимо выше у ВУ крыс по сравнению с НУ (табл. 3.6.4).

Таблица 3.6.4

Абсолютное число кровеносных сосудов и площадь некрозов в опухолях на 11-е и 15-е сут после трансплантации глиобластомы у ВУ и НУ крыс Вистар, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Группы наблюдения / **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)**	
Абсолютное число кровеносных сосудов (при х200)	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)	$0,17^{1-2}$; $0,56^{1-3}$ $0,36^{2-4}$; $\mathbf{0,01}^{3-4}$

3.6.5. Оценка пролиферативной активности опухолевых клеток на 11-е и 15-е сут после трансплантации глиобластомы у ВУ и НУ самцов крыс Вистар

Пролиферативную активность опухолевых клеток оценивали с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания гистологических срезов с использованием антител к Ki-67 (рис. 3.6.5). Ki-67 представляет собой ядерный антиген, который экспрессируется во всех фазах клеточного цикла, за исключением G0-фазы. Из-за его отсутствия в покоящихся клетках он является широко используемым маркером пролиферирующих клеток (Gerdes et al., 1984).

По данным морфометрического исследования у ВУ крыс относительное количество Ki-67+ клеток было статистически значимо выше по сравнению с НУ как на 11-е, так и на 15-е сут эксперимента. Пролиферативная активность опухолевых клеток между 11-ми и 15-ми сут эксперимента статистически значимо не различалась как у ВУ, так и НУ крыс (табл. 3.6.5 Приложения 6, рис. 3.6.6).

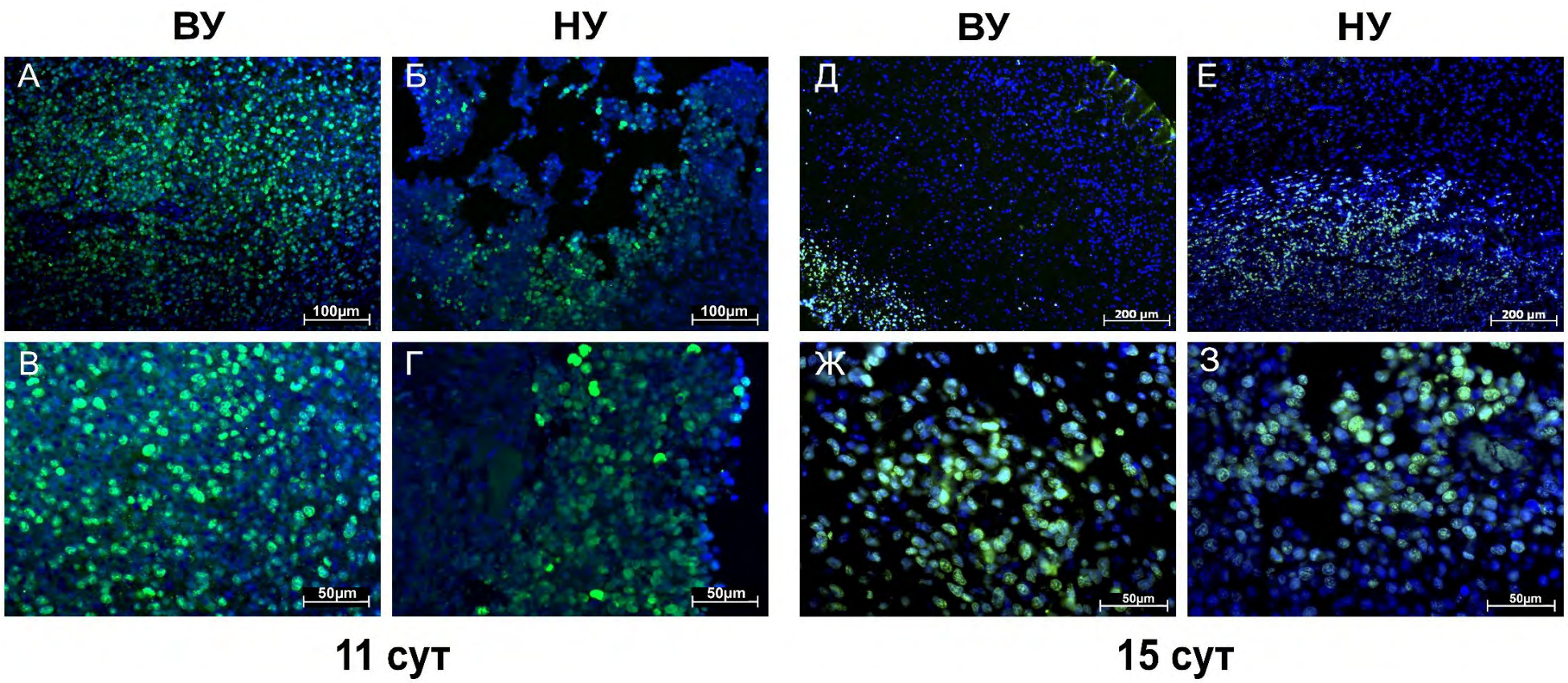


Рис. 3.6.5. Иммунофлуоресцентное окрашивание опухолей с использованием антител к Ki-67 (зеленый) и DAPI (синий) на 11-е и 15-е сут после трансплантации глиобластомы у ВУ и НУ крыс Вистар

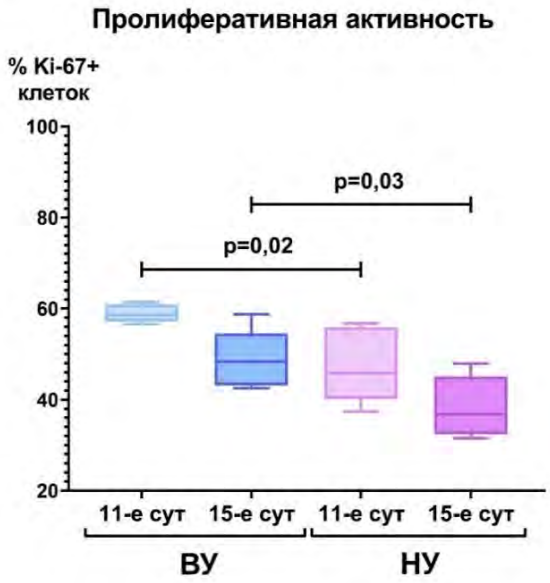


Рис. 3.6.6. Относительное количество (%) Ki-67+ клеток в опухолях на 11-е и 15-е сут после трансплантации глиобластомы у ВУ и НУ крыс Вистар, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

3.6.6. Содержание TNF-α, IL-1β и HIF-1α в сыворотке крови на 11-е и 15-е сут после трансплантации глиобластомы у ВУ и НУ самцов крыс Вистар

По данным ИФА различий по содержанию TNF-α в сыворотке крови у ВУ и НУ крыс на 11-е сут эксперимента не выявлено, а на 15-е сут после трансплантации глиобластомы содержание TNF-α в сыворотке крови было выше у НУ крыс по сравнению с ВУ (табл. 3.6.6 Приложения 6, рис. 3.6.7).

Содержание провоспалительного цитокина IL-1β повышалось только у НУ животных на 15-е сут после трансплантации глиобластомы по сравнению с 11-ми сут, и было статистически значимо выше на 15-е сут эксперимента по сравнению с ВУ (табл. 3.6.6 Приложения 6, рис. 3.6.7).

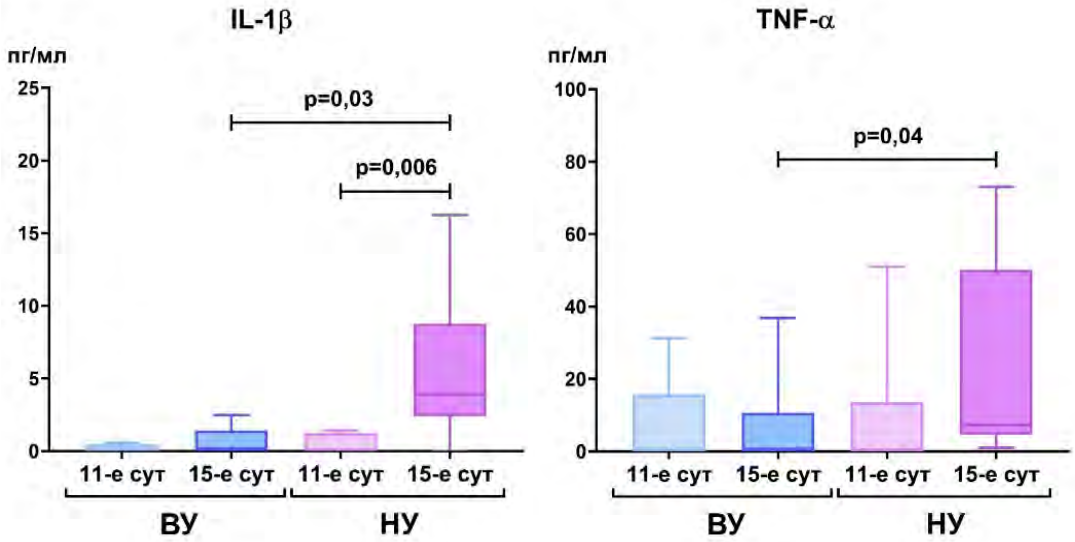


Рис. 3.6.7. Содержание TNF-α и IL-1β в сыворотке крови на 11-е и 15-е сут после трансплантации глиобластомы у ВУ и НУ крыс Вистар, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Показано, что содержание HIF-1α в сыворотке крови не различалось у ВУ и НУ животных как на 11-е, так и на 15-е сут эксперимента. Однако у ВУ крыс на 15-е сут содержание HIF-1α в сыворотке крови повышалось по сравнению с 11-ми сут, а у НУ – не изменялось (табл. 3.6.7 Приложения 6, рис. 3.6.8).

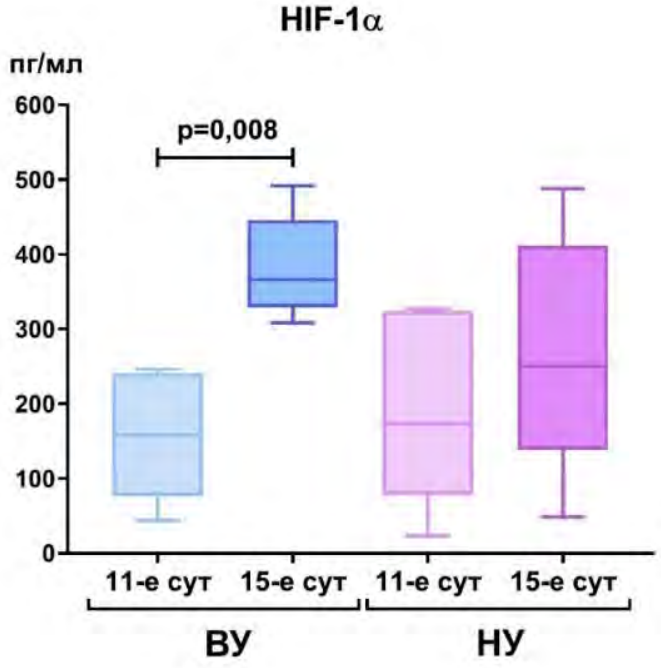


Рис. 3.6.8. Содержание HIF-1α в сыворотке крови на 11-е и 15-е сут после трансплантации глиобластомы у ВУ и НУ крыс Вистар, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Заключение и обсуждение к 3.6

После трансплантации глиобластомы в течение всего срока гибели ВУ крыс не наблюдалось (на 11-е сут выжили все 7 крыс, на 15-е – все 6 животных), в то время как гибель НУ животных на 11-е сут составила 15% (погибло 2 животных из 13), а на 15-е сут – 45% (погибло 5 животных из 11). По данным 3D реконструирования и морфометрического исследования на 11-е сут после трансплантации объем опухолей у ВУ и НУ крыс не различался, а на 15-е сут был статистически значимо выше у ВУ животных по сравнению с НУ. По данным иммуногистохимического и морфометрического исследований у ВУ крыс относительное количество Ki-67+ опухолевых клеток было статистически значимо выше по сравнению с НУ в оба срока эксперимента. Площадь некрозов у ВУ крыс Вистар по сравнению с НУ на 15-е сут после трансплантации глиобластомы была выше, а число сосудов не различалось в оба срока эксперимента у ВУ и НУ животных. Содержание HIF-1α в сыворотке крови не различалось у ВУ и НУ животных как на 11-е, так и на 15-е сут эксперимента, однако у ВУ крыс на 15-е сут повышалось по сравнению с 11-ми сут, а у НУ – не изменялось. СВО при прогрессии глиобластомы характеризовался высоким содержанием провоспалительных цитокинов – TNF-α и IL-1β в сыворотке крови на 15-е сут эксперимента только у НУ крыс (рис. 3.6.9).

Параметры	ВУ *11 сут-15 сут*	НУ *11 сут-15 сут*	Различия между ВУ и НУ
Гибель	=	↑	**Ниже у ВУ** на 15-е сут
Масса тела	=	=	Нет
Объем опухолей	↑	↑	**Выше у ВУ** на 15-е сут
Пролиферативная активность опухолевых клеток	=	=	**Выше у ВУ** на 11-е и 15-е сут
Количество сосудов в опухолях	=	=	Нет
Площадь некрозов в опухолях	=	=	**Выше у ВУ** на 15-е сут
TNF-α в сыворотке крови	=	=	**Ниже у ВУ** на 15-е сут
IL-1β в сыворотке крови	=	↑	**Ниже у ВУ** на 15-е сут
HIF-1α в сыворотке крови	↑	=	Нет

Рис. 3.6.9. Суммарные результаты исследования морфологических, иммуногистохимических и молекулярно-биологических особенностей прогрессии глиобластомы 101.8 у ВУ и НУ самцов крыс Вистар, стрелки – изменения на 15-е сут по сравнению с 11-ми сут эксперимента

Гибель животных, являющаяся ключевым показателем опухолевой прогрессии, была выше у НУ животных. Очевидно, что высокая гибель НУ крыс во многом обусловлена СВО при развитии опухолей. 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 и проявлениях адаптации к слабым стрессовым воздействиям 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 выражен окислительный стресс, что может определять различия в гибели животных и тяжести СВО при развитии опухолей (Jain et al., 2013; Dzhalilova и Makarova, 2020). Вероятно, эффективные защитные механизмы, в том числе высокая активность ферментов антиоксидантной защиты и белков теплового шока у ВУ животных способствуют повышению их выживаемости, несмотря на прогрессию опухолей. Известно, что даже при эффективном лечении средняя продолжительность жизни пациентов с глиобластомой высокой степени злокачественности составляет 12-15 месяцев (Chiarelli et al., 2015). Однако среди пациентов с глиобластомой можно выделить «долгоживущих», что подразумевает продолжительность жизни более трех лет (Shinawi et al., 2013; Adeberg et al., 2014; Reifenberger et al., 2014). Показано, что высокая продолжительность жизни при глиобластоме может зависеть от статуса HIF,

определенного по экспрессии отвечающих на гипоксию генов *Glut1* (*SLC2A1*), *Glut3* (*SLC2A3*), *ADM*, *VLDLR* и *VEGFA* (Sharpe et al., 2021). Вероятно, одним из факторов, определяющих продолжительность жизни более трех лет при глиобластоме, может быть индивидуальная устойчивость к гипоксии, сопряженная с различным уровнем экспрессии *Hif* и зависимых генов.

Нами выявлена большая пролиферативная активность опухолевых клеток и объем опухолей у ВУ крыс по сравнению с НУ, в то время как выживаемость у ВУ животных была выше. Высокая пролиферативная активность опухолевых клеток обусловливает рост и увеличение размеров опухоли, однако не установлено прямой взаимосвязи между ее размерами и продолжительностью жизни животных (Zhang et al., 2022б). Прогнозирование течения опухолевых заболеваний на основе пролиферативного потенциала опухолевых клеток представляет собой сложную проблему и требует дальнейших исследований. Об этом свидетельствуют противоречивые литературные данные о роли Ki-67 в прогрессии различных опухолей. Ядерный белок Ki-67 контролирует пролиферацию клеток, отражает ее активность при опухолевой прогрессии и может быть важным биомаркером злокачественных опухолей (Stewart et al., 2010). Несмотря на то, что увеличение показателя Ki-67 связано с более высокой степенью злокачественности в некоторых опухолях (Johannessen и Torp, 2006; Schmilovitz-Weiss et al., 2011), данные о прогностическом значении Ki-67 при глиобластоме противоречивы (Persson и Englund, 2008; Berghoff et al., 2013; Chen et al., 2015б). Один индекс Ki-67 не релевантен для оценки выживаемости у пациентов с глиобластомой (Alkhaibary et al., 2018). C. Gzell и соавт. (2016) обнаружили, что Ki-67 в повторно оперированной глиобластоме может быть использован как маркер выживаемости. Эти данные подтверждаются исследованием E. Wong и соавт. (2018), в котором выявлена положительная корреляция между индексом Ki-67 и общей выживаемостью пациентов с глиобластомой. По нашим данным пролиферативная активность опухолевых клеток у ВУ крыс по сравнению с НУ во все сроки эксперимента была выше. Вероятно, у ВУ животных происходит также компенсаторная выраженная гибель опухолевых клеток, что косвенно подтверждается высоким содержанием HIF-1α в сыворотке крови. Это может обусловливать выживаемость этих животных несмотря на большой объем опухолей. Более ранняя гибель НУ животных также свидетельствует о более высоких темпах опухолевого процесса.

Известно, что существуют организмы, устойчивые к гипоксии и развитию злокачественных опухолей, например, голый землекоп и слепыш, что обосновано высоким уровнем защиты от окислительного стресса (Larson и Park, 2009; Baptista et al., 2016; Trivedi et al., 2023). Тем не менее, нами впервые показано, что в пределах одного и того же вида в зависимости от устойчивости к гипоксии существуют также различия в темпах опухолевой прогрессии. Вероятно, это может быть связано с особенностями функционального состояния митохондрий, клеток иммунной системы, активности ферментов антиоксидантной защиты, полиморфизмами гена *Hif* и др. У ВУ

и НУ животных, исследованных через один месяц после воздействия критической «высоты», хорошо изучены структурные различия митохондрий (Pavlik et al., 2018; Mironova et al., 2019). Авторами показано, что митохондрии клеток коры головного мозга, печени и сердца ВУ и НУ крыс различаются как по структурным, так и по функциональным параметрам. Клетки коры головного мозга ВУ крыс характеризовались высоким содержанием митохондрий с более плотно упакованными кристами и темным матриксом, большим количеством мелких митохондрий и более высокой концентрацией митохондриальных ферментов, таких как SDHA (Succinate DeHydrogenase subunit A), Cyt b (Cytochrome b), COX1 (Cytochrome c OXidase subunit I), и сукцината по сравнению с митохондриями НУ крыс (Pavlik et al., 2018; Mironova et al., 2019). Напротив, в митохондриях мозга НУ крыс количество крист было меньше по сравнению с митохондриями ВУ крыс. Митохондрии меньшего размера и с более плотной упаковкой крист функционально более активны (Лукьянова, 2019; Wheaton и Chandel, 2011; Lukyanova и Kirova, 2015), что согласуется с высокой базовой функциональной активностью митохондриального энергетического аппарата в клетках коры головного мозга у ВУ крыс по сравнению с НУ. Большое количество мелких митохондрий в клетках коры головного мозга у ВУ крыс является показателем повышенной метаболической активности и более высокой интенсивности окислительного фосфорилирования у этих крыс по сравнению с НУ. Таким образом, в нормоксических условиях наблюдаются фенотипические ультраструктурные, функциональные и метаболические различия между митохондриями клеток коры головного мозга ВУ и НУ крыс, что определяет б*о*льшую активность дыхательной цепи у ВУ животных по сравнению с НУ. Эти различия также свидетельствуют о том, что энергетический обмен является одним из определяющих факторов индивидуальной устойчивости к гипоксии (Pavlik et al., 2018; Mironova et al., 2019). Кроме того, обнаружено, что в митохондриях печени у ВУ животных скорость АТФ-зависимого транспорта калия, которая отражает активность митохондриального АТФ-чувствительного калиевого канала, была увеличена. При этом количество К+ в митохондриях печени и сердца было больше у НУ крыс (Mironova et al., 2010). В работе K.N. Belosludtsev и соавт. (2020) показано, что через один месяц после определения устойчивости к гипоксии скорость поглощения Ca^{2+} митохондриями клеток печени и сердца у ВУ крыс выше, чем у НУ, что связано с различиями в уровне некоторых субъединиц каналов митохондрий. Способность удерживать кальций в митохондриях клеток печени у ВУ крыс в 1,3 раза выше, чем у НУ. Полученные результаты указывают на то, что в митохондриях клеток печени и сердца у ВУ животных проявляются функциональные и структурные особенности в транспорте ионов Ca^{2+}, которые могут быть важны для функционирования митохондрий в условиях гипоксии, и способствуют формированию адаптивных реакций, обеспечивающих развитие клеточного ответа

на кислородную недостаточность. Эти особенности лежат в основе чувствительности клеток к гипоксическому повреждению на молекулярном уровне.

Предложена концепция о существовании разных, эволюционно развитых «функциональных и метаболических паттернов», соответствующих двум типам животных с различной устойчивостью к острому дефициту O_2 (Лукьянова, 2019; Mironova et al., 2010; Lukyanova и Kirova, 2015). Эти паттерны основаны на характерных особенностях энергетического аппарата, состояния ЦНС и нейрогуморальной регуляции, которые определяют реакцию организма на гипоксию. ВУ животные представляют собой тип, отличающийся от НУ максимально активированными защитными, антигипоксическими механизмами, которые определяют толерантность к кратковременным острым гипоксическим воздействиям. Специфическая ультраструктура митохондрий коры мозга у ВУ и НУ крыс в условиях нормоксии и гипоксии, установленная L.L. Pavlik и соавт. (2018) и G.D. Mironova и соавт. (2019), также свидетельствует в пользу концепции, что животные с разной устойчивостью к гипоксии имеют два разных «функционально-метаболических портрета». Они связаны с различиями в функциональной активности энергетической системы, статусе мембран и рецепторного аппарата.

Митохондрии играют важную роль в развитии опухолей за счет регуляции синтеза макромолекул и продукции энергии (Zong et al., 2016). В опухолевых клетках происходят изменения метаболизма, в частности, активируется гликолиз, скорость которого превышает скорость окислительного фосфорилирования. Метаболические изменения, активация гликолиза и формирование кислой среды способствуют пролиферации клеток и прогрессии опухолей (Semenza, 2009). Недавно показана роль митохондрий в уклонении опухолевых клеток от иммунного надзора (Ikeda et al., 2025). Нами показано, что после трансплантации глиобластомы 101.8 как на 11-е, так и на 15-е сут выживаемость ВУ крыс составила 100%, при этом прогрессия глиобластомы у этих крыс характеризовалась увеличением объема опухолей, площади некрозов, а также повышением содержания HIF-1α в сыворотке крови. Кроме того, у ВУ крыс по сравнению с НУ во все сроки эксперимента была выше пролиферативная активность опухолевых клеток. Поскольку ВУ животные характеризуются более высокой активностью энергетического аппарата клеток головного мозга, вероятно, после трансплантации опухолевые клетки попадают в благоприятные условия и активно пролиферируют, что приводит к большему объему опухолей у ВУ животных.

Площадь некрозов в опухолях у ВУ крыс Вистар по сравнению с НУ на 15-е сут после трансплантации глиобластомы была выше. Как и другие солидные опухоли, глиобластома характеризуется обширными зонами тканевой гипоксии, очевидно, из-за быстрого роста опухоли, опережающего кровоснабжение и развитие кровеносных сосудов (Raza et al., 2002). Считается, что гипоксия служит первоначальным триггером некрозов, провоцируя гибель клеток

за счет прекращения окислительного фосфорилирования и резкого истощения внутриклеточного АТФ. Хотя истощение АТФ может нарушить ряд внутриклеточных процессов и привести к неконтролируемой гибели клеток, природа некрозов в опухолях и конкретные молекулярные механизмы, лежащие в основе их развития, остаются неясными. P.P. Yee и соавт. (2020) показали, что развитие некрозов в глиобластоме включает ферроптоз, активирующийся нейтрофилами (Yee et al., 2020). Исследования механизмов формирования некрозов при глиобластоме представляют особый интерес, поскольку выраженность некрозов положительно коррелирует с агрессивностью опухолей и неблагоприятными исходами (Barker et al., 1996; Pierallini et al., 1998). Однако по другим данным не выявлено прямой связи между некрозами и объемом опухолей, кроме того, даже в небольших глиобластомах также развиваются некрозы (Raza et al., 2002; Yee et al., 2020). Псевдопалисадный некроз и «хаотический» ангиогенез являются гистологическими признаками глиобластомы (Brat et al., 2004). В наших экспериментах ни одна из ВУ крыс не погибла за 15 сут наблюдений, несмотря на значительно больший объем опухолей (в 1,9 раз) и площадь некрозов (в 2,3 раза) по сравнению с выжившими НУ животными. При этом 45% НУ крыс погибли к этому моменту. По данным A. Pierallini и соавт. (1998) когда некрозы занимают более 35% опухоли, у пациентов наблюдается более короткое время выживания без какой-либо дальнейшей корреляции со степенью некрозов. Только пациенты с небольшой площадью некрозов (менее 35% опухоли) имели значительно более длительное время выживания (Pierallini et al., 1998). В нашем исследовании площадь некрозов у ВУ крыс хотя и была больше по сравнению с НУ, но не превышала 35% от опухоли, поэтому не влияла на выживаемость животных.

Содержание HIF-1α в сыворотке крови не различалось у ВУ и НУ животных как на 11-е, так и на 15-е сут эксперимента. Однако у ВУ крыс на 15-е сут после трансплантации глиобластомы содержание HIF-1α в сыворотке крови повышалось по сравнению с 11-ми сут, а у НУ – не изменялось. Полученные результаты согласуются с предыдущими данными о том, что в ответ на острое гипоксическое воздействие у ВУ крыс происходит более выраженная активация HIF-1α (Jain et al., 2013; Dzhalilova et al., 2018). По данным литературы при прогрессии глиобластомы из-за развивающейся гипоксии наблюдается активация HIF-1α, который регулирует активность VEGF, EGFR, PI3K/AKT/mTOR и MAPK/ERK путей и приводит к ангиогенезу и увеличению пролиферативной активности клеток глиобластомы, а также подавляет апоптоз путем активации синтеза антиапоптотического белка BCL2 (Wang et al., 2017; Huang et al., 2018). Активация HIF-1α не только способствует адаптации клеток глиобластомы к гипоксической среде, но и регулирует множество генов, участвующих в ключевых событиях онкогенеза, включая иммортализацию, инвазию и метастазирование (Womeldorff et al., 2014). Ингибирование HIF-1α является потенциальной мишенью для разработки новых препаратов при

лечении глиобластомы (Wang et al., 2017; Domènech et al., 2021). Однако основной трудностью ингибирования HIF-1α является отсутствие специфичности доступных лекарственных средств, кроме того, большинство из них проявляют ряд системных эффектов. Также в качестве терапевтического подхода предлагается использование гипербарической оксигенации, что приводит к ингибированию HIF-1α, однако необходимо проведение дополнительных исследований (Alpuim Costa et al., 2022). Следует отметить, что повышенное содержание HIF-1α в сыворотке крови на 15-е сут после трансплантации глиобластомы у ВУ животных, возможно, может не отражать его активацию, а быть вызванным более обширными некрозами, что способствует высвобождению субъединицы HIF-1α из гибнущих клеток в кровоток. Таким образом, у ВУ крыс прогрессия глиобластомы сопровождается развитием некрозов, выраженной гипоксией и активацией HIF-1α. Тем не менее, вероятно, за счет эффективных защитных систем организма и адаптации к гипоксии, продолжительность их жизни с глиобластомой выше по сравнению с НУ крысами.

Различия в тяжести течения опухолей головного мозга могут быть обусловлены особенностями реакции микроглии у ВУ и НУ животных. Возможно, что у НУ животных активация микроглии в сторону провоспалительных реакций более выражена, что обусловливает развитие СВО и гибель животных. Клетки микроглии являются резидентными макрофагами в ЦНС, присутствуют в большом количестве в опухолях и продуцируют цитокины и хемокины, способствующие прогрессии опухоли (Bowman et al., 2016; Brandenburg et al., 2016; Hambardzumyan et al., 2016; Li и Barres, 2018). Поскольку глиобластома 101.8 является перевиваемой опухолью, в ответ на трансплантацию возникают реакции иммунной системы, которые могут приводить к гибели животных (Mori et al., 2014; Ravindranath et al., 2021; Li и Lan, 2023). Поэтому гибель НУ крыс может быть обусловлена как более быстрой прогрессией опухоли, так и связанным с ней СВО.

Злокачественные опухоли, в том числе ЦНС, в процессе своего развития секретируют в кровь разные биологически активные молекулы, в том числе ростовые, провоспалительные, протромботические факторы, гормоны и другие, которые у онкологических пациентов могут вызвать развитие паранеопластического синдрома и аутоиммунных реакций (Lippitz, 2013; Diakos et al., 2014). У онкологических пациентов повышен риск развития сердечно-сосудистых нарушений, ассоциированных с опухолью, в результате которых возникают инсульты, инфаркты, сердечно-сосудистая недостаточность, тромбоэмболия легочной артерии в зависимости от возраста пациента, стадии и локализации опухоли. Риск неблагоприятного исхода от этих заболеваний увеличивается в зависимости от степени злокачественности и стадии опухолевого процесса и сохраняется в течение 10 лет от его начала (Paterson et al., 2022). Глиобластома и ее микроокружение синтезируют широкий спектр цитокинов, которые играют решающую роль в

прогрессии опухоли. Ключевыми цитокинами являются IL-1β, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 и IL-33, TNF-α и TGF-β (Albulescu et al., 2013; Șovrea et al., 2022).

Гибель НУ крыс Вистар на 11-е сут после трансплантации глиобластомы составила 15%, а на 15-е сут – 45%. У НУ крыс наблюдалось снижение массы тела на 10-е сут эксперимента, что свидетельствует о паранеопластическом синдроме и более высоких темпах прогрессии опухолей у этих животных. Только у НУ крыс на 15-е сут после трансплантации глиобластомы наблюдалось повышенное содержание IL-1β в сыворотке крови. СВО при прогрессии глиобластомы характеризовался высокой продукцией провоспалительных цитокинов – IL-1β и TNF-α на 15-е сут эксперимента только у НУ крыс. Повышенное содержание IL-1β и TNF-α в сыворотке крови у пациентов с опухолями головного мозга связано с неблагоприятным прогнозом (Shamsdin et al., 2019). В микроокружении глиобластомы секреция TNF-α стимулирует опухолевую прогрессию и ангиогенез (Șovrea et al., 2022).

IL-1β является провоспалительным цитокином, который посредством активации зависимых сигнальных путей регулирует пролиферацию опухолевых клеток, прогрессию опухолей и метастазирование. Этот цитокин участвует в активации NF-κB (Apte et al., 2006; Șovrea et al., 2022). Известно, что глиобластома человека продуцирует провоспалительный цитокин IL-1β в больших количествах, что коррелирует с ее агрессивностью и неблагоприятным прогнозом для пациента (Yeung et al., 2013; Șovrea et al., 2022).

Известно, что HIF-1α способствует активации NF-κB и IL-1β, а они, напротив, активируют HIF-1α (Sharma et al., 2011; van Uden et al., 2011). Взаимосвязь активации HIF-1α, NF-κB и IL-1β обеспечивает важную связь между механизмами, регулирующими воспаление и онкогенез при глиобластоме (Sharma et al., 2011; Zhang et al., 2018; Si et al., 2024). Активация HIF-1α и IL-1β в опухолевых клетках и TAMs в условиях гипоксии приводит к активации ЭМП и метастазирования опухолевых клеток (Zhang et al., 2018). Поскольку исходный уровень HIF-1α в тканях головного мозга и других органах у НУ животных выше (Kirova et al., 2013; Dzhalilova et al., 2019a), возможно, что у НУ крыс развитие глиобластомы происходит быстрее за счет изначально повышенной активности HIF-1α в тканях головного мозга, вследствие чего стимулируется синтез провоспалительных цитокинов и наблюдается гибель животных. Возможно, что на фоне трансплантации глиобластомы 101.8 СВО развивается именно у этих животных, способствуя их ранней гибели. Как было показано нами ранее, у НУ крыс наблюдается более тяжелое течение СВО, индуцированного ЛПС, с более высоким содержанием IL-1β в сыворотке крови по сравнению с ВУ животными (Dzhalilova et al., 2019a).

Таким образом, после трансплантации глиобластомы связанный с опухолью СВО был более выраженным у НУ крыс по сравнению с ВУ, что свидетельствует в пользу более высоких темпов прогрессии опухоли у НУ животных. Вероятно, НУ крысы с бо́льшими по объему

опухолями погибли до выведения всех животных из эксперимента, что может быть обусловлено как высокими темпами опухолевой прогрессии, так и выраженным СВО.

Одной из проблем биомедицинских исследований является воспроизводимость результатов. Фенотипическая пластичность приводит к вариациям результатов, даже если все животные генетически идентичны (Freund et al., 2015). Реакции организма со специфическим генотипом на местную среду (т. е. лабораторную среду) могут привести к совершенно разным результатам повторных исследований (Voelkl et al., 2020). Помимо половых и возрастных различий (Косырева, 2018; Flórez-Vargas et al., 2016), необходимо учитывать индивидуальную устойчивость к гипоксии. Известно, что при трансплантации глиобластомы 101.8 в головной мозг объемы опухолей варьируют в большом диапазоне (Федосеева и соавт., 2017), что может отражать индивидуальные физиологические особенности организмов, в том числе устойчивость к гипоксии, что в настоящее время не учитывается при проведении экспериментальных исследований. В нашей работе показано, что прогрессия глиобластомы, включая объем опухолей, СВО и гибель, различается у животных с разной устойчивостью к недостатку кислорода, и, вероятно, определяется комплексом факторов, в том числе развивающейся гипоксией и воспалением. Полученные данные необходимо учитывать при проведении экспериментальных исследований и разработке новых терапевтических подходов к лечению глиобластом с учетом исходной устойчивости к гипоксии.

Вероятно, ВУ животные характеризуются большей эффективностью поглощения O_2 во время дыхания и/или имеют более высокую способность к его транспортировке, более высокие скорости его обмена в периферических тканях, обмена веществ и энергии и т.д., и, следовательно, лучше адаптированы с точки зрения оксигенации, что способствует как увеличению объема опухолей, так и выживаемости организма. В связи с этим, персонализированный учет индивидуальной устойчивости к гипоксии может оказаться клинически значимым.

Полученные данные свидетельствуют о том, что ВУ крысы характеризуются большей выживаемостью, но и б***о***льшим объемом опухолей, чем НУ (Dzhalilova et al., 2023a). В перспективе эти данные могут свидетельствовать о том, что не локальный недостаток O_2 в опухолях, а индивидуальная устойчивость организма к гипоксии определяет темпы прогрессии опухолей. В нашем исследовании животным трансплантировали одну и ту же стандартную опухоль – глиобластому 101.8 крыс, тогда как ее прогрессия у животных с разной устойчивостью к гипоксии была разной. Вероятно, прогрессия глиобластомы во многом обусловлена реакциями микроокружения и иммунной системы, противодействующими росту опухоли. По нашим предыдущим данным ВУ крысы характеризуются более выраженными реакциями врожденного иммунитета и клеточными реакциями, в то время как НУ – гуморальными (Dzhalilova et al., 2019б). Кроме того, у НУ животных выявлено более тяжелое течение СВО, острого,

хронического ЯК и КРР (Джалилова и соавт., 2018а, б; Dzhalilova et al., 2019a; Dzhalilova et al., 2024a, 2025б). Поэтому необходимо проведение дальнейших исследований особенностей прогрессии опухолей у животных с разной устойчивостью к гипоксии, что позволит выявить их механизмы и разработать новые персонализированные подходы к терапии.

3.7. Морфологические и молекулярно-биологические особенности прогрессии карциномы легких у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6[7]

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 использовали модель трансплантации под кожу карциномы легких Льюис (LLC). Рак легких является первым по заболеваемости среди опухолей (Bray et al., 2024). LLC является высоковоспроизводимой и релевантной моделью немелкоклеточного рака легких, а именно аденокарциномы легких (He et al., 2024), широко используется в исследовании процессов ангиогенеза в опухолях, метастазирования, для тестирования противоопухолевых препаратов, а также в исследованиях опухолевого микроокружения. LLC является одной из наиболее воспроизводимых моделей метастазирования (Skurikhin et al., 2024). Так как LLC изначально получена у мышей C57Bl/6, в этой части работы использовали мышей C57Bl/6. Задачей этой части работы было исследование выраженности метастазирования, иммунного и воспалительного ответа на модели карциномы легких Льюис у животных в зависимости от исходной устойчивости к гипоксии.

По результатам определения устойчивости к гипоксии в барокамере по «времени жизни» на «высоте» 10 000 м среди половозрелых мышей C57Bl/6 41,3% оказались ВУ со «временем жизни» более 10 мин, 34,8% – НУ со «временем жизни» менее 3 мин (рис. 3.7.1).

---

[7]При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении научных степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования (в скобках приведен импакт-фактор журнала, объем публикации в условных печатных листах/вклад автора в условных печатных листах):

1. **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 РИНЦ 0,988, RSCI (0,50/0,35) [**Dzhalilova D.Sh.**, Maiak M.A., Kosyreva 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 WoS (JIF), Q4 (0,50/0,35)]

Рис. 3.7.1. Результаты разделения половозрелых мышей C57Bl/6 в барокамере на критической «высоте» 10 000 м на ВУ, СУ и НУ

3.7.1. Гибель животных, частота развития опухолей и метастазирования, динамика массы тела на 21-е и 28-е сут после подкожного введения клеток карциномы легких у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6

На 28-е сут после подкожного введения клеток карциномы легких гибель ВУ мышей составила 13,3% (погибли 4 мыши из 30), а НУ – 11,1% (погибли 3 животных из 27), при этом гибель НУ животных началась с 21-х сут исследования (табл. 3.7.1, рис. 3.7.2). Показатели статистически значимо не различались.

Таблица 3.7.1

Гибель ВУ и НУ мышей в течение прогрессии карциномы легких, p – статистическая значимость различий, точный тест Фишера

Группы наблюдения / **Гибель**	**21-е сут эксперимента**		**p**
	ВУ (n=30)	**НУ (n=27)**	
Выжило	30 (100%)	26 (96,3%)	0,47
Погибло	0 (0%)	1 (3,7%)	
	28-е сут эксперимента		**p**
Группы наблюдения / **Гибель**	**ВУ (n=30)**	**НУ (n=27)**	
Выжило	26 (86,7%)	24 (88,9%)	0,99
Погибло	4 (13,3%)	3 (11,1%)	

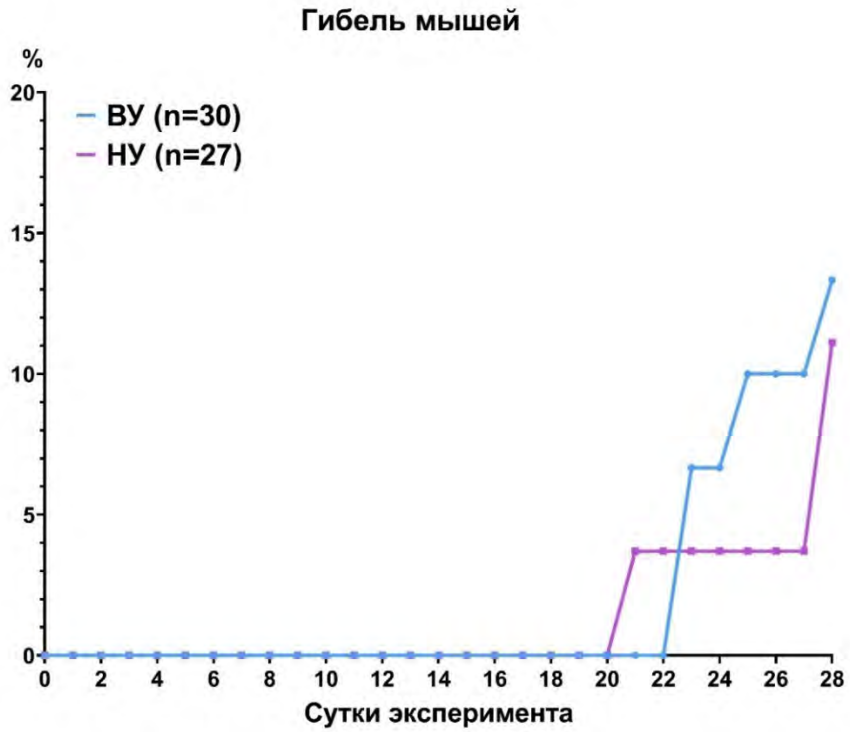


Рис. 3.7.2. Гибель ВУ и НУ мышей в течение прогрессии карциномы легких

На 28-е сут после подкожного введения клеток карциномы легких Льюис опухоли сформировались у 84,6 % (22 животных из 26) ВУ животных и 91,7% (22 из 24) НУ мышей, показатели статистически значимо не различались (табл. 3.7.2).

Таблица 3.7.2

Развитие опухолей у ВУ и НУ мышей на 28-е сут после введения клеток карциномы легких, p – статистическая значимость различий, точный тест Фишера

Группы наблюдения / **Развитие опухоли**	**ВУ (n=26)**	**НУ (n=24)**	**p**
Да	22 (84,6%)	22 (91,7%)	0,67
Нет	4 (15,4%)	2 (8,3%)	

У ВУ и НУ мышей как на 21-е, так и на 28-е сут после подкожного введения клеток карциномы легких Льюис обнаружено формирование метастазов в легких. На 21-е сут после введения опухолевых клеток метастазы обнаружены у 4 из 12 ВУ (33,3%) и у 4 из 12 НУ (33,3%) животных, а на 28-е сут – у 9 из 14 ВУ (64,3%) и 6 из 12 НУ (50%) мышей. Различий в частоте возникновения метастазов у двух групп животных с разной устойчивостью к гипоксии не обнаружено (табл. 3.7.3).

Таблица 3.7.3

Метастазирование в легкие у ВУ и НУ мышей в течение прогрессии карциномы легких, p – статистическая значимость различий, точный тест Фишера

Группы наблюдения / **Метастазы в легких**	**ВУ (n=26)**	**НУ (n=24)**	**p**
Да	13 (50%)	10 (41,7%)	0,58
Нет	13 (50%)	14 (58,3%)	

Таким образом, на 28-е сут после введения клеток карциномы легких Льюис различий между ВУ и НУ животными по показателям гибели, частоте развития опухолей и метастазирования в легкие не выявлено (рис. 3.7.3). Дальнейшие исследования проводили у ВУ и НУ животных с развившимися опухолями.

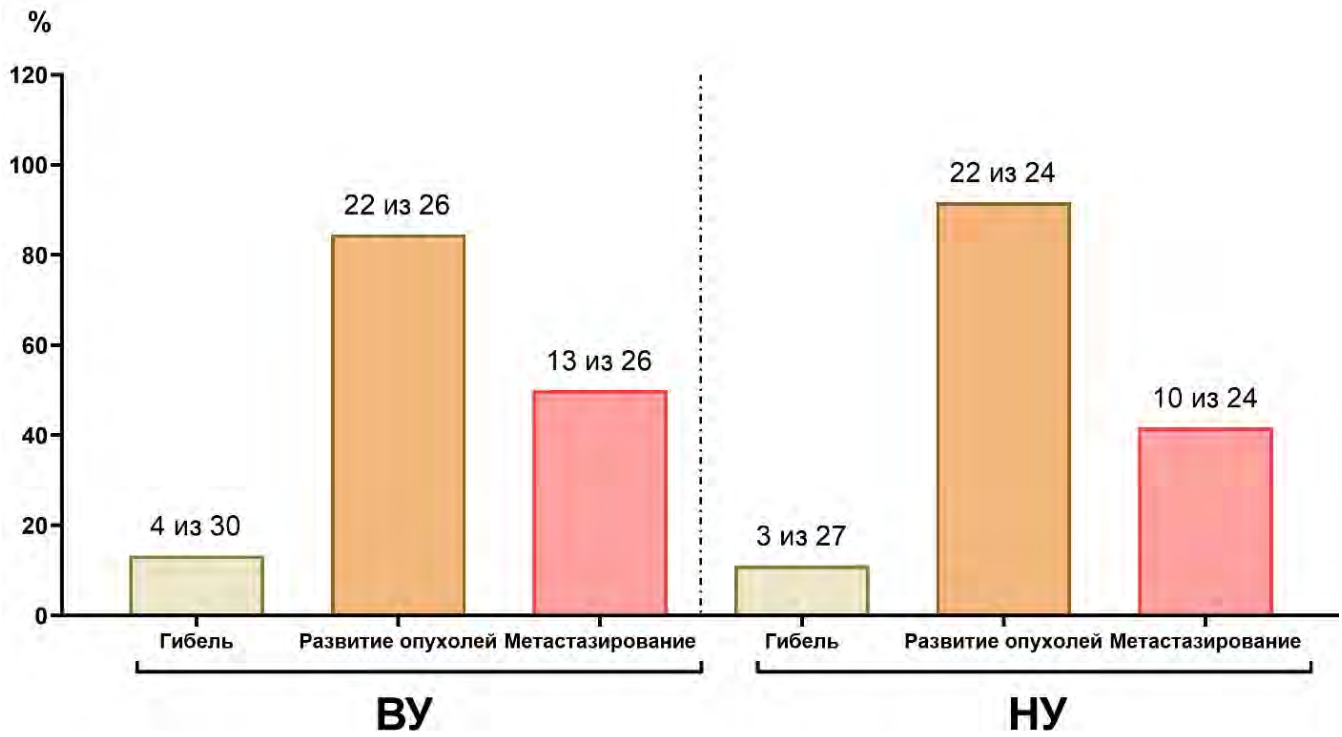


Рис. 3.7.3. Гибель мышей, частота развития подкожных опухолей и метастазирования в легкие в течение прогрессии карциномы легких у ВУ и НУ мышей

На 21-е сут эксперимента по сравнению с началом исследования масса тела как у ВУ, так и НУ мышей не изменялась, а на 28-е сут – увеличивалась. Между ВУ и НУ животными различий по массе тела во все сроки эксперимента не выявлено (табл. 3.7.4 Приложения 7, рис. 3.7.4).

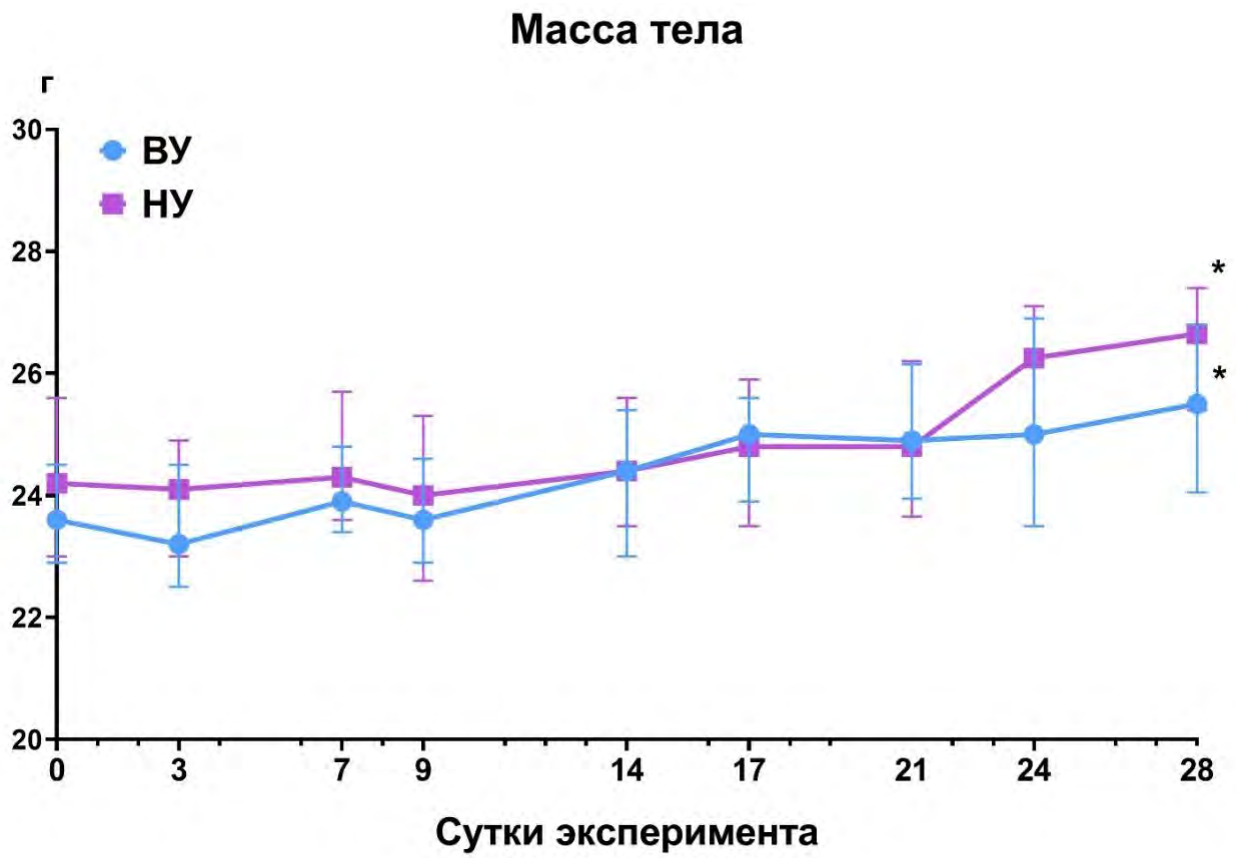


Рис. 3.7.4. Изменение массы тела в разные сроки после введения клеток карциномы легких у ВУ и НУ мышей, Me (25%-75%), статистически значимые различия ($p<0,05$): * – по сравнению с началом эксперимента (критерии Краскела-Уоллиса и Данна)

3.7.2. Оценка массы и объема подкожных опухолей, морфологическое исследование опухолей и анализ пролиферативной активности опухолевых клеток на 21-е и 28-е сут после подкожного введения клеток карциномы легких у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6

На 28-е сут эксперимента по сравнению с 21-ми сут у ВУ и НУ животных выявлено значительное увеличение как массы, так и объема подкожного опухолевого узла. При этом между ВУ и НУ мышами как на 21-е, так и на 28-е сут эксперимента статистически значимых различий по этим показателям не обнаружено (табл. 3.7.5 Приложения 7, рис. 3.7.5).

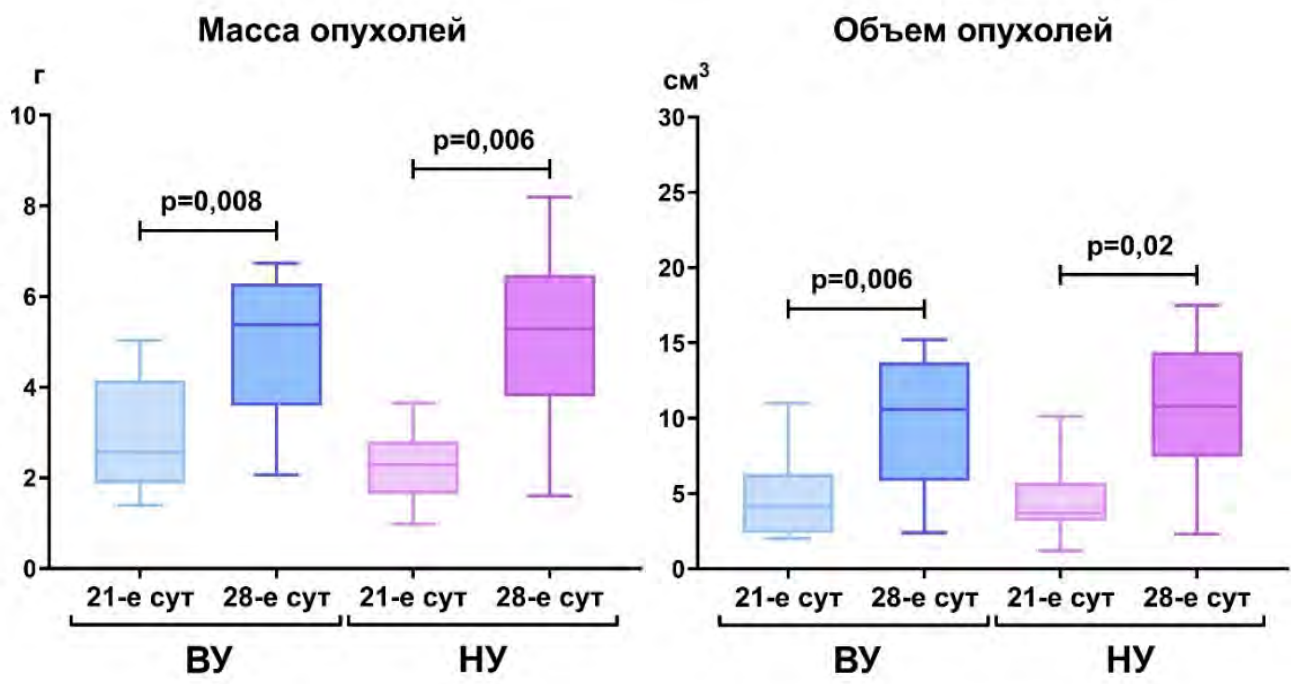


Рис. 3.7.5. Масса и объем подкожных опухолей у ВУ и НУ мышей на 21-е и 28-е сут после введения клеток карциномы легких, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Как у ВУ, так и у НУ мышей подкожный опухолевый узел, формирующийся на 21-е и 28-е сут эксперимента, был представлен полиморфными опухолевыми клетками. В опухолях наблюдались гигантские клетки, митозы, в том числе патологические. Опухолевые клетки инфильтрировали прилежащую скелетную мышечную ткань, в центре опухолей наблюдались обширные зоны некрозов (рис. 3.7.6, рис. 3.7.7).

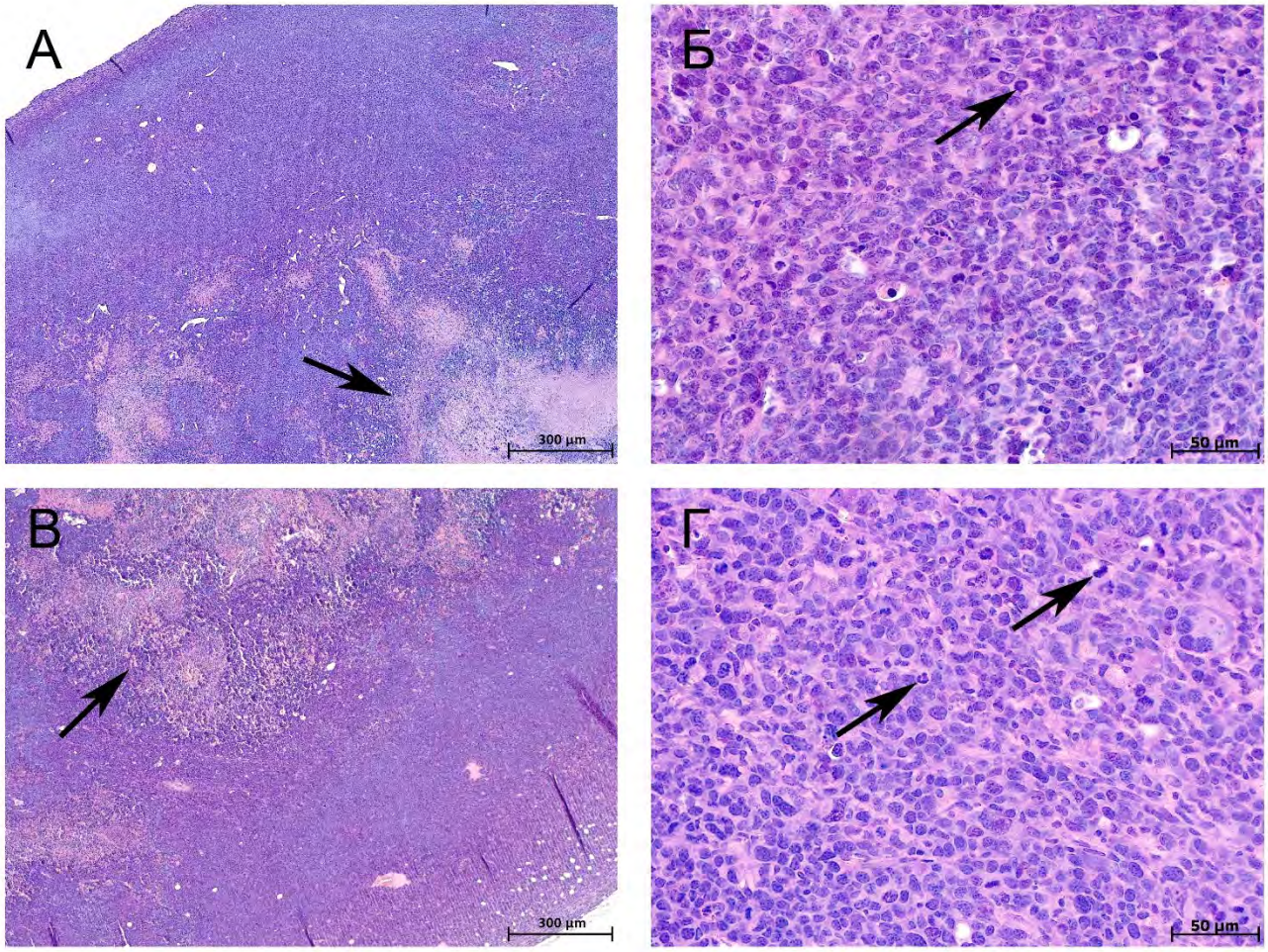


Рис. 3.7.6. Морфологическая характеристика подкожного опухолевого узла, формирующегося у мышей на 28-е сут после введения клеток карциномы легких. А, Б – ВУ; В, Г – НУ. А, В – обширные зоны некрозов в центре опухолевого узла (стрелки); Б, Г – полиморфные опухолевые клетки и митозы (стрелки). Окраска гематоксилином и эозином

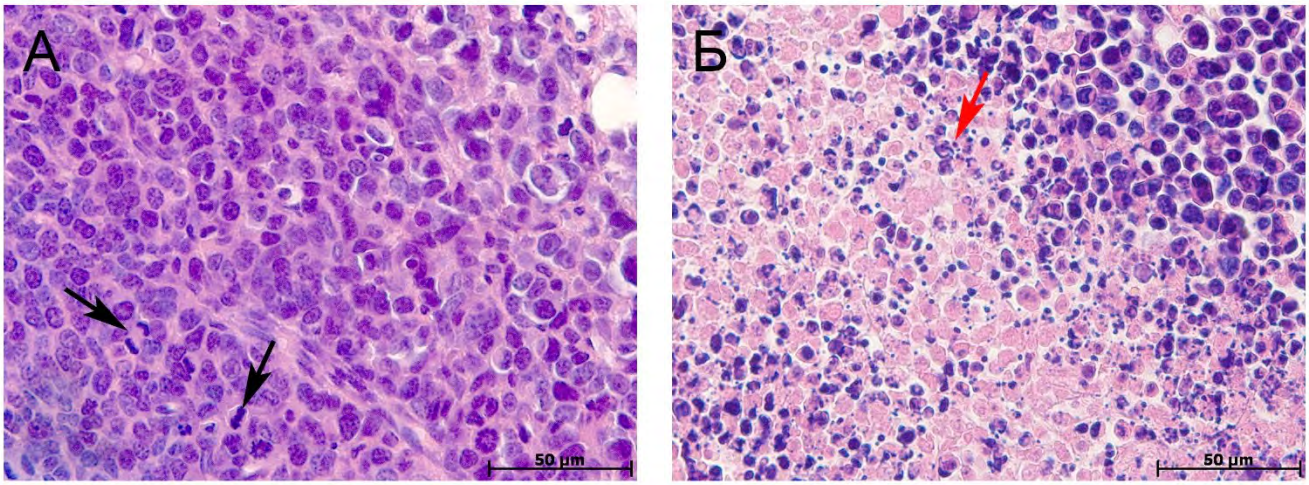


Рис. 3.7.7. Морфологическая характеристика подкожного опухолевого узла, формирующегося у мышей на 28-е сут после введения клеток карциномы легких. А – полиморфные опухолевые клетки и митозы (черные стрелки); Б – зона некроза с гибнущими клетками (красная стрелка). Окраска гематоксилином и эозином

По данным морфометрического исследования первичных подкожных опухолей показано, что число митозов по отношению к остальным клеткам было выше в опухолях у ВУ мышей по сравнению с НУ как на 21-е, так и на 28-е сут эксперимента. При этом различий по данному показателю на 28-е сут исследования по сравнению с 21-ми не выявлено как у ВУ, так и у НУ животных (табл. 3.7.6 Приложения 7, рис. 3.7.8).

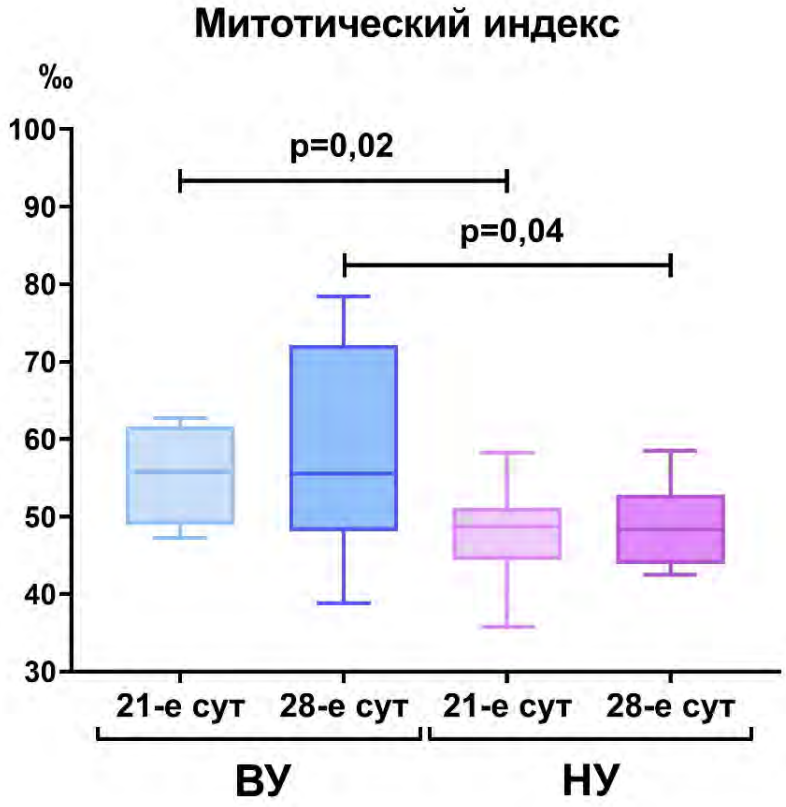


Рис. 3.7.8. Митотический индекс первичных подкожных опухолей у ВУ и НУ мышей на 21-е и 28-е сут после введения клеток карциномы легких, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

3.7.3. Морфологическое и морфометрическое исследование легких на 21-е и 28-е сут после подкожного введения клеток карциномы легких у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6

Введение клеток карциномы легких Льюис лабораторным животным является распространенной моделью метастазирования, при подкожной трансплантации опухоль метастазирует преимущественно в легкие (He et al., 2024; Skurikhin et al., 2024).

При микроскопическом исследовании легких у ВУ и НУ мышей в оба срока эксперимента выявлены метастазы. Как упоминалось выше, различий в частоте метастазирования между двумя группами животных обнаружено не было. Метастазы в легких были представлены группами полиморфных опухолевых клеток (рис. 3.7.9). Вокруг метастатических очагов определялась лимфоидно-гистиоцитарная инфильтрация (рис. 3.7.10). В просвете сосудов были выявлены опухолевые клетки (рис. 3.7.11).

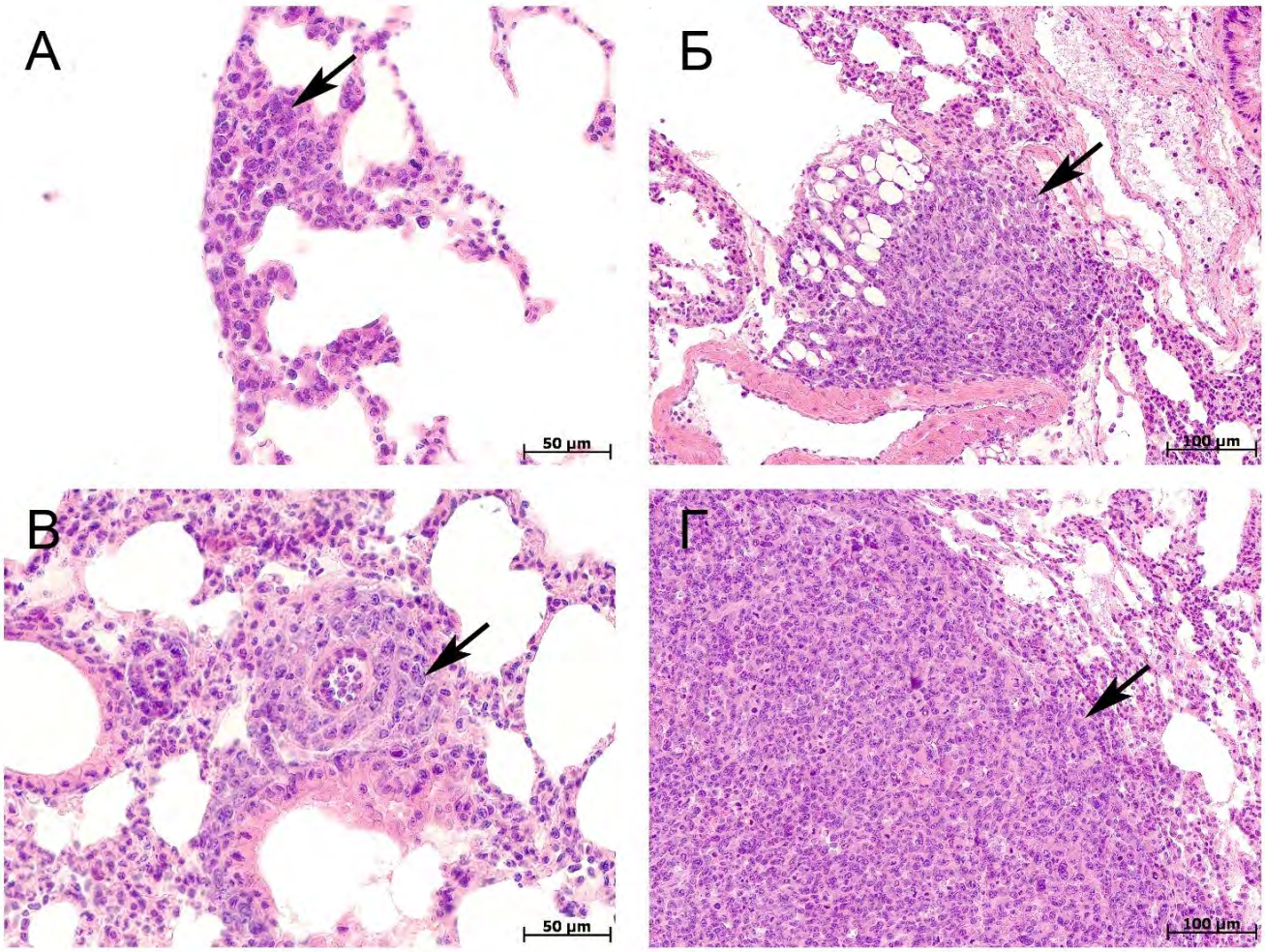


Рис. 3.7.9. Морфологическая характеристика метастазов в легких у мышей на 21-е (А, В) и 28-е (Б, Г) сут после введения клеток карциномы легких. А, Б – ВУ; В, Г – НУ. Метастазы в легких представлены группами полиморфных опухолевых клеток (черные стрелки). Окраска гематоксилином и эозином

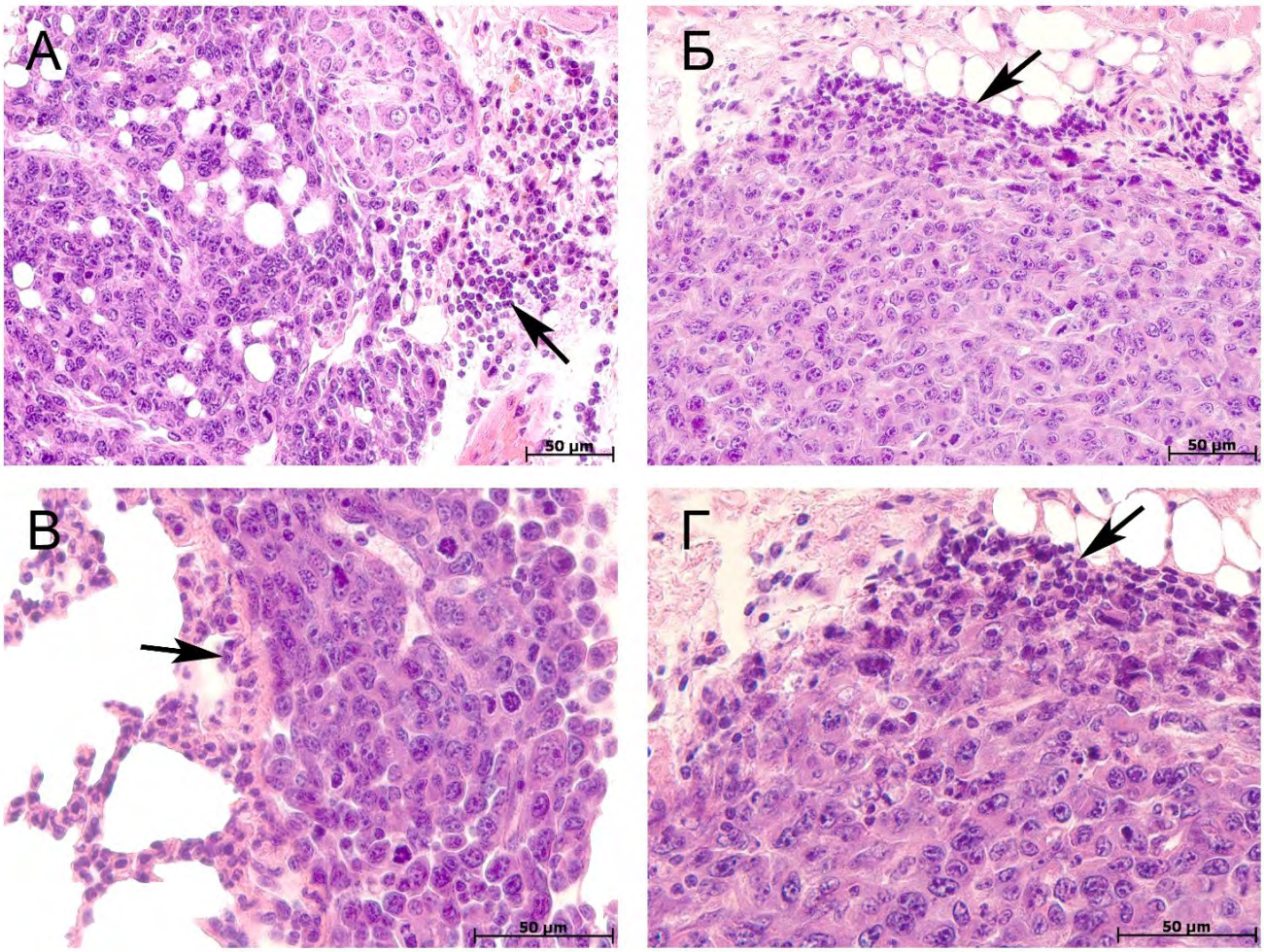


Рис. 3.7.10. Воспалительная инфильтрация вокруг метастатических очагов в легких у мышей на 28-е сут после введения клеток карциномы легких. А, В – ВУ; Б, Г – НУ. Воспалительная инфильтрация вокруг опухолевых клеток (черные стрелки). Окраска гематоксилином и эозином

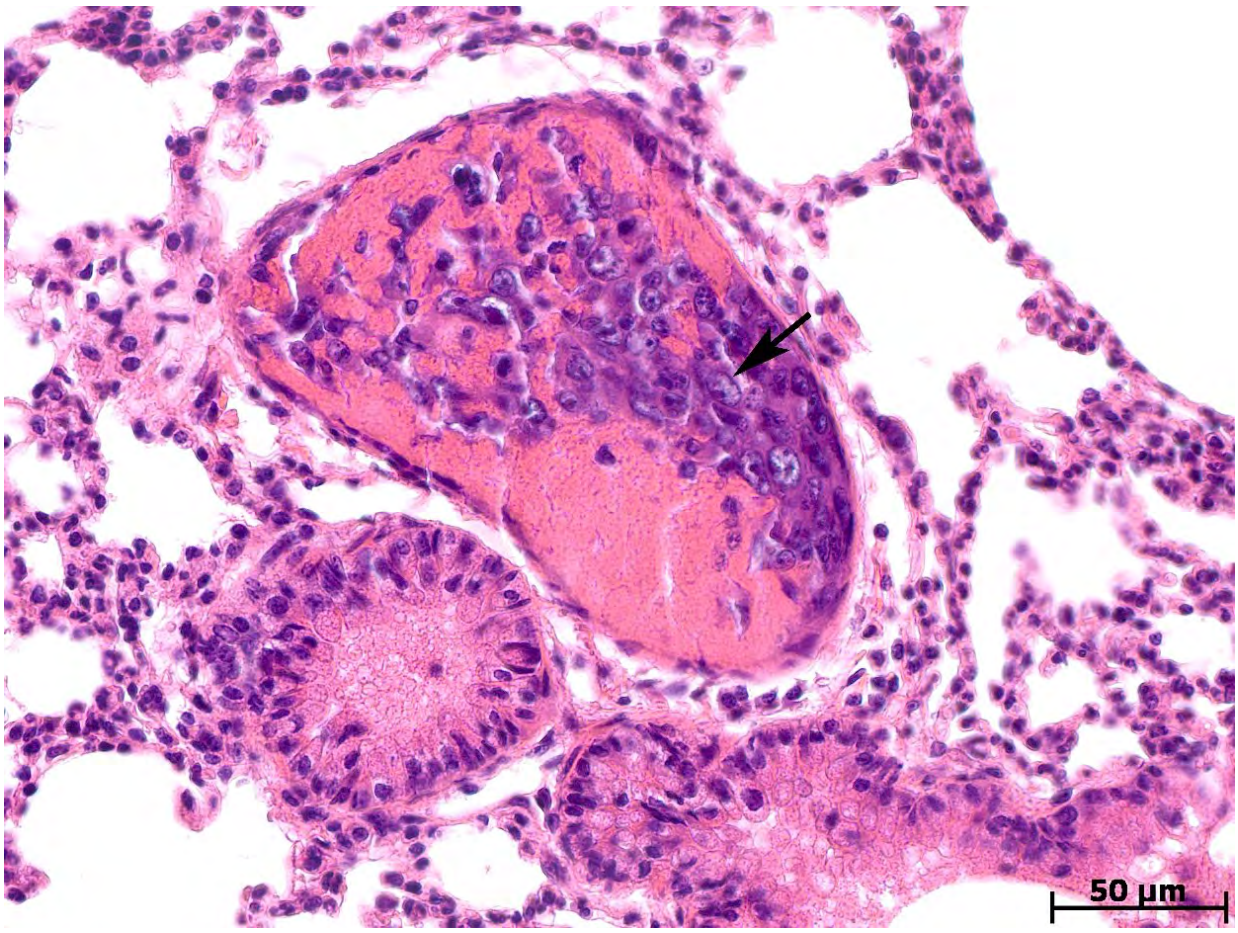


Рис. 3.7.11. Опухолевые клетки (черная стрелка) в просвете ветви легочной артерии у НУ мыши на 28-е сут после введения клеток карциномы легких. Окраска гематоксилином и эозином

По данным морфометрического исследования ступенчато-серийных гистологических срезов легких 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. 3.7.7).

Таблица 3.7.7

Площадь метастазов в легких у ВУ и НУ мышей на 21-е и 28-е сут после введения клеток карциномы легких, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Группы наблюдения / **Параметр**	**21-е сут эксперимента**		**28-е сут эксперимента**		**p**
	ВУ[1] (n=4)	**НУ[2] (n=4)**	**ВУ[3] (n=9)**	**НУ[4] (n=6)**	
Площадь метастазов в легких, мкм²	5527 (1779-32096)	7547 (5869-36498)	7529 (2239-46254)	13542 (3897-43843)	$0,69^{1-2}$ $0,83^{1-3}$ $0,89^{2-4}$ $0,67^{3-4}$

3.7.4. Морфологическое и морфометрическое исследование тимуса и морфологическое исследование селезенки на 21-е и 28-е сут после подкожного введения клеток карциномы легких у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6

При морфологическом исследовании тимуса у ВУ и НУ мышей контрольных групп в дольках соотношение коркового и мозгового вещества примерно 1:1, корковое вещество плотно заселено лимфоцитами (рис. 3.7.12, А, Б, черные стрелки). Границы между корковым и мозговым веществом четкие (рис. 3.7.12, А, Б, синие стрелки).

После подкожного введения опухолевых клеток на 21-е сут эксперимента в тимусе у части ВУ и НУ животных обнаружена гиперплазия коркового вещества долек, появление участков очагово нечетких границ между корковым и мозговым веществом (рис. 3.7.12, В, Г, черные и синие стрелки). У части ВУ и НУ мышей в тимусе наблюдалась акцидентальная инволюция II стадии, проявляющаяся выраженным снижением объемной доли коркового вещества, увеличением количества тимических телец поздних стадий развития, появлением тимических телец в виде кистоподобных полостей в корковом и мозговом веществе, вызванным гибелью тимоцитов (рис. 3.7.12, Д, Е).

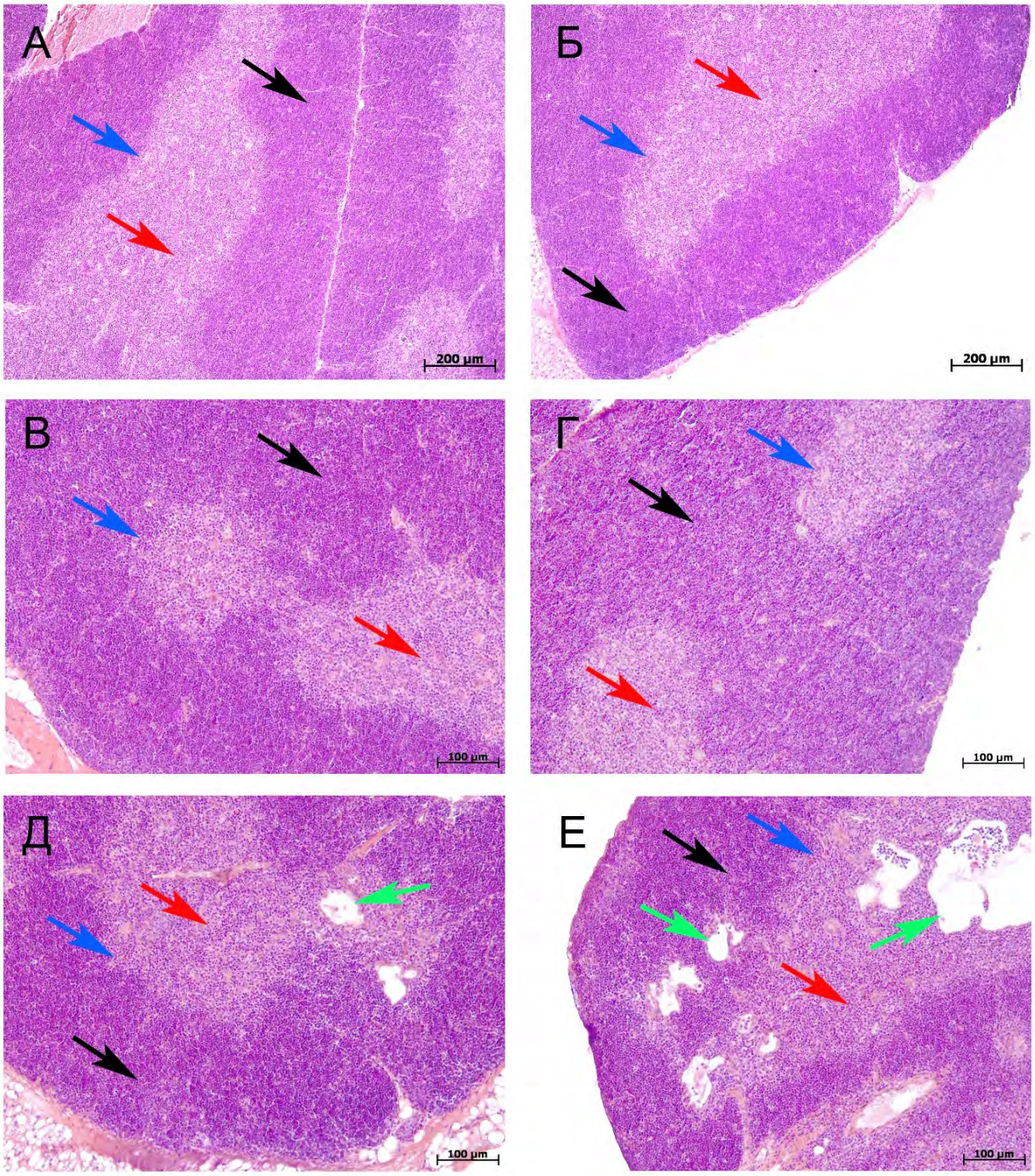


Рис. 3.7.12. Морфологическая характеристика долек тимуса у ВУ (А, В, Д) и НУ (Б, Г, Е) мышей контрольных групп (А, Б) и на 21-е сут (В-Е) после подкожного введения клеток карциномы легких. А, Б – соотношение границ между корковым (черные стрелки) и мозговым (красные стрелки) веществом примерно 1:1, границы четкие (синие стрелки); В, Г – гиперплазия коркового вещества (черные стрелки), очагово нечеткие границы между корковым и мозговым веществом (синие стрелки), мозговое вещество (красные стрелки); Д, Е – снижение объемной доли коркового вещества (черные стрелки), очагово нечеткие границы между корковым и мозговым веществом (синие стрелки), мозговое вещество (красные стрелки), увеличение количества тимических телец, появление тимических телец в виде кистоподобных полостей (зеленые стрелки). Окраска гематоксилином и эозином

На 28-е сут после подкожного введения клеток карциномы легких в тимусе животных обнаружена акцидентальная инволюция I и II стадий, у 2 НУ и 3 ВУ мышей – инволюция IV стадии, проявляющаяся инверсией слоев, значительным опустошением коркового вещества долек, редукцией тимических телец (рис. 3.7.13).

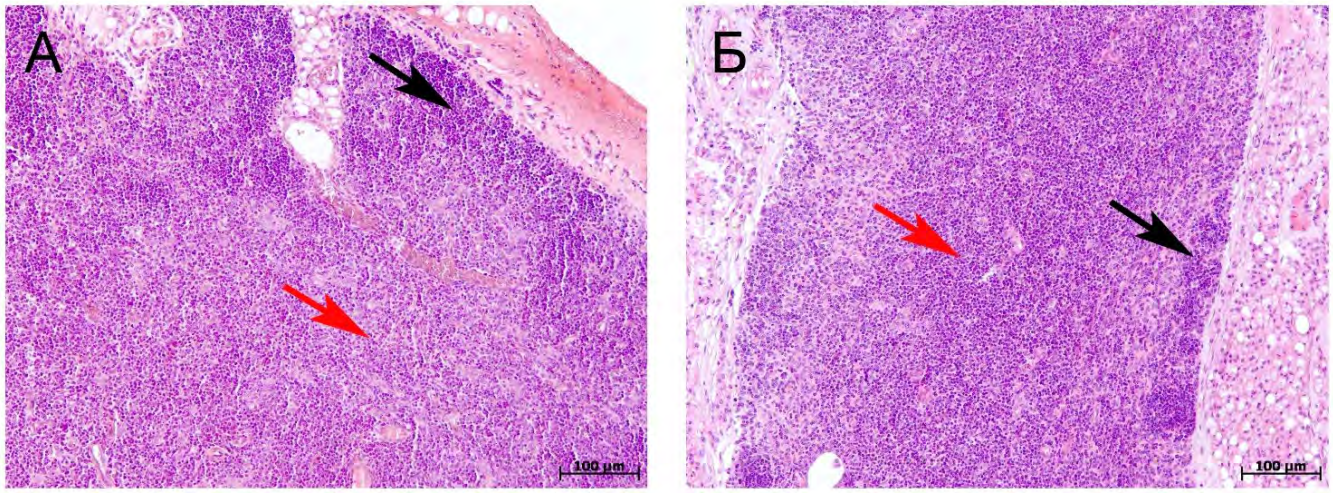


Рис. 3.7.13. Морфологическая характеристика долек тимуса у ВУ (А) и НУ (Б) мышей на 28-е сут после введения клеток карциномы легких. Акцидентальная инволюция IV стадии, инверсия слоев, резкое опустошение коркового вещества (черные стрелки) и расширение мозгового вещества (красные стрелки) долек тимуса. Окраска гематоксилином и эозином

При морфометрическом исследовании тимуса животных контрольных и опытных групп различий между ВУ и НУ мышами по показателям объемной доли коркового и мозгового вещества, а также отношения коркового вещества к мозговому не обнаружено (табл. 3.7.8).

По данным морфометрического исследования у НУ животных на 21-е сут после подкожного введения опухолевых клеток по сравнению с контрольной группой обнаружено увеличение количества тимических телец с кератогиалином. У ВУ мышей статистически значимого увеличения числа тимических телец с кератогиалином по сравнению с контрольной группой не наблюдалось. Ни в одной из исследуемых групп не обнаружено статистически значимых изменений количества тимических телец, состоящих из 3-5 и более, чем 5 клеток (табл. 3.7.9 Приложения 7, рис. 3.7.14).

На 21-е сут эксперимента у НУ животных по сравнению с ВУ было выше количество тимических телец в виде кистоподобных полостей. На 28-е сут эксперимента различий у ВУ и НУ мышей по числу тимических телец разных типов не выявлено (табл. 3.7.9 Приложения 7, рис. 3.7.14).

Таблица 3.7.8

Морфометрические показатели объемной доли структурно-функциональных зон долек тимуса у ВУ и НУ мышей контрольных групп, на 21-е и 28-е сут после введения клеток карциномы легких, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

Группы наблюдения / Параметры	Контрольные		Опытные				p
			21-е сут эксперимента		28-е сут эксперимента		
	ВУ[1] (n=5)	НУ[2] (n=8)	ВУ[3] (n=12)	НУ[4] (n=12)	ВУ[5] (n=10)	НУ[6] (n=10)	
Корковое вещество, %	57,6 (51,3-61,6)	56,0 (52,6-70,9)	60,9 (56,4-67,4)	58,2 (53,6-61,0)	59,6 (58,4-66,0)	57,8 (53,3-61,5)	$0,91^{1-2}$; $0,21^{3-4}$ $0,34^{5-6}$; $0,41^{1-3}$ $0,99^{1-5}$; $0,99^{2-4}$ $0,99^{2-6}$; $0,99^{3-5}$ $0,99^{4-6}$
Мозговое вещество, %	42,4 (38,4-48,7)	44,0 (29,1-47,4)	39,1 (32,6-43,6)	41,8 (39,0-46,4)	40,4 (34,0-41,6)	42,2 (38,5-46,7)	$0,91^{1-2}$; $0,21^{3-4}$ $0,34^{5-6}$; $0,39^{1-3}$ $0,93^{1-5}$; $0,99^{2-4}$ $0,99^{2-6}$; $0,99^{3-5}$ $0,99^{4-6}$
Отношение коркового вещества к мозговому, усл. ед.	1,4 (1,1-1,6)	1,3 (1,1-2,7)	1,6 (1,4-2,1)	1,4 (1,1-1,6)	1,6 (1,4-1,9)	1,3 (1,2-1,6)	$0,97^{1-2}$; $0,16^{3-4}$ $0,29^{5-6}$; $0,30^{1-3}$ $0,63^{1-5}$; $0,99^{2-4}$ $0,99^{2-6}$; $0,99^{3-5}$ $0,99^{4-6}$

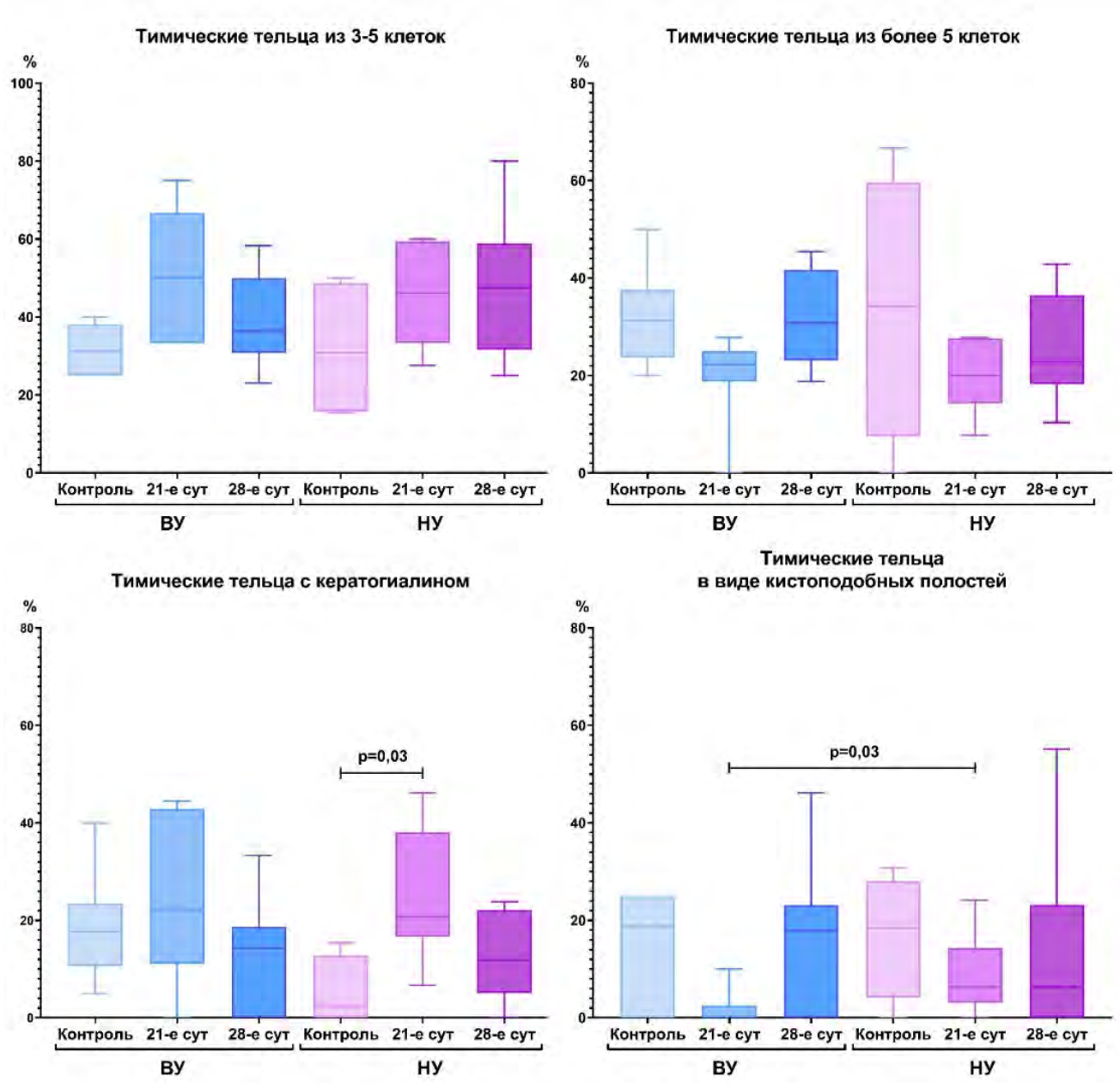


Рис. 3.7.14. Тимические тельца, состоящие из 3-5 клеток и более 5 клеток, тельца с кератогиалином и в виде кистоподобных полостей у ВУ и НУ мышей контрольных групп, на 21-е и 28-е сут после введения клеток карциномы легких, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

По данным морфологического исследования в селезенке у ВУ и НУ мышей контрольных групп (рис. 3.7.15, А, Б) соотношение красной и белой пульпы составляло примерно 1:1, белая пульпа была представлена лимфоидными узелками со светлыми центрами и без них, а также слабо выраженными ПАЛМ-зонами. В красной пульпе выявлено небольшое количество мегакариоцитов.

У ВУ и НУ мышей на 21-е и 28-е сут эксперимента в селезенке преобладала красная пульпа, выявлено умеренное и выраженное истощение белой пульпы (рис. 3.7.15, В-Е), которая была представлена лимфоидными узелками со светлыми центрами и без них. Наблюдалось

значительное увеличение количества мегакариоцитов в красной пульпе селезенки. У 1 ВУ и 1 НУ мыши на 28-е сут эксперимента выявлена гиперплазия белой пульпы селезенки.

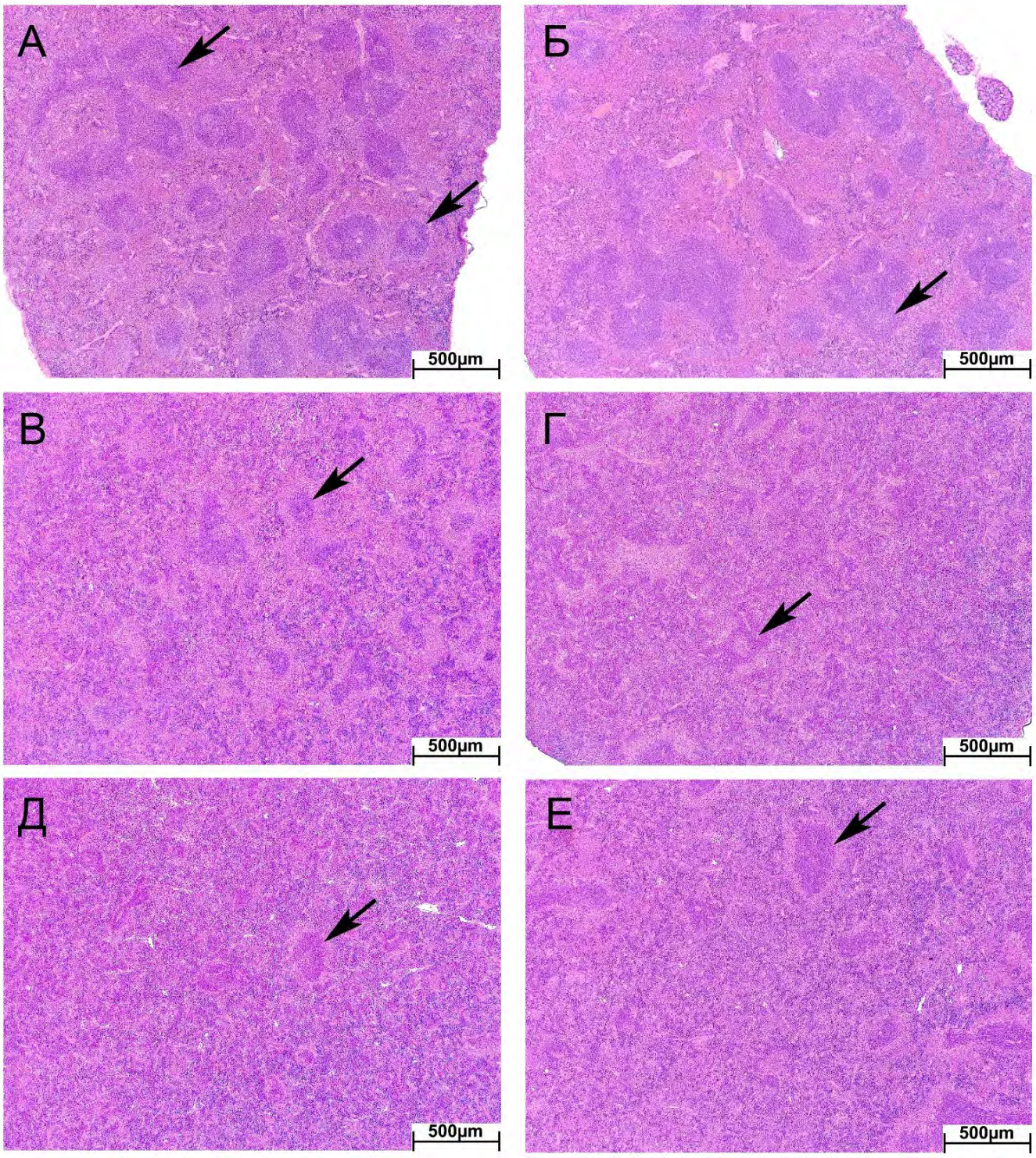


Рис. 3.7.15. Морфологическая характеристика селезенки у ВУ (А, В, Д) и НУ (Б, Г, Е) мышей контрольных групп (А, Б), на 21-е (В, Г) и 28-е сут (Д, Е) после введения клеток карциномы легких. А, Б – контрольные группы, белая и красная пульпы; В, Г – умеренная редукция белой пульпы; Д, Е – выраженная редукция белой пульпы – лимфоидные узелки небольшие, ПАЛМ-зоны не выражены. Стрелки – лимфоидные узелки. Окраска гематоксилином и эозином

3.7.5. Клинический анализ и субпопуляционный состав клеток периферической крови на 21-е и 28-е сут после подкожного введения клеток карциномы легких у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6

По данным клинического анализа крови как у ВУ, так и у НУ мышей на 21-е и 28-е сут после введения клеток карциномы легких по сравнению с контрольными группами обнаружено снижение количества эритроцитов и содержания гемоглобина. На 28-е сут эксперимента у ВУ и НУ мышей по сравнению с контрольными группами обнаружено статистически значимое повышение абсолютного числа лейкоцитов, моноцитов и гранулоцитов, относительного числа гранулоцитов и снижение относительного количества лимфоцитов (табл. 3.7.10 Приложения 7, рис. 3.7.16).

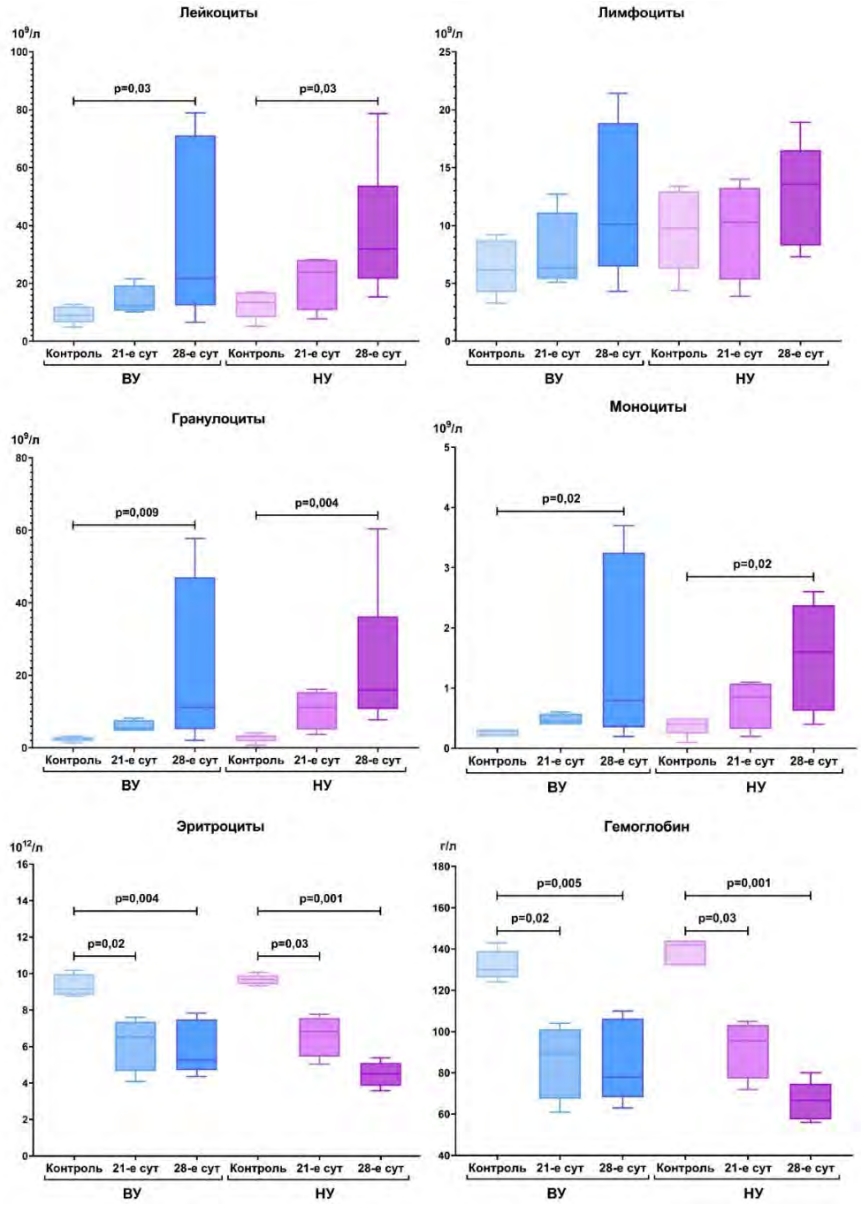


Рис. 3.7.16. Абсолютное число лейкоцитов, лимфоцитов, гранулоцитов, моноцитов, эритроцитов и содержание гемоглобина в крови у ВУ и НУ мышей контрольных групп, на 21-е и 28-е сут после подкожного введения клеток карциномы легких, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

Индекс LMR снижался, а NLR, напротив, повышался на 21-е и 28-е сут после подкожного введения клеток карциномы легких у НУ животных и на 28-е сут у ВУ мышей (табл. 3.7.11 Приложения 7, рис. 3.7.17). Индекс SIRI повышался (в 21,4 раза) на 28-е сут эксперимента только у НУ животных (табл. 3.7.11 Приложения 7, рис. 3.7.18).

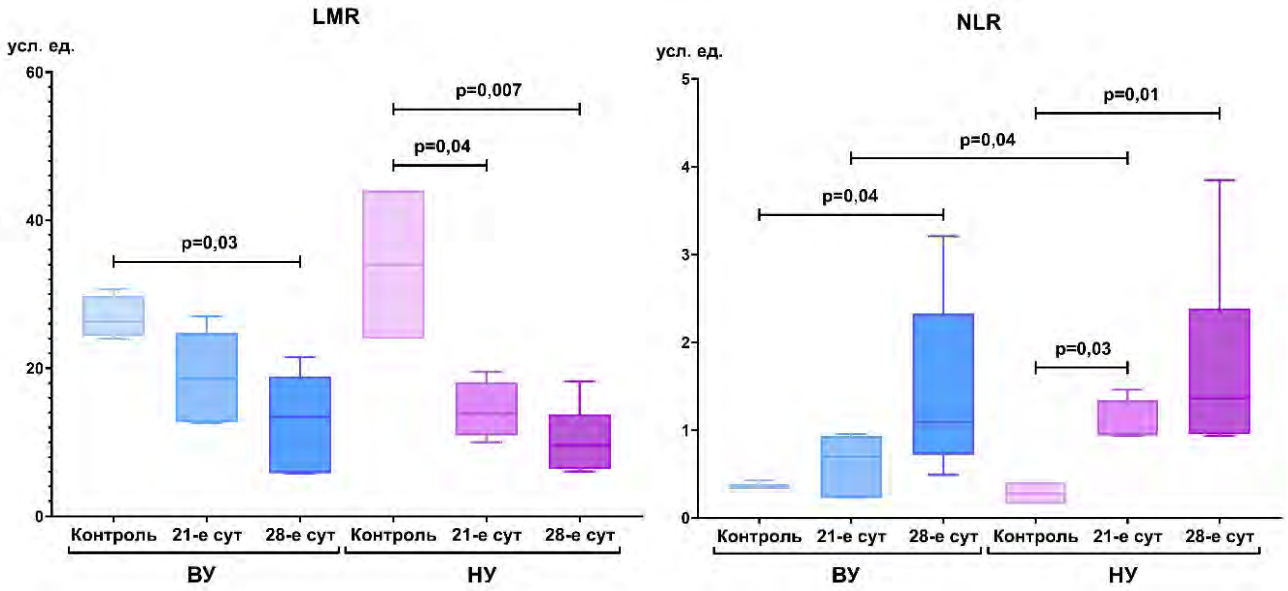


Рис. 3.7.17. Лимфоцитарно-моноцитарный (LMR) и нейтрофильно-лимфоцитарный (NLR) индексы у ВУ и НУ мышей контрольных групп, на 21-е и 28-е сут после подкожного введения клеток карциномы легких, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

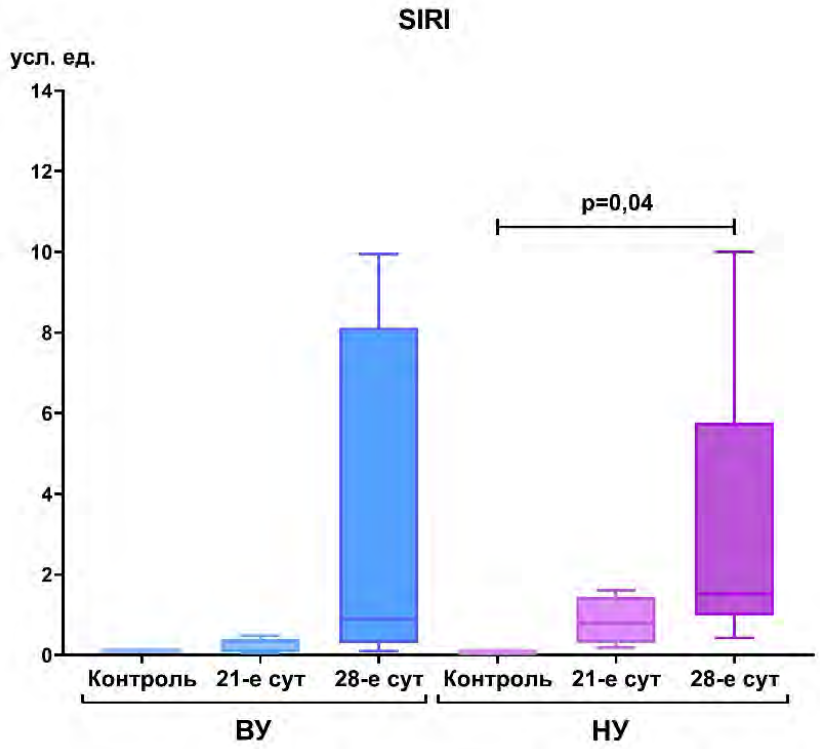


Рис. 3.7.18. Индекс SIRI у ВУ и НУ мышей контрольных групп, на 21-е и 28-е сут после подкожного введения клеток карциномы легких, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

По данным проточной цитофлуориметрии в периферической крови у ВУ и НУ мышей относительное и абсолютное число цитотоксических Т-лимфоцитов, Т-хелперов, NK клеток и В-лимфоцитов на 28-е сут эксперимента не различалось по сравнению с животными контрольных групп. Обнаружено статистически значимое повышение абсолютного (в 12 раз) и относительного (в 1,6 раза) количества CD11b+ моноцитов в периферической крови у НУ мышей на 28-е сут по сравнению с контрольной группой (табл. 3.7.12).

Таблица 3.7.12

Субпопуляционный состав клеток периферической крови у ВУ и НУ мышей контрольных групп и на 28-е сут после подкожного введения клеток карциномы легких, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Группы наблюдения / **Параметры**		**Контрольные**		**28-е сут эксперимента**	
		ВУ[1] (n=5)	**НУ[2] (n=8)**	**ВУ[3] (n=10)**	**НУ[4] (n=10)**
Т-хелперы (CD3+CD4+)	% от лимфоцитов	1,4 (0,8-2,1)	2,2 (0,4-2,6)	1,3 (0,5-2,5)	1,7 (0,5-2,3)
	10^6/мл	0,13 (0,06-0,16)	0,10 (0,02-0,19)	0,22 (0,06-0,47)	0,19 (0,05-0,34)
Цитотоксические Т-лимфоциты (CD3+CD8+)	% от лимфоцитов	1,0 (0,4-1,3)	1,0 (0,4-1,2)	1,2 (0,3-2,8)	1,5 (0,3-1,7)
	10^6/мл	0,09 (0,03-0,1)	0,05 (0,02-0,09)	0,22 (0,05-0,51)	0,19 (0,02-0,25)
В-лимфоциты (CD3-CD19+)	% от лимфоцитов	9,3 (3,2-12,7)	4,4 (1,6-5,0)	9,3 (3,4-11,9)	4,3 (1,6-6,7)
	10^6/мл	0,9 (0,2-1,0)	0,2 (0,1-0,3)	1,6 (0,5-2,0)	0,5 (0,2-0,8)
NK клетки (CD3-NK1.1+)	% от лимфоцитов	0,1 (0,1-0,1)	0,4 (0,0-0,6)	0,1 (0,0-0,1)	0,1 (0,1-0,2)
	10^6/мл	0,011 (0,011-0,013)	0,03 (0,0-0,06)	0,02 (0,0-0,09)	0,04 (0,01-0,06)
Моноциты (CD11b+)	% от моноцитов	7,7 (5,0-8,5)	6,1 (0,4-6,9)	9,7 (8,6-9,9)	9,8 (8,1-9,9)*****
	10^6/мл	0,2 (0,2-0,3)	0,1 (0,004-0,21)	0,8 (0,3-3,2)	1,2 (0,6-2,3)**

*p=**0,02**, **p=**0,04** – статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой

3.7.6. Уровни экспрессии генов *Hif1a, Nfkb, Tnfa, Il1b* и *Tgfb* в печени на 21-е и 28-е сут после подкожного введения клеток карциномы легких у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6

По данным ПЦР в режиме реального времени у НУ животных контрольной группы уровень экспрессии *Hif1a* в печени был выше по сравнению с ВУ (табл. 3.7.13 Приложения 7, рис. 3.7.19). Только у НУ мышей обнаружено статистически значимое повышение экспрессии *Tnfa* и

снижение экспрессии *Tgfb* на 21-е сут эксперимента по сравнению с контрольной группой (табл. 3.7.13 Приложения 7, рис. 3.7.20). На 28-е сут после подкожного введения опухолевых клеток в печени у НУ мышей уровни экспрессии *Hif1a, Nfkb* и *Tgfb* были выше по сравнению с ВУ (табл. 3.7.13 Приложения 7, рис. 3.7.19, рис. 3.7.20). Кроме того, только у НУ животных выявлено повышение экспрессии гена *Nfkb* на 28-е сут эксперимента по сравнению с 21-ми. При этом статистически значимых изменений экспрессии *Il1b* в печени как у ВУ, так и у НУ мышей не обнаружено (табл. 3.7.13 Приложения 7).

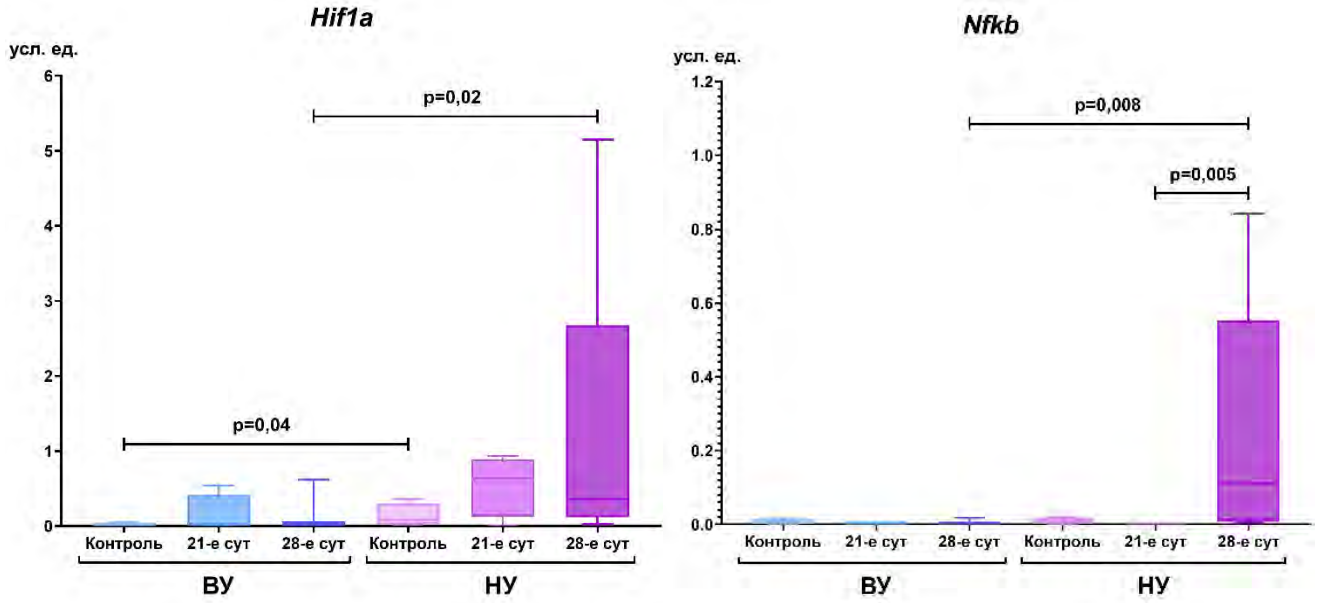


Рис. 3.7.19. Уровни экспрессии генов *Hif1a* и *Nfkb* в печени у ВУ и НУ мышей контрольных групп, на 21-е и 28-е сут после подкожного введения клеток карциномы легких, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

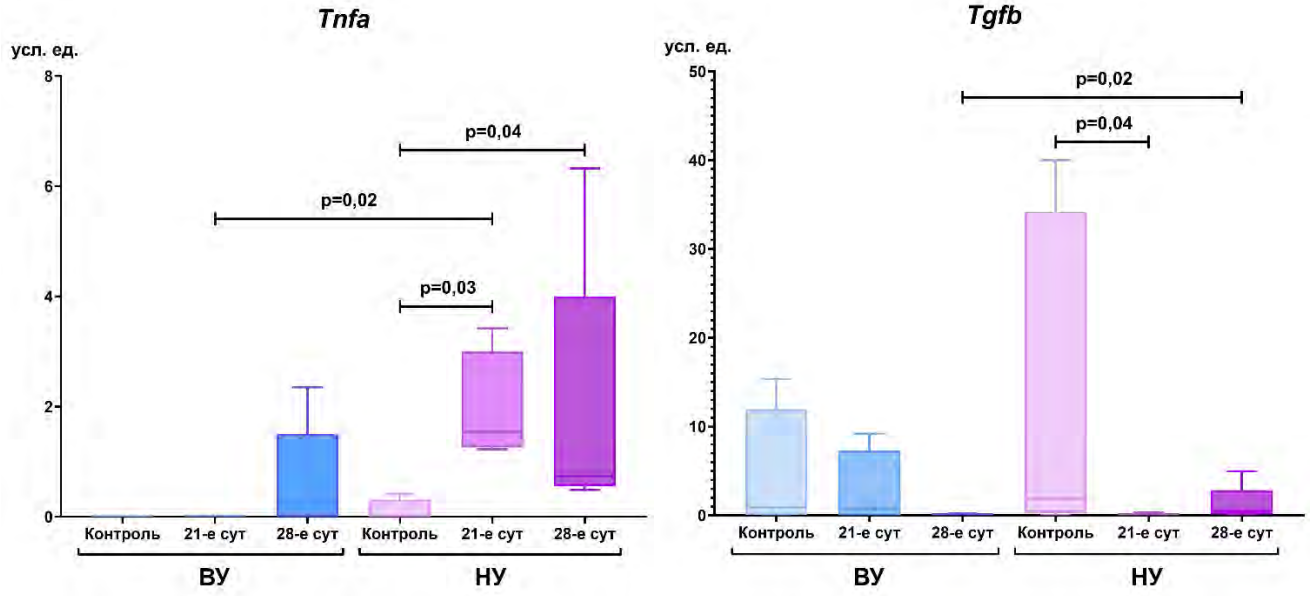


Рис. 3.7.20. Уровни экспрессии генов *Tnfa* и *Tgfb* в печени у ВУ и НУ мышей контрольных групп, на 21-е и 28-е сут после подкожного введения клеток карциномы легких, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

3.7.7. Содержание СРБ в сыворотке крови на 21-е и 28-е сут после подкожного введения клеток карциномы легких у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6

По данным ИФА содержание СРБ в сыворотке крови у ВУ и НУ животных как контрольных групп, так и на 21-е и 28-е сут после введения клеток карциномы легких не различалось (табл. 3.7.14).

Таблица 3.7.14

Содержание СРБ в сыворотке крови у ВУ и НУ мышей контрольных групп, на 21-е и 28-е сут после введения клеток карциномы легких, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

Группы наблюдения / Показатель	Контрольные		21-е сут эксперимента		28-е сут эксперимента		p
	ВУ[1] (n=5)	НУ[2] (n=8)	ВУ[3] (n=12)	НУ[4] (n=12)	ВУ[5] (n=10)	НУ[6] (n=10)	
СРБ, нг/мл	0,6 (0,2-0,8)	0,2 (0,0-0,4)	3,2 (1,3-4,5)	1,1 (0,4-3,1)	0,7 (0,4-3,1)	2,1 (0,4-5,2)	$0,27^{1-2}$; $0,33^{3-4}$ $0,61^{5-6}$; $0,35^{1-3}$ $0,99^{1-5}$; $0,99^{3-5}$ $0,60^{2-4}$; $0,35^{2-6}$ $0,99^{4-6}$

Заключение и обсуждение к 3.7

Таким образом, после подкожного введения клеток карциномы легких Льюис опухоли выявлены у 84,6% ВУ и 91,7% НУ мышей. Масса и объем первичных опухолевых узлов не различались у ВУ и НУ животных, а митотический индекс опухолевых клеток в подкожных узлах у ВУ мышей в оба срока эксперимента был статистически значимо выше по сравнению с НУ. В легких у ВУ и НУ животных на 21-е и 28-е сут после введения опухолевых клеток выявлены метастазы, площадь которых между двумя группами не различалась. В тимусе животных опытных групп развивалась акцидентальная инволюция I и II стадий, а в селезенке – редукция белой пульпы. По данным морфометрического исследования на 21-е сут эксперимента в тимусе у НУ мышей повышалось число тимических телец с накоплениями кератогиалина по сравнению с контрольной группой, а число тимических телец в виде кистоподобных полостей было выше по сравнению с ВУ животными. На 28-е сут эксперимента как у ВУ, так и у НУ мышей после подкожного введения клеток карциномы легких Льюис по сравнению с контрольными группами наблюдалось повышение абсолютного числа лейкоцитов, моноцитов и гранулоцитов, относительного числа гранулоцитов, снижение относительного числа лимфоцитов. Как у ВУ, так и у НУ мышей снижалось содержание эритроцитов и гемоглобина на 21-е и 28-е сут после введения опухолевых клеток. Индекс LMR снижался, а NLR, напротив, повышался на 21-е и 28-е сут после подкожного введения клеток карциномы легких у НУ животных и на 28-е сут у ВУ мышей. Индекс SIRI повышался на 28-е сут эксперимента только у НУ животных. Содержание CD11b+ моноцитов в крови повышалось на 28-е сут только у НУ мышей. По данным ПЦР в

режиме реального времени в печени у НУ животных на 28-е сут после подкожного введения клеток карциномы легких был выше уровень экспрессии *Hif1a* в печени по сравнению с ВУ. Уровни экспрессии *Nfkb* и *Tgfb* на 28-е сут эксперимента также были статистически значимо выше у НУ мышей по сравнению с ВУ. Кроме того, только у НУ животных выявлено повышение экспрессии гена *Nfkb* на 28-е сут эксперимента по сравнению с 21-ми сут. Только у НУ мышей обнаружено статистически значимое повышение экспрессии *Tnfa* и снижение экспрессии *Tgfb* на 21-е сут эксперимента по сравнению с контрольной группой (рис. 3.7.21). Таким образом, на модели перевиваемой карциномы легких Льюис показано, что темпы прогрессии и метастазирования у ВУ и НУ животных не различаются, однако СВО более выражен у НУ мышей.

Рак легких является наиболее часто диагностируемой злокачественной опухолью в мире (12,4% от общего числа случаев). В 2020 г. аденокарцинома легких была наиболее распространенным подтипом рака легких (Zhang et al., 2023д). Хотя сохраняется значительная региональная гетерогенность, уровень заболеваемости аденокарциномой был самым высоким в Восточной Азии среди обоих полов. При этом выявлено наличие обратной связи между уровнем заболеваемости и смертности от рака легких и высотой проживания (Simeonov и Himmelstein, 2015).

В большинстве исследований, в которых в качестве модели используют карциному легких Льюис, не уделяется внимания гистологическому подтипу опухоли. Известно, что клетки LLC получены от мыши с немелкоклеточным раком легких, однако подтип – аденокарцинома или плоскоклеточный рак – в исследованиях не указывается, при этом данная информация имеет важнейшее значение для интерпретации результатов исследований. В 1989 г. опухоль была охарактеризована как недифференцированная карцинома, ультраструктурное исследование опухолевых клеток при помощи электронной микроскопии позволило выявить в клетках осмиофильные тельца, схожие с теми, которые характерны для альвеолоцитов II типа, что позволило авторам отнести опухоль к альвеолярной карциноме, то есть, аденокарциноме (Garcia-Sanz et al., 1989). Эти данные подтверждаются последними исследованиями с использованием полноэкзомного секвенирования. Таким образом, в настоящее время показано, что опухоль представляет собой *Kras/Nras*-мутантный рак и относится к аденокарциноме легких (He et al., 2024).

Рис. 3.7.21. Суммарные результаты исследования морфологических и молекулярно-биологических особенностей прогрессии карциномы легких у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6. Стрелки – изменения по сравнению с контрольной группой, < и > – различия между ВУ и НУ

Метастазирование – распространение опухолевых клеток из первичного очага и пролиферация в отдаленных органах – сложный многоэтапный процесс (Tomasin et al., 2019). Показано, что LLC метастазирует преимущественно гематогенно (Weiss и Ward, 1987). Метастазирование является непосредственной причиной более 90% всех неблагоприятных исходов, связанных с развитием злокачественных опухолей, и его механизмы на клеточном и молекулярном уровнях остаются недостаточно изученными (Lambert et al., 2017; Deyell et al., 2021; Wang et al., 2024б). Тем не менее, существующие данные свидетельствуют о том, что эффективность метастазирования зависит не только от свойств опухолевых клеток, но и от взаимодействия со стромальными клетками и компонентами ВКМ, а также от системных изменений метаболизма и функционирования иммунной системы (Payen et al., 2016; Doglioni et al., 2019; Cucanic et al., 2022; Wang et al., 2024б). Воспаление, вызванное опухолью, является одним из ключевых факторов быстрой прогрессии при большинстве злокачественных опухолей (Grivennikov et al., 2010; de Visser и Joyce, 2023). Поскольку мы выявили СВО в ответ на трансплантацию глиобластомы 101.8 только у НУ крыс, можно предположить, что метастазирование и выраженность СВО также различаются у животных с разной устойчивостью к гипоксии.

Несмотря на то, что после подкожного введения клеток карциномы Льюис у экспериментальных животных метастазы в легких обнаружены, тем не менее, различий в частоте их развития и площади между ВУ и НУ мышами не выявлено, что может быть связано с тем, что использована перевиваемая модель опухоли, а не индуцируемая, на которой можно проследить стадию инициации опухолевого процесса.

По нашим данным на 28-е сут после подкожного введения клеток карциномы легких Льюис опухоли сформировались у 84,6 % (22 животных из 26) ВУ животных и 91,7% (22 из 24) НУ мышей. Несмотря на широкое использование перевиваемых моделей опухолей, они обладают рядом недостатков. Перевиваемая карцинома легких Льюис является распространенной моделью метастазирования, обладающей при подкожном введении высоким метастатическим потенциалом (Skurikhin et al., 2024). Тем не менее, при введении опухолевых клеток в ткани может возникнуть реакция отторжения. При рассмотрении особенностей опухолевой прогрессии и реакций организма на опухоль необходимо учитывать историю ее формирования. Трансформированные клетки претерпевают ряд изменений, накапливают мутации и формируют непосредственно опухоль, имеющую определенную внутреннюю архитектуру и иерархию клеток, собственную строму. Опухолевые клетки воспринимаются организмом как чужеродный агент ввиду того, что являются носителями различных соматических мутаций и характеризуются наличием неоантигенов – антигенов, характерных только для опухолевых клеток (Jiang et al., 2019). При этом мутантные клетки распознаются иммунной системой и элиминируются

защитными механизмами организма. Эта идея впервые была предложена Паулем Эрлихом в 1909 г. (Ehrlich, 1909), и в итоге развилась в концепцию иммунологического надзора. Постепенное развитие опухоли способствует, с одной стороны, сначала накоплению клетками мутаций и попытками организма элиминировать клетки с нетипичными антигенами, с другой, по мере прогрессии опухоли – формированию иммунологической толерантности организма к опухолевым неоантигенам.

Взаимоотношения между опухолью и организмом в настоящее время предполагают трехстадийное взаимодействие и могут быть охарактеризованы как «концепция трех Е» (Логинова и соавт., 2022; Swann и Smyth, 2007; McCoach и Bivona, 2018). На первом этапе элиминации (Elimination) иммунная система организма уничтожает опухолевые клетки, имеющие измененный антигенный состав. Успешная элиминация трансформированных клеток предотвращает развитие опухоли (Swann и Smyth, 2007). Ключевую роль в распознавании и уничтожении опухолевых клеток играют NK клетки и цитотоксические Т-лимфоциты, а также макрофаги, которые на данном этапе способны представлять опухолевые антигены и, как правило, на ранних стадиях развития опухоли их основными функциями являются стимуляция воспаления, фагоцитоз и противоопухолевая активность (Кадагидзе и Черткова, 2016; Chanmee et al., 2014). На этапе равновесия (Equilibrium) опухолевые клетки избегают гибели, в результате чего формируется баланс между пролиферацией опухолевых клеток и их элиминацией со стороны организма. На этапе «ускользания» (Escape) опухоли удается уйти из-под иммунного надзора со стороны организма за счет индуцированной иммуносупрессии (Ribatti, 2017). Это обусловлено существованием многочисленных негативных клеточных и молекулярных механизмов, которые препятствуют развитию эффективного противоопухолевого иммунного ответа и обеспечивают «ускользание» опухоли от иммунологического надзора (Dutta et al., 2023; Roerden и Spranger, 2025).

Таким образом, несмотря на то, что перевиваемая опухоль, в частности LLC, является сингенной, возникшей у животного той же линии, при трансплантации она может отторгаться организмом животного, так как несет измененные, нетипичные для организма антигены и развивается в нем не постепенно, а трансплантируется с уже приобретенными злокачественными характеристиками. Не происходит формирования иммунной толерантности, возникающей на этапе «ускользания», при постепенном развитии опухоли (Ugel et al., 2012).

Как уже упоминалось, наиболее активными эффекторными иммунными клетками, реагирующими на опухоль, являются NK клетки, реализующие реакции врожденного иммунитета и цитотоксические Т-лимфоциты, реализующие реакции адаптивного иммунитета (Кадагидзе и Черткова, 2016). Инфильтрация опухоли лимфоцитами свидетельствует о развитии противоопухолевого иммунного ответа. Согласно данным литературы, они представляют собой

преимущественно CD8+ цитотоксические Т-лимфоциты. В нашей работе у 15,4% ВУ (4 из 26) и у 8,3% НУ (2 из 24) мышей опухоли не сформировались, что, предположительно, может быть связано с высоким уровнем собственного противоопухолевого иммунитета (Urban et al., 1982; Munhoz и Postow, 2016). Даже в случае соответствия по главному комплексу гистосовместимости реакция отторжения может быть вызвана несоответствием по минорным Н-антигенам гистосовместимости между линией опухолевых клеток и животными. Это явление объясняется генетическим дрейфом и закреплением мутаций в одной и той же линии животных из разных питомников. Кроме того, используемые в настоящее время линии опухолевых клеток были получены много лет назад и также могли накопить ряд мутаций (Fanning et al., 2009).

Митотический индекс клеток подкожного опухолевого узла был выше у ВУ мышей по сравнению с НУ в оба срока эксперимента. Аналогичные данные были получены нами при трансплантации глиобластомы 101.8 ВУ и НУ крысам Вистар. Учитывая отсутствие различий в показателе массы и объема опухолей между ВУ и НУ животными, можно предположить, что более высокая пролиферативная активность в опухолях ВУ мышей сочетается с более активной гибелью опухолевых клеток – возникает баланс апоптоза и пролиферации, встречающийся в опухолях и отражающий компенсаторную реакцию на гибель клеток (Moreno-Celis et al., 2022). В нашем исследовании животным трансплантировали клетки одной и той же стандартной опухоли – карциномы легких Льюис, тогда как ее митотический индекс у животных с разной устойчивостью к гипоксии различался. Вероятно, это во многом обусловлено реакциями микроокружения и иммунной системы – у ВУ животных опухолевые клетки попадают в более благоприятные условия, которые способствуют быстрому делению клеток. Например, это может быть обусловлено особенностями строения и функционирования митохондрий, большей интенсивностью окислительного фосфорилирования у ВУ животных (Pavlik et al., 2018). Тем не менее, несмотря на высокую митотическую активность, различий в объемах опухолей и площади метастазов у ВУ и НУ мышей выявлено не было.

Реакция тимуса на опухолевую прогрессию у животных с разной устойчивостью к гипоксии была схожей и выражалась в акцидентальной инволюции. Более активная реакция эпителиальных клеток мозгового вещества наблюдалась у НУ мышей, у которых выявлено увеличение количества тимических телец с кератогиалином по сравнению с контрольной группой, и статистически значимо большее количество тимических телец в виде кистоподобных полостей по сравнению с ВУ мышами. Тимические тельца – структуры, образованные эпителиальными клетками, их количество и размеры являются показателем секреторной и функциональной активности тимуса, так как они являются источником ряда цитокинов и хемокинов, например, цитокина TSLP (тимический стромальный лимфопоэтин, Thymic Stromal Lymphopoietin), влияющего на созревание Т-регуляторных клеток (Watanabe et

al., 2005). Увеличение размеров и количества тимических телец, появление телец с кератогиалином и в виде кистоподобных полостей свидетельствуют о нарушениях процессов пролиферации, дифференцировки, миграции и гибели Т-лимфоцитов и эпителиальных клеток мозгового вещества тимуса (Postovalova et al., 2019). Т-лимфоциты, в частности, цитотоксические Т-лимфоциты, наряду с NK клетками играют ключевую роль в гибели опухолевых клеток (Wang et al., 2020б). При развитии опухоли повышенный апоптоз эпителиальных клеток нарушает созревание тимоцитов, что приводит к инволюции тимуса. В результате инволюции тимуса и ослабления пролиферации и дифференцировки Т-лимфоцитов противоопухолевый иммунитет снижается, что приводит к прогрессии опухоли (Song et al. 2014; Wang et al., 2020б).

Как у ВУ, так и у НУ мышей при прогрессии карциномы легких наблюдалась редукция белой пульпы селезенки в сочетании с увеличением количества мегакариоцитов. Это свидетельствует о включении селезенки в формирование иммунного ответа на привитую опухоль, и реакции гемопоэза, которые характерны для данного органа у мышей как в норме, так и на фоне опухолевого роста (Bronte и Pittet, 2013). Селезенка играет ключевую роль в иммунных реакциях, включая реакции на опухолевую прогрессию. На перевиваемых опухолевых штаммах у мышей показана реакция селезенки на опухоль, проявляющаяся в спленомегалии, и, по данным ряда исследований, в увеличении в селезенке количества клеток моноцитарного ряда, которые могут способствовать формированию толерантности к опухолевым антигенам (Ugel et al., 2012; Beheshti et al., 2015).

По данным клинического анализа крови на 28-е сут эксперимента как у ВУ, так и у НУ мышей после введения клеток карциномы легких Льюис по сравнению с контрольными группами наблюдалось повышение абсолютного числа лейкоцитов, моноцитов и гранулоцитов, относительного числа гранулоцитов, снижение относительного числа лимфоцитов. 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. Только у НУ животных повышался индекс системного воспалительного ответа SIRI. Снижение LMR, а также повышение NLR и SIRI свидетельствуют о более выраженных системных проявлениях воспаления и являются факторами неблагоприятного прогноза у пациентов со злокачественными опухолями (Pacheco-Barcia et al., 2020; Nøst et al., 2021; Kim et al., 2022). Повышенный SIRI является независимым прогностическим фактором для пациентов с метастатическим раком поджелудочной железы (Pacheco-Barcia et al., 2020). Кроме того, SIRI может служить маркером для определения эффективности лечения и прогноза рака молочной железы и других злокачественных опухолей (Zhu et al., 2022; Yang et al., 2025).

При прогрессии карциномы легких повышение абсолютного и относительного числа CD11b+ моноцитов в периферической крови обнаружено только у НУ животных. Активация

CD11b способствует провоспалительной поляризации макрофагов. Предложены подходы к терапии рака легких на основе индуцированного повышения синтеза CD11b+, что было показано на модели LLC (Geraghty et al., 2020). Повышение активности CD11b+ в макрофагах усиливает адаптивный иммунный ответ, инфильтрацию цитотоксическими Т-лимфоцитами и является мишенью для разработки новых подходов к лечению рака легких (Geraghty et al., 2020). Интегрин CD11b способствует хемотаксису, фагоцитозу, повышению цитотоксичности и индукции толерантности (Ehirchiou et al., 2024).

В печени у НУ животных на 28-е сут после подкожного введения клеток карциномы легких был выше уровень экспрессии Hif1a по сравнению с ВУ. НУ животные по сравнению с ВУ характеризовались более выраженным воспалительным ответом, сопровождающимся повышением экспрессии Nfkb и Tnfa в печени на 28-е сут эксперимента. Повышенная экспрессия гена *Hif1a* у НУ животных на 28-е сут эксперимента может быть следствием выраженного воспаления, либо ответом на гипоксическое состояние, и является неблагоприятным прогностическим фактором (Shimoda и Semenza, 2011). Транскрипционный фактор *Nfkb* контролирует развитие воспалительных реакций через стимуляцию экспрессии как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов (Liu et al., 2017). Продуцируемые цитокины и другие факторы, в свою очередь, также способны стимулировать или подавлять *Nfkb* по принципу положительной или отрицательной обратной связи (Prescott et al., 2021). Печень является одним из главных регуляторов сигналов воспаления в организме, и в условиях опухолевого роста она подвергается воздействию различных факторов, продуцируемых клетками опухоли. Показано, что повышение маркеров воспаления в печени у пациентов является признаком неблагоприятного прогноза злокачественных опухолей (Stone et al., 2024). С одной стороны, воспаление и транскрипционный фактор NF-κB являются одним из механизмов противоопухолевой защиты организма, особенно в ходе острых воспалительных процессов, возникающих при злокачественных новообразованиях. С другой стороны, при развитии многих опухолей индуцируется конститутивная активация NF-κB с продукцией провоспалительных цитокинов, что оказывает проопухолевое действие (Hoesel и Schmid, 2013; Lan et al., 2021). Течение многих видов злокачественных новообразований сопряжено с развитием СВО как одного из проявлений неспецифического паранеопластического синдрома (Roxburgh и McMillan, 2014). Выявленное снижение экспрессии *Tgfb* в сочетании с повышением экспрессии *Tnfa* у НУ животных может быть связано с антагонистическим взаимодействием цитокинов TNF-α и TGF-β (Verrecchia et al., 2000). Известно о двойственном влиянии TGF-β на опухолевую прогрессию. На ранних этапах развития опухоли этот цитокин оказывает на опухолевые клетки супрессивное действие, снижая их способность к пролиферации и способствуя апоптозу. В ходе дальнейших этапов развития опухоли TGF-β начинает оказывать противоположное действие, способствуя

ЭМП, увеличивая активность и способность опухолевых клеток к метастазированию (Liu et al., 2021в; Shi et al., 2022).

Таким образом, прогрессия карциномы легких Льюис у животных с разной устойчивостью к гипоксии сопровождается рядом схожих для двух групп изменений (Dzhalilova et al., 2024г). Гибель животных, частота развития, масса и объем подкожных опухолей, а также площадь метастазов в легких не различаются у ВУ и НУ мышей. Наблюдаются изменения показателей клинического анализа крови, свидетельствующие о развитии воспаления и анемии. У животных обеих групп развивается СВО со снижением лимфоцитарно-моноцитарного индекса LMR и повышением нейтрофильно-лимфоцитарного индекса NLR.

При этом прогрессия карциномы легких Льюис у ВУ и НУ мышей характеризуется рядом различий. У ВУ мышей обнаружен более высокий митотический индекс опухолевых клеток в первичных узлах. Повышение количества CD11b+ моноцитов в периферической крови обнаружено только у НУ животных. СВО более выражен у НУ мышей – у них повышается индекс системного воспалительного ответа SIRI, а в печени выше уровни экспрессии генов, регулирующих воспалительные реакции – *Nfkb, Tnfa, Tgfb*, и ответ на гипоксию – *Hif1a*.

Раздел 3. Молекулярно-биологические особенности макрофагов, уровень продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в зависимости от устойчивости к гипоксии и определение лабораторных способов оценки устойчивости к недостатку кислорода

Согласно полученным нами данным у ВУ и НУ животных, очевидно, существуют различия выраженности СВО и реакций иммунной системы на прогрессию опухолей различных типов, что во многом определяет ее темпы. Одну из ключевых ролей как при воспалительных, так и при опухолевых процессах играют клетки врожденного иммунитета – макрофаги, которые выполняют иммунорегуляторную и фагоцитарную функции (Ельчанинов и Фатхудинов, 2023). Поэтому задачами следующей части работы было охарактеризовать молекулярно-биологические и функциональные свойства макрофагов и уровень продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов у ВУ и НУ животных, и на их основе определить лабораторные способы оценки устойчивости к гипоксии без сублетального воздействия на организм в барокамере. Поскольку ключевую роль в СВО играет ЛПС, концентрация которого увеличивается за счет повышения проницаемости эпителиального барьера кишки (Trivedi и Jena, 2012), в качестве индуктора для активации макрофагов и стимуляции продукции цитокинов нами был использован ЛПС.

3.8. Молекулярно-биологические особенности макрофагов и уровень продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов у ВУ и НУ самцов крыс Вистар[8]

По результатам определения устойчивости к гипоксии в барокамере по «времени жизни» на «высоте» 11 500 м среди половозрелых самцов крыс Вистар 20% оказались ВУ со «временем жизни» более 240 с, 26,5% – НУ со «временем жизни» менее 80 с (рис. 3.8.1).

Рис. 3.8.1. Результаты разделения половозрелых крыс Вистар в барокамере на критической «высоте» 11 500 м на ВУ, СУ и НУ

---

[8]При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении научных степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования (в скобках приведен импакт-фактор журнала, объем публикации в условных печатных листах/вклад автора в условных печатных листах):

1. **Dzhalilova D.Sh.**, Kosyreva A.M., 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. C. e16052. DOI: 10.7717/peerj.16052. IF 2,4 WoS (JIF), Q2 (1,90/1,50)
2. **Dzhalilova D.Sh.**, Kosyreva A.M., 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, Scopus (SJR), Q4 (0,40/0,25)
3. Косырева А.М., **Джалилова Д.Ш.**, Цветков И.С., Макарова М.А., Макарова О.В. *Ex vivo* продукция ИЛ-1β 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 РИНЦ 0,988, RSCI (0,50/0,25) [Kosyreva A.M., **Dzhalilova D.Sh.**, Tsvetkov I.S., Makarova M.A., Makarova O.V. *Ex vivo* production of IL-1β 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 WoS (JIF), Q4 (0,50/0,25)]
4. **Джалилова Д.Ш.**, Косырева А.М., Силина М.В., Маяк М.А., Цветков И.С., Макарова О.В. Продукция IL-1β и IL-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 РИНЦ 0,880, RSCI (0,35/0,20) [**Dzhalilova D.Sh.**, Kosyreva A.M., Silina M.V., Mayak M.A., Tsvetkov I.S., Makarova O.V. Production of IL-1β 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 WoS (JIF), Q4 (0,35/0,20)]

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

Макрофаги играют ключевую роль как в воспалительных, так и в опухолевых процессах. Для оценки функционального статуса макрофагов исследуют профиль экспрессии генов и содержания провоспалительных (IL-1β, TNF-α, IL-6 и др.) и противовоспалительных (IL-4, IL-10, TGF-β и др.) цитокинов, а также факторов транскрипции, которые регулируют их синтез и секрецию (например, HIF-1α). Несмотря на то, что в 2000-х годах была предложена M1/M2-парадигма активации макрофагов, в последние годы она была подвержена значительной критике (Ельчанинов и Фатхудинов, 2023; Murray et al., 2014). По данным протеомного анализа единичных клеток показано сосуществование M1 и M2 макрофагов в одной и той же культуре даже в отсутствие поляризующих стимулов (Specht et al., 2019). Предложено для обозначения фенотипа макрофагов использовать применяемый фактор их активации *in vitro* или маркер, используемый для выявления макрофагов (Murray et al., 2014). Поэтому в нашей работе мы обозначаем активацию макрофагов с помощью фактора, который для этого использовался – ЛПС.

3.8.1.1. Иммунофенотип неактивированных и активированных ЛПС макрофагов у ВУ и НУ самцов крыс Вистар

Интегрин альфа-M CD11b является специфическим маркером для макрофагов – производных моноцитов крови и чаще всего используется в качестве маркера макрофагов костномозгового происхождения (Ikarashi et al., 2013; Nishiyama et al., 2015).

По результатам проточной цитофлуориметрии нами показано, что число CD11b+ неактивированных макрофагов у ВУ крыс было статистически значимо выше по сравнению с НУ животными (табл. 3.8.1 Приложения 8, рис. 3.8.2). При этом различий между ВУ и НУ животными по остальным исследуемым молекулам (общему маркеру макрофагов CD68, а также маркерам функционального состояния макрофагов CD86 и CD163) как в неактивированных, так и в активированных ЛПС макрофагах не выявлено. При активации макрофагов ЛПС только у НУ крыс увеличивалось число CD11b+ клеток, а у ВУ животных снижалось число CD68+ и CD163+ макрофагов по сравнению с неактивированными. Различий по содержанию CD86+ клеток выявлено не было.

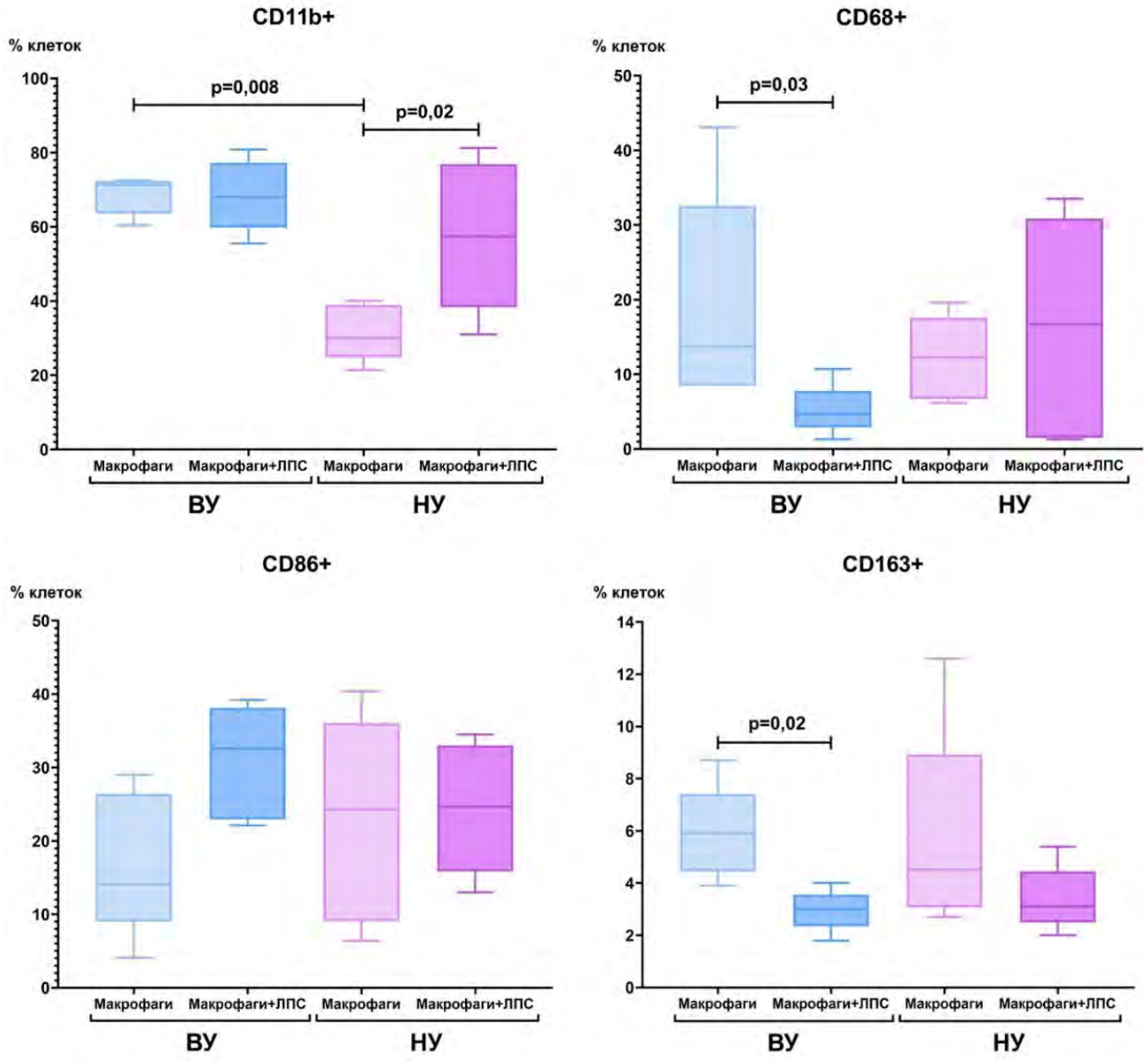


Рис. 3.8.2. Данные проточной цитофлуориметрии по содержанию CD11b+, CD68+, CD86+ и CD163+ неактивированных и активированных ЛПС макрофагов у ВУ и НУ крыс Вистар, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Таким образом, иммунофенотип макрофагов костномозгового происхождения у ВУ и НУ крыс различается. У ВУ животных число CD11b+ неактивированных макрофагов было статистически значимо выше по сравнению с НУ. При активации макрофагов ЛПС только у НУ крыс увеличивалось число CD11b+ клеток, а у ВУ крыс снижалось число CD68+ и CD163+ макрофагов.

3.8.1.2. Баланс провоспалительных и противовоспалительных молекул в неактивированных и активированных ЛПС макрофагах у ВУ и НУ самцов крыс Вистар

Для оценки различий функционального состояния неактивированных и активированных ЛПС макрофагов в зависимости от устойчивости к гипоксии, мы исследовали экспрессию генов и содержание провоспалительных и противовоспалительных молекул.

Экспрессия гена *Tnfa* в неактивированных макрофагах была статистически значимо выше у НУ крыс по сравнению с ВУ. Увеличение экспрессии гена *Tnfa* в активированных ЛПС макрофагах по сравнению с неактивированными макрофагами было выявлено только у ВУ крыс (табл. 3.8.2, рис. 3.8.3). По сравнению с ВУ у НУ животных в неактивированных макрофагах экспрессия *Il1b* была статистически значимо выше. Как у ВУ, так и у НУ крыс по сравнению с неактивированными макрофагами экспрессия *Il1b* увеличивалась в активированных ЛПС макрофагах (табл. 3.8.2, рис. 3.8.3). В неактивированных и активированных ЛПС макрофагах экспрессия провоспалительного цитокина *Il6* статистически значимо не различалась у ВУ и НУ крыс. При воздействии ЛПС его экспрессия увеличивалась по сравнению с неактивированными макрофагами как у ВУ, так и у НУ крыс (табл. 3.8.2, рис. 3.8.3).

Таблица 3.8.2

Уровни экспрессии генов *Tnfa, Il1b* и *Il6* в неактивированных и активированных ЛПС макрофагах у ВУ и НУ крыс Вистар, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Группы наблюдения / **Параметры**	**Неактивированные макрофаги**		**Активированные макрофаги**		**p<0,05**
	ВУ[1] (n=6)	**НУ[2] (n=6)**	**ВУ[3] (n=6)**	**НУ[4] (n=7)**	
Уровень экспрессии гена *Tnfa,* усл. ед.	0,03 (0,027-0,042)	0,07 (0,06-0,098)	0,15 (0,097-0,23)	0,08 (0,05-0,26)	**0,01**[1-2] **0,03**[1-3]
Уровень экспрессии гена *Il1b,* усл. ед.	0,10 (0,09-0,16)	0,30 (0,18-0,64)	2,14 (1,09-3,03)	1,2 (0,6-1,8)	**0,007**[1-2] **0,02**[1-3] **0,009**[2-4]
Уровень экспрессии гена *Il6,* усл. ед.	0,01 (0,006-0,02)	0,01 (0,005-0,06)	0,58 (0,17-1,86)	0,14 (0,04-0,25)	**0,009**[1-3] **0,04**[2-4]

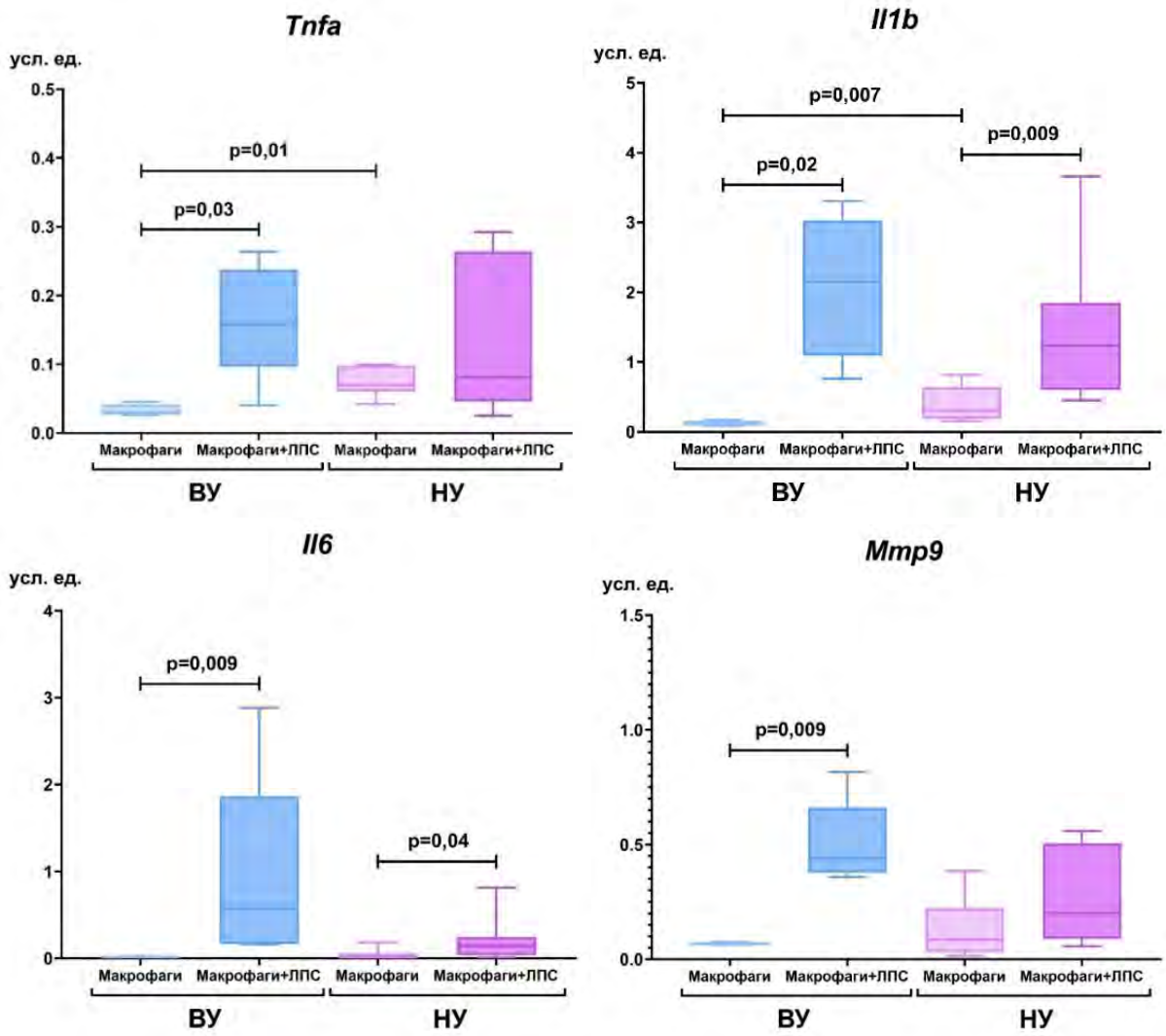


Рис. 3.8.3. Уровни экспрессии генов *Tnfa, Il1b, Il6* и *Mmp9* в неактивированных и активированных ЛПС макрофагах у ВУ и НУ крыс Вистар, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Различий экспрессии матриксной металлопротеиназы *Mmp9* в неактивированных и активированных макрофагах у животных с разной устойчивостью к гипоксии выявлено не было (табл. 3.8.3, рис. 3.8.3). При воздействии ЛПС экспрессия *Mmp9* увеличивалась в макрофагах только у ВУ крыс, а у НУ – не изменялась.

Таблица 3.8.3

Уровень экспрессии *Mmp9* в неактивированных и активированных ЛПС макрофагах у ВУ и НУ крыс Вистар, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Группы наблюдения / **Параметр**	**Неактивированные макрофаги**		**Активированные макрофаги**		**p<0,05**
	ВУ[1] (n=6)	**НУ[2] (n=6)**	**ВУ[3] (n=6)**	**НУ[4] (n=7)**	
Уровень экспрессии гена *Mmp9,* усл. ед.	0,067 (0,064-0,071)	0,09 (0,03-0,22)	0,44 (0,38-0,66)	0,20 (0,09-0,51)	**0,009**[1-3]

Экспрессия *Tgfb* в неактивированных и активированных ЛПС макрофагах статистически значимо не различалась у ВУ и НУ крыс. При воздействии ЛПС его экспрессия увеличивалась по сравнению с неактивированными макрофагами как у ВУ, так и у НУ животных (табл. 3.8.4, рис. 3.8.4). Экспрессия *Il10* в неактивированных и активированных ЛПС макрофагах статистически значимо не различалась у ВУ и НУ крыс. При воздействии ЛПС его экспрессия увеличивалась по сравнению с неактивированными макрофагами как у ВУ, так и у НУ животных (табл. 3.8.4, рис. 3.8.4).

Таблица 3.8.4

Уровни экспрессии генов *Tgfb* и *Il10* в неактивированных и активированных ЛПС макрофагах у ВУ и НУ крыс Вистар, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Группы наблюдения / **Параметры**	**Неактивированные макрофаги**		**Активированные макрофаги**		**p<0,05**
	ВУ[1] (n=6)	**НУ[2] (n=6)**	**ВУ[3] (n=6)**	**НУ[4] (n=7)**	
Уровень экспрессии гена *Tgfb,* усл. ед.	0,60 (0,32-0,75)	0,95 (0,63-1,1)	1,7 (1,2-2,3)	1,4 (1,2-3,9)	**0,009**[1-3] **0,02**[2-4]
Уровень экспрессии гена *Il10,* усл. ед.	0,018 (0,016-0,02)	0,029 (0,011-0,032)	0,15 (0,11-0,64)	0,15 (0,07-0,28)	**0,01**[1-3] **0,003**[2-4]

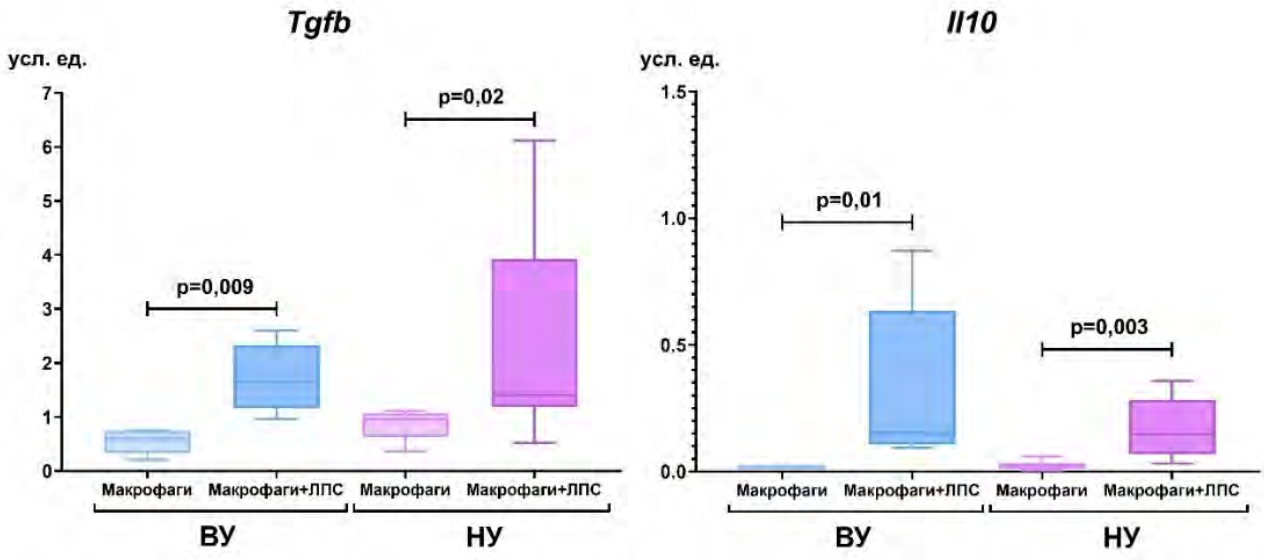


Рис. 3.8.4. Уровни экспрессии генов *Tgfb* и *Il10* в неактивированных и активированных ЛПС макрофагах у ВУ и НУ крыс Вистар, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Экспрессия *Nos2* увеличивалась в активированных ЛПС макрофагах по сравнению с неактивированными как у ВУ, так и у НУ крыс. Однако по результатам Вестерн-блоттинга не выявлено различий содержания белка iNOS в неактивированных и активированных ЛПС макрофагах у животных с разной устойчивостью к гипоксии (табл. 3.8.5 Приложения 8, рис. 3.8.5, рис. 3.8.6, оригинальные мембраны Вестерн-блоттинга в Приложении 8).

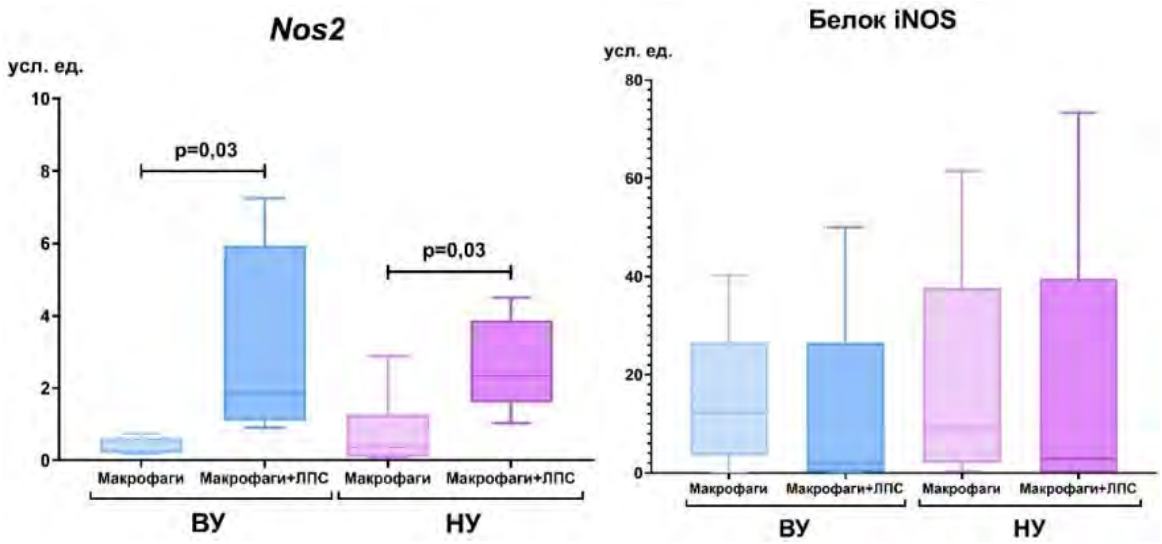


Рис. 3.8.5. Уровень экспрессии *Nos2* и относительное содержание белка iNOS в неактивированных и активированных ЛПС макрофагах у ВУ и НУ крыс Вистар, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

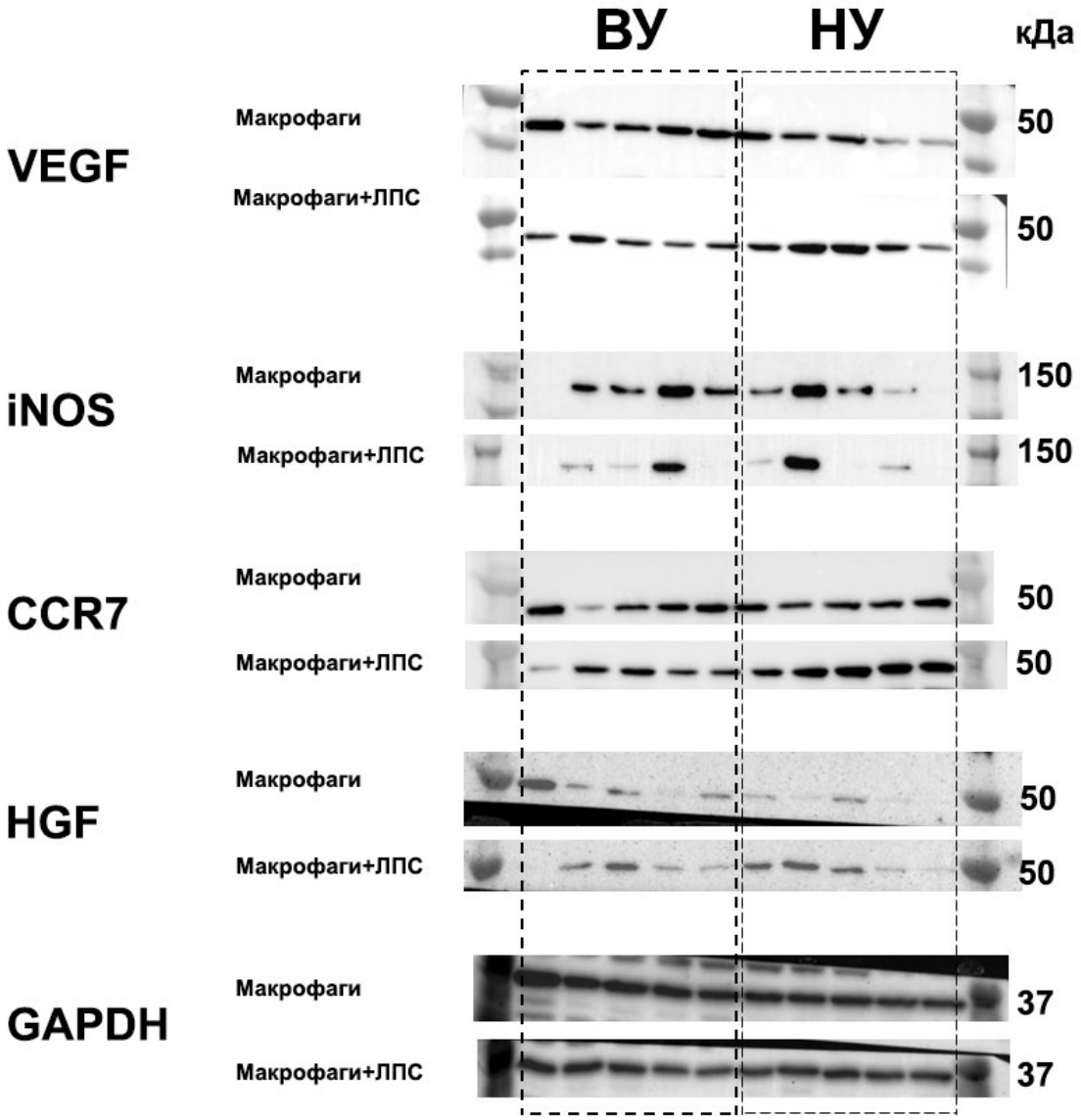


Рис. 3.8.6. Репрезентативные мембраны с антителами к VEGF, iNOS, CCR7, HGF и GAPDH

По результатам Вестерн-блоттинга показано, что содержание рецептора CCR7 не различалось в неактивированных макрофагах у ВУ и НУ крыс. При воздействии ЛПС содержание CCR7 повышалось по сравнению с неактивированными макрофагами только у НУ крыс Вистар и было выше по сравнению с ВУ (табл. 3.8.6 Приложения 8, рис. 3.8.7).

HGF – фактор, индуцирующий направленную миграцию и дифференцировку моноцитов. Содержание рецептора HGF – c-Met в неактивированных макрофагах низкое, и увеличивается после стимуляции ЛПС и IFN-γ (Galimi et al., 2001; Nishikoba et al., 2020). Показано, что содержание белка HGF в активированных ЛПС макрофагах у НУ крыс повышалось по сравнению с неактивированными макрофагами в 8,5 раз, а у ВУ – не изменялось (табл. 3.8.6 Приложения 8, рис. 3.8.7).

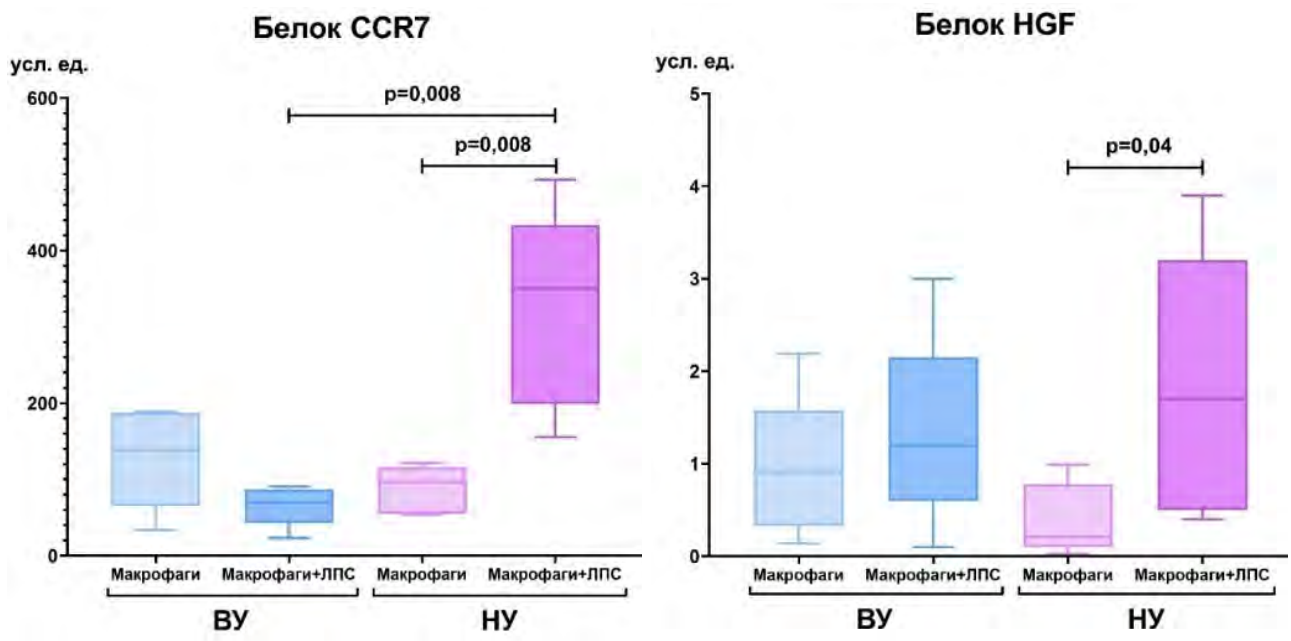


Рис. 3.8.7. Относительное содержание белков CCR7 и HGF в неактивированных и активированных ЛПС макрофагах у ВУ и НУ крыс Вистар, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

3.8.1.3. Уровни экспрессии генов *Hif1a*, *Epas1* и *Vegf*, содержание белков HIF-1α и VEGF в неактивированных и активированных ЛПС макрофагах у ВУ и НУ самцов крыс Вистар

По результатам ПЦР в режиме реального времени показано, что экспрессия гена *Hif1a* в неактивированных макрофагах у ВУ и НУ крыс не различалась. При этом в актированных ЛПС макрофагах экспрессия гена *Hif1a* была статистически значимо выше у НУ крыс по сравнению с ВУ. При воздействии ЛПС происходило увеличение экспрессии гена *Hif1a* как у ВУ, так и у НУ животных (табл. 3.8.7, рис. 3.8.8).

Экспрессия гена *Epas1 (Hif2a)* была в 1,9 раз выше в неактивированных макрофагах НУ крыс по сравнению с ВУ животными, однако в активированных ЛПС макрофагах различий выявлено не было. При воздействии ЛПС уровень экспрессии гена *Epas1* в макрофагах как у ВУ, так и у НУ крыс не изменялся (табл. 3.8.7).

Таблица 3.8.7

Уровни экспрессии генов *Hif1a* и *Epas1 (Hif2a)* в неактивированных и активированных макрофагах у ВУ и НУ крыс Вистар, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Группы наблюдения / Параметры	Неактивированные макрофаги		Активированные макрофаги		p<0,05
	ВУ[1] (n=6)	**НУ[2] (n=6)**	**ВУ[3] (n=6)**	**НУ[4] (n=7)**	
Hif1a, усл. ед.	0,06 (0,01-0,11)	0,09 (0,05-0,14)	0,22 (0,19-0,41)	0,60 (0,46-1,55)	**0,009**[1-3]; **0,009**[2-4] **0,02**[3-4]
Epas1, усл. ед., $\times 10^{-4}$	2,38 (0,52-3,69)	4,45 (3,62-5,49)	3,16 (0,73-2349,0)	75,83 (6,44-1085,0)	**0,04**[1-2]

По результатам ИФА показано, что содержание белка HIF-1α в культуральной жидкости неактивированных и активированных ЛПС макрофагов у ВУ и НУ к гипоксии крыс не различалось, однако оно увеличивалось при стимуляции ЛПС по сравнению с неактивированными макрофагами только у НУ животных (табл. 3.8.8 Приложения 8, рис. 3.8.8).

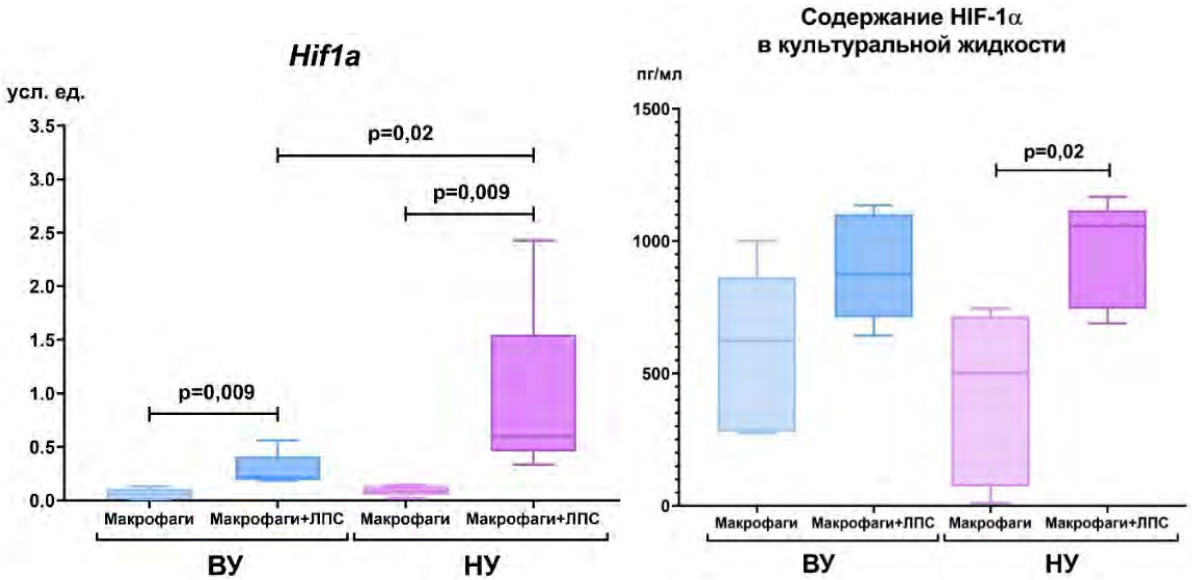


Рис. 3.8.8. Уровень экспрессии *Hif1a* в неактивированных и активированных ЛПС макрофагах и содержание HIF-1α в культуральной жидкости неактивированных и активированных макрофагов у ВУ и НУ крыс Вистар, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Уровень экспрессии гена *Vegf* и содержание белка VEGF в неактивированных макрофагах у ВУ крыс были статистически значимо выше по сравнению с НУ. У НУ крыс экспрессия *Vegf* увеличивалась в активированных ЛПС макрофагах по сравнению с неактивированными, однако содержание белка не изменялось. У ВУ крыс экспрессия гена *Vegf* и содержание белка VEGF не изменялись при воздействии ЛПС (табл. 3.8.9 Приложения 8, рис. 3.8.9).

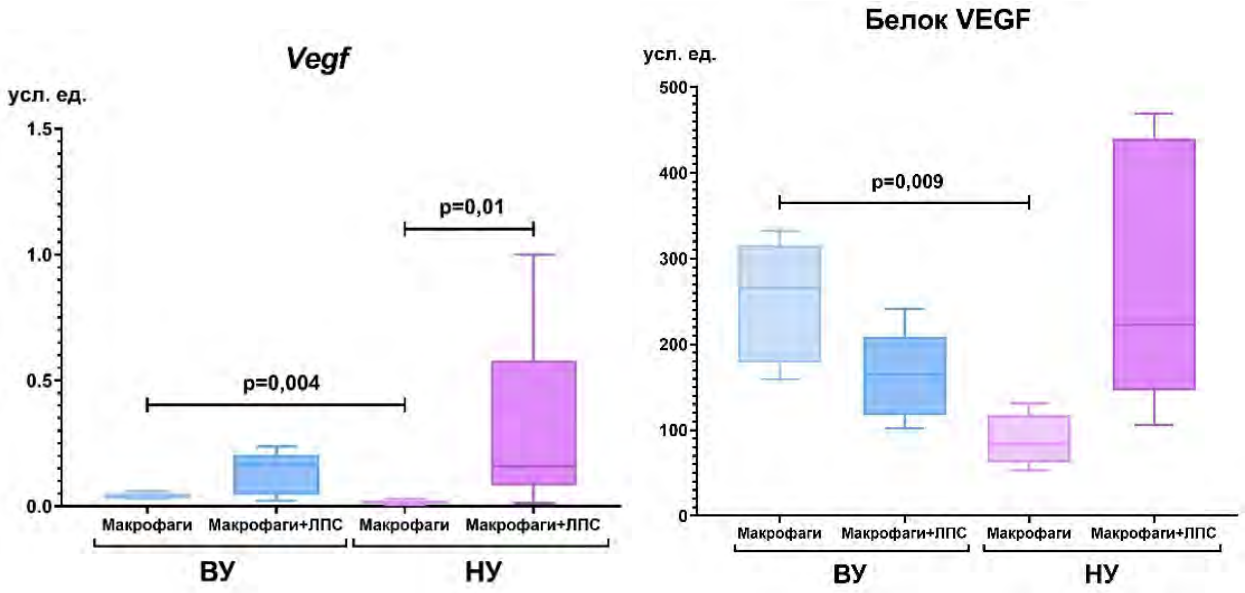


Рис. 3.8.9. Уровень экспрессии *Vegf* и относительное содержание белка VEGF в неактивированных и активированных ЛПС макрофагах ВУ и НУ крыс Вистар, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

3.8.1.4. 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, так как активированные моноциты запускают механизмы каскадных реакций, обеспечивающих развитие воспаления и элиминацию патогенов (Kolenchukova et al., 2020). Ранее нами было показано, что у ВУ и НУ животных различается как ответ на гипоксию, так и фагоцитарная активность клеток крови в ответ на воспалительный стимул – ЛПС (Dzhalilova et al., 2018; Джалилова и соавт., 2019). Поэтому мы провели исследование фагоцитарной активности моноцитов периферической крови после гипоксического воздействия *in vivo* и *ex vivo*. По результатам определения фагоцитарной активности моноцитов периферической крови у ВУ и НУ животных показано, что в условиях нормоксии она не различалась у крыс Вистар с разной устойчивостью к гипоксии (табл. 3.8.10 Приложения 8, рис. 3.8.10). Фагоцитарная активность моноцитов после *in vivo* и *ex vivo* гипоксического воздействия была выше у ВУ животных по сравнению с НУ.

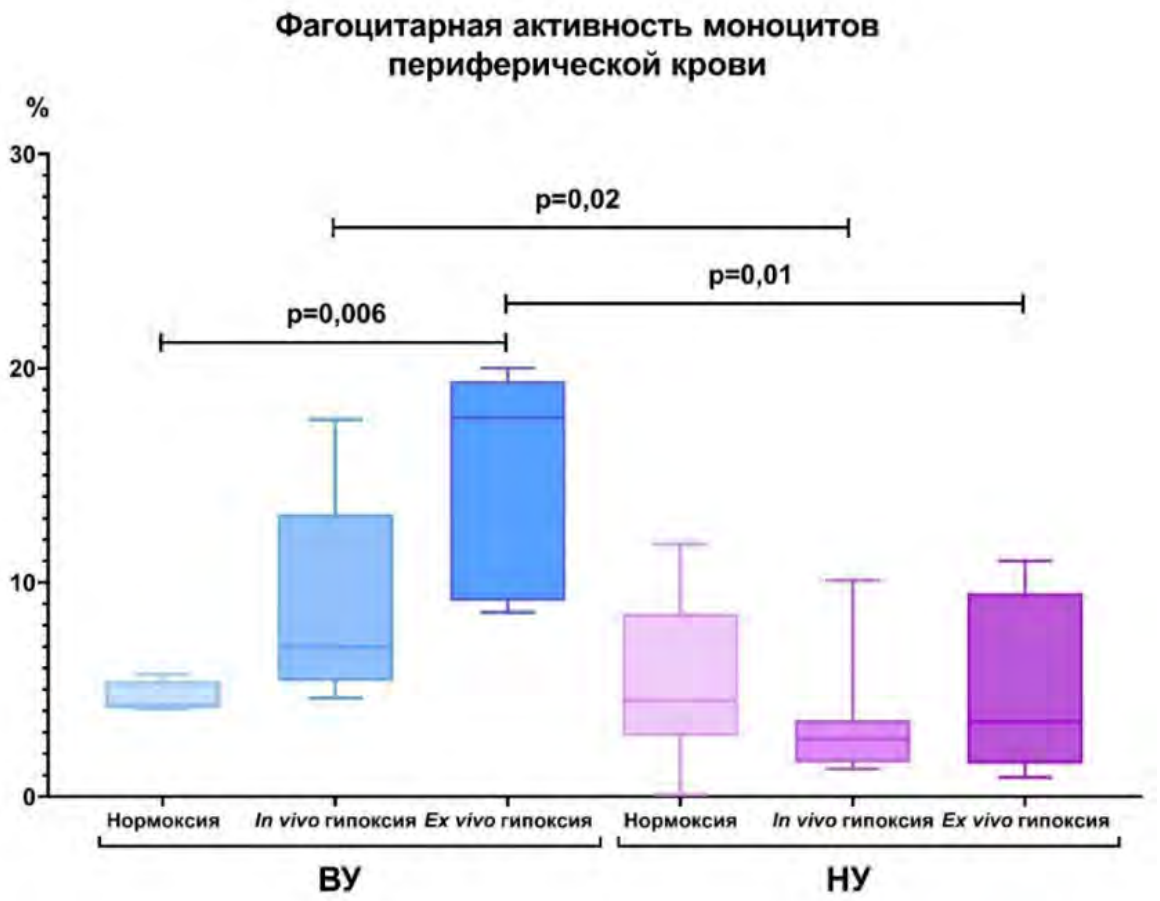


Рис. 3.8.10. Фагоцитарная активность моноцитов в условиях нормоксии, после *in vivo* и *ex vivo* гипоксического воздействия у ВУ (n=12) и НУ (n=20) крыс Вистар, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

Следует отметить, что статистически значимое увеличение фагоцитарной активности моноцитов по сравнению с условиями нормоксии наблюдалось только у ВУ крыс в условиях *ex vivo* гипоксического воздействия (табл. 3.8.10 Приложения 8, рис. 3.8.10). Таким образом, гипоксическое воздействие *ex vivo*, при котором, в отличие от *in vivo*, использованы более низкие концентрации O_2 (1%), оказывает более выраженный эффект на клетки крови по сравнению с гипоксической нагрузкой *in vivo* (5000 м или около 11% O_2) и позволяет избежать острого гипоксического воздействия на организм.

3.8.2. Спонтанная и стимулированная продукция цитокинов клетками крови у ВУ и НУ самцов крыс Вистар

Поскольку установлены различия в провоспалительных реакциях у ВУ и НУ животных, было проведено исследование спонтанной и стимулированной комплексным митогеном (ЛПС, ФГА и КонА) продукции цитокинов клетками крови *ex vivo* через один месяц после определения устойчивости крыс Вистар к гипоксии в барокамере. Комплекс активаторов является митогеном, стимулирующим продукцию цитокинов всеми лейкоцитами крови (Дружинина и соавт., 2009; Kosyreva et al., 2023). Как уже упоминалось, активация клеток крови *ex vivo* является

перспективным подходом для исследования иммунных реакций и воспроизводит условия, наиболее близкие к условиям *in vivo* (Chick et al., 2024; Müller et al., 2024).

Показано, что только у НУ крыс при стимуляции комплексным митогеном *ex vivo* повышалось содержание IL-1β в культуральной жидкости клеток крови, а продукция IL-10 увеличивалась как у ВУ, так и у НУ крыс. При этом отношение IL-1β/IL-10 без стимуляции было выше у НУ крыс, а при стимуляции только у них – снижалось, в то время как у ВУ – не изменялось (табл. 3.8.11, рис. 3.8.11).

Таблица 3.8.11

Нестимулированная (НСТ) и стимулированная (СТ) комплексным митогеном (ЛПС, ФГА и КонА) в течение 24 ч *ex vivo* продукция провоспалительного цитокина IL-1β и противовоспалительного цитокина IL-10 клетками периферической крови, а также их отношение у ВУ и НУ крыс Вистар через один месяц после определения устойчивости к гипоксии в барокамере, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Группы наблюдения / **Параметры**	**ВУ (n=6)**		**НУ (n=10)**		**p**
	НСТ[1]	**СТ[2]**	**НСТ[3]**	**СТ[4]**	
IL-1β, пг/мл	5,2 (3,7-31,4)	40,7 (30,4-42,5)	10,8 (5,6-19,5)	35,9 (33,9-41,5)	0,07[1-2]; **0,002**[3-4] 0,52[1-3]; 0,65[2-4]
IL-10, пг/мл	16,0 (9,8-24,7)	89,5 (64,5-95,5)	9,3 (6,7-24,0)	74,4 (71,1-78,9)	**0,03**[1-2]; **0,002**[3-4] 0,48[1-3]; 0,33[2-4]
IL-1β/IL-10, усл. ед.	0,20 (0,14-0,53)	0,45 (0,36-0,61)	1,03 (0,56-1,88)	0,49 (0,46-0,51)	0,29[1-2]; **0,04**[3-4] **0,04**[1-3]; 0,52[2-4]

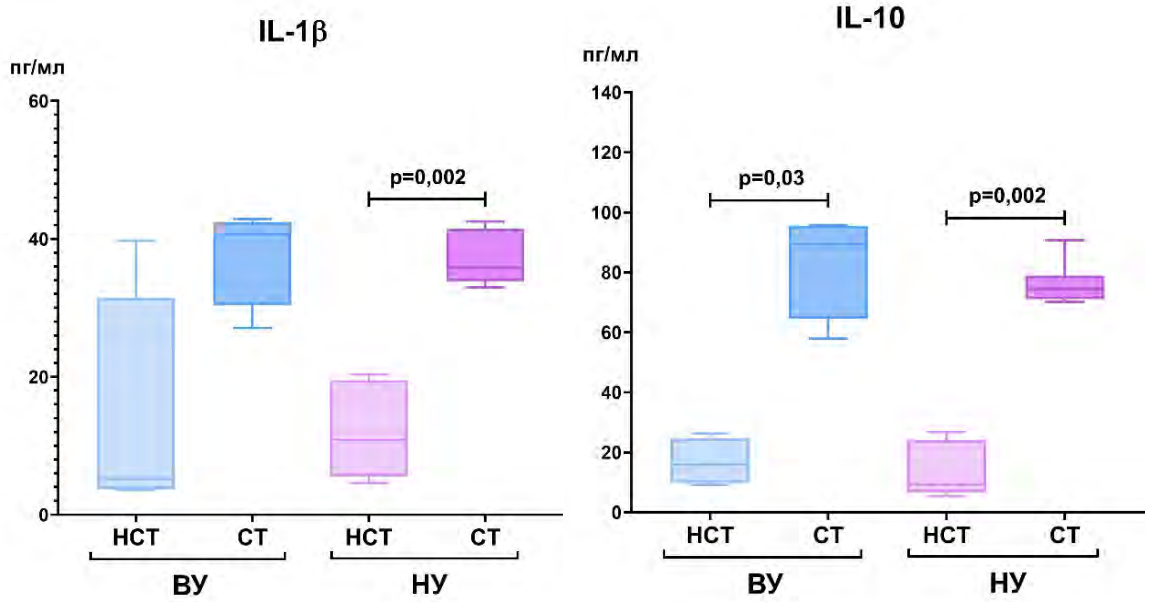


Рис. 3.8.11. Нестимулированная (НСТ) и стимулированная (СТ) комплексным митогеном (ЛПС, ФГА и КонА) в течение 24 ч *ex vivo* продукция провоспалительного цитокина IL-1β и противовоспалительного цитокина IL-10 клетками периферической крови у ВУ и НУ крыс Вистар через один месяц после определения устойчивости к гипоксии в барокамере, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

3.8.3. Продукция цитокинов, стимулированная гипоксией и воспалением, у самцов крыс Вистар до и после сублетальной гипоксической нагрузки в барокамере

Так как мы выявили провоспалительный фенотип макрофагов и повышенную продукцию IL-1β в ответ на стимуляцию комплексным митогеном у НУ животных, задачей следующих экспериментов было определить, является ли эта особенность предсуществующей или является следствием гипоксического воздействия в барокамере на критической «высоте». Вероятно, определение устойчивости к гипоксии в барокамере на критической «высоте» может оказывать эффект на организм, и, в частности, клетки крови, который сохраняется длительное время. При этом по данным Л.Д. Лукьяновой и соавт. (2009), Л.Д. Лукьяновой и Ю.И. Кировой (2011), Н.Н. Каркищенко (2017) рекомендуется включать животных в эксперименты через один месяц после определения устойчивости к гипоксии в барокамере для нивелирования возможного отрицательного эффекта на организм острого гипоксического воздействия, однако такой срок никак не обосновывается авторами. Поэтому мы исследовали продукцию цитокинов за две недели до и через один месяц после сублетальной гипоксической нагрузки в барокамере у одних и тех же крыс. Клетки крови инкубировали *ex vivo* в условиях 1% O_2 в течение 1 ч и с добавлением ЛПС, ФГА и КонА в течение 24 ч в CO_2-инкубаторе.

Спонтанная продукция как IL-1β, так и IL-10 после инкубации в условиях нормоксии в течение 1 ч была выше через один месяц после сублетального гипоксического воздействия в барокамере как у ВУ, так и у НУ животных по сравнению со значениями до него. В условиях воздействия гипоксии (1% O_2) продукция клетками крови провоспалительного цитокина IL-1β увеличивалась у ВУ и НУ крыс по сравнению с нормоксией как до определения устойчивости в барокамере, так и после, однако через один месяц после сублетальной гипоксической нагрузки значения показателей были выше (табл. 3.8.12 Приложения 8, рис. 3.8.12).

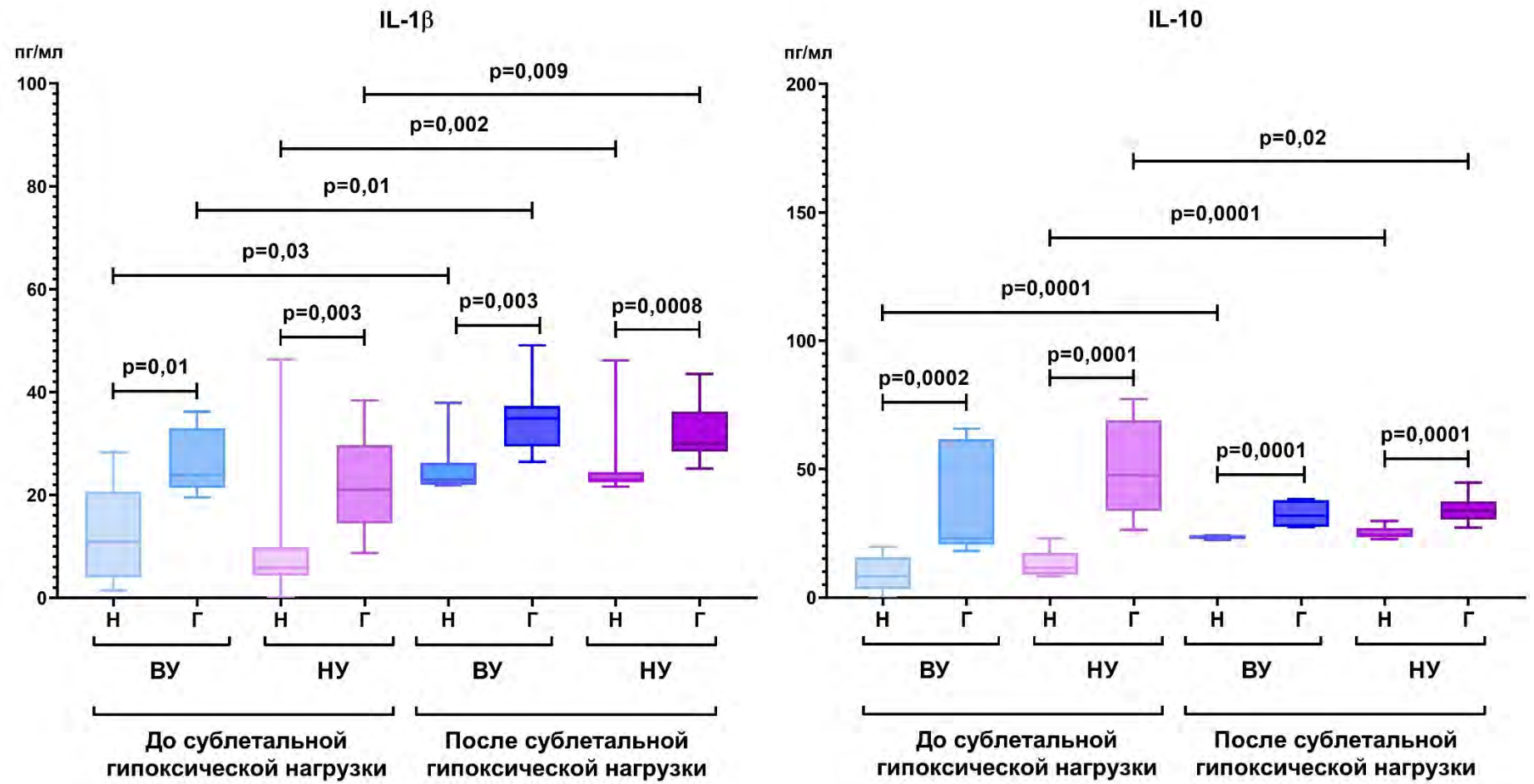


Рис. 3.8.12. Продукция IL-1β и IL-10 клетками периферической крови в условиях нормоксии (Н) и гипоксии (Г) в течение 1 ч *ex vivo* у ВУ и НУ крыс Вистар за две недели до и через один месяц после определения устойчивости к гипоксии в барокамере, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

Продукция клетками крови противовоспалительного цитокина IL-10 также увеличивалась как у ВУ, так и у НУ крыс в условиях гипоксии по сравнению с нормоксией как до определения устойчивости 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 продукция IL-10 не увеличивалась, как IL-1β, а, напротив, снижалась, а у ВУ – не изменялась (табл. 3.8.12 Приложения 8, рис. 3.8.12).

Спонтанная продукция IL-1β при инкубации в течение 24 ч не различалась между ВУ и НУ животными и была выше через один месяц после сублетального гипоксического воздействия в барокамере по сравнению с показателями до него (табл. 3.8.13 Приложения 8, рис. 3.8.13). После стимуляции клеток крови ЛПС, ФГА и КонА продукция IL-1β увеличивалась по сравнению со спонтанной продукцией только у НУ крыс как до воздействия в барокамере, так и после. После сублетального гипоксического воздействия в барокамере показатели стимулированной продукции IL-1β увеличивались как у ВУ, так и у НУ животных по сравнению с исходными значениями.

Спонтанная продукция IL-10 при инкубации в течение 24 ч была выше у НУ животных по сравнению с ВУ до определения устойчивости к гипоксии в барокамере. При этом спонтанная продукция IL-10 при инкубации в течение 24 ч через один месяц после сублетальной гипоксической нагрузки повышалась только у ВУ крыс по сравнению с исходными значениями (табл. 3.8.13 Приложения 8, рис. 3.8.13). Стимулированная ЛПС, ФГА и КонА продукция IL-10 клетками крови снижалась через один месяц после сублетальной гипоксической нагрузки только у НУ животных.

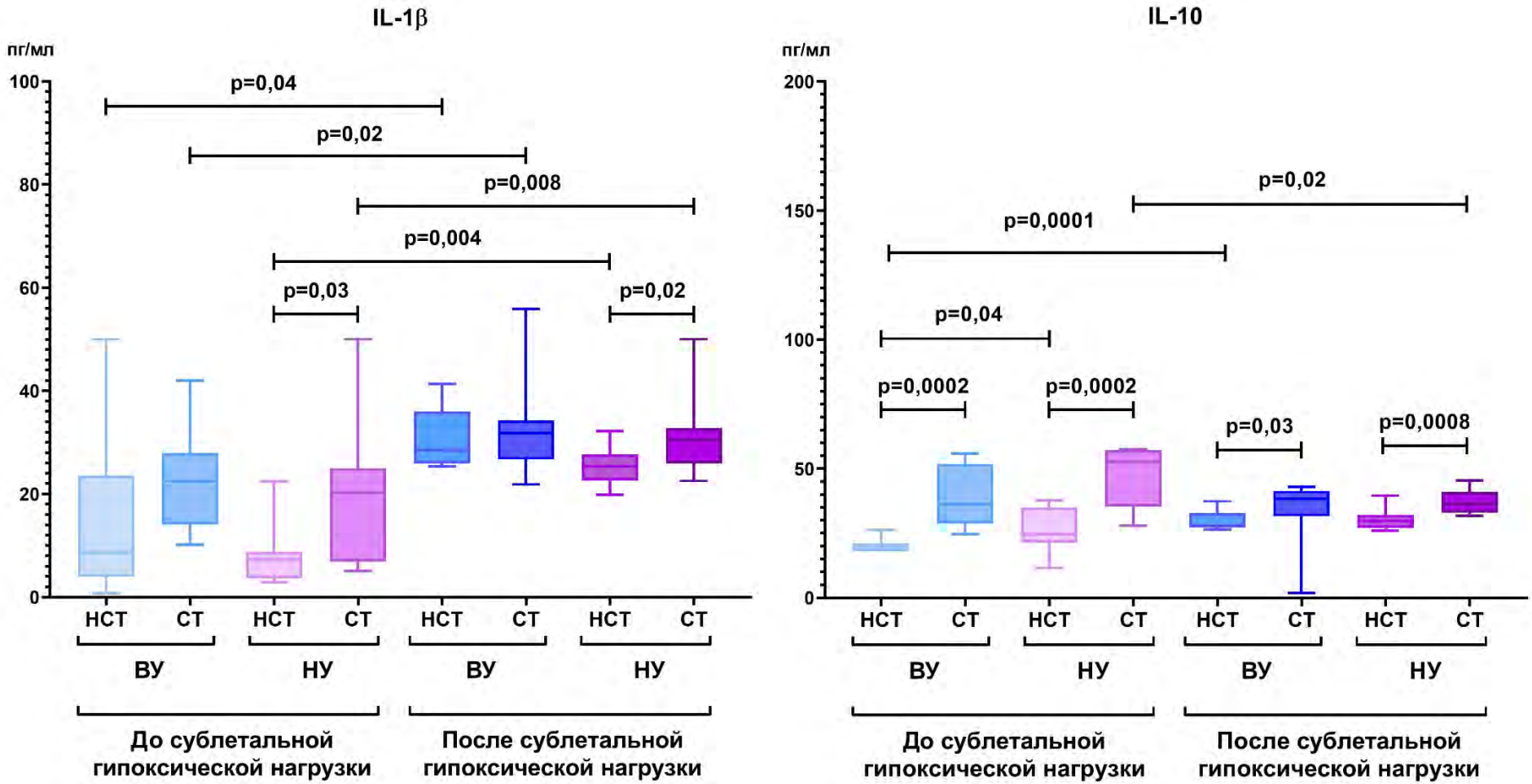


Рис. 3.8.13. Нестимулированная (НСТ) и стимулированная (СТ) комплексным митогеном (ЛПС, ФГА и КонА) в течение 24 ч *ex vivo* продукция IL-1β и IL-10 клетками периферической крови у ВУ и НУ крыс Вистар за две недели до и через один месяц после определения устойчивости к гипоксии в барокамере, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

Таким образом, сублетальная гипоксическая нагрузка, которая используется при определении устойчивости животных к гипоксии в барокамере оказывает модулирующий эффект на иммунные клетки, который сохраняется спустя один месяц после воздействия. При этом у НУ животных клетки приобретают более провоспалительный фенотип за счет снижения продукции IL-10 и повышения продукции IL-1β.

Заключение и обсуждение к 3.8

Таким образом, показано, что иммунофенотипы неактивированных и активированных макрофагов костномозгового происхождения у ВУ и НУ крыс Вистар различаются. У ВУ животных по сравнению с НУ выше число CD11b+ неактивированных макрофагов. По результатам ПЦР в режиме реального времени установлено, что экспрессия генов провоспалительных цитокинов *Tnfa* и *Il1b* в неактивированных макрофагах у НУ крыс была статистически значимо выше по сравнению с ВУ. Кроме того, в неактивированных макрофагах у НУ животных по сравнению с ВУ была статистически значимо выше экспрессия гена *Epas1 (Hif2a)*, а у ВУ – выше как экспрессия гена, так и содержание белка VEGF. В активированных ЛПС макрофагах у НУ крыс по сравнению с ВУ была статистически значимо выше экспрессия гена *Hif1a*. При воздействии ЛПС содержание белка HIF-1α в культуральной жидкости макрофагов статистически значимо увеличивалось по сравнению с неактивированными макрофагами только у НУ животных. В активированных ЛПС макрофагах только у НУ крыс увеличивалось содержание CCR7 и HGF. Суммарные результаты представлены в табл. 3.8.14.

Таблица 3.8.14

Суммарные результаты исследования молекулярно-биологических и функциональных особенностей макрофагов у ВУ и НУ самцов крыс Вистар

Параметры	**ВУ, активированные ЛПС макрофаги по сравнению с неактивированными**	**НУ, активированные ЛПС макрофаги по сравнению с неактивированными**	**Различия между макрофагами ВУ и НУ крыс**
Иммунофенотип			
CD11b+	Не различались	Не различались	Ниже у НУ в неактивированных макрофагах
CD68+	↓	Не различались	Не различались
CD86+	Не различались	Не различались	Не различались
CD163+	↓	Не различались	Не различались
Провоспалительные молекулы			
Tnfa	↑	Не различались	Выше у НУ в неактивированных макрофагах
Il1b	↑	↑	
Il6	↑	↑	Не различались
Nos2	↑	↑	Не различались
iNOS	Не различались	Не различались	Не различались
Mmp9	↑	Не различались	Не различались
CCR7	Не различались	↑	Выше у НУ в активированных макрофагах
HGF	Не различались	↑	Не различались
Противовоспалительные молекулы			
Il10	↑	↑	Не различались
Tgfb	↑	↑	Не различались
Молекулы, отвечающие на гипоксию			
Hif1a	↑	↑	Выше у НУ в активированных макрофагах
Epas1 (Hif2a)	Не различались	Не различались	Выше у НУ в неактивированных макрофагах
HIF-1α	Не различались	↑	Не различались
Vegf	Не различались	↑	Ниже у НУ в неактивированных макрофагах
VEGF	Не различались	Не различались	Ниже у НУ в неактивированных макрофагах

Кроме того, установлено, что через один месяц после определения устойчивости к гипоксии у ВУ и НУ животных различается фагоцитарная активность моноцитов периферической крови в ответ на *in vivo* и *ex vivo* гипоксическое воздействие – она выше у ВУ крыс Вистар по сравнению

с НУ. При этом *ex vivo* гипоксическое воздействие оказывало более выраженный эффект – статистически значимое увеличение фагоцитарной активности моноцитов по сравнению с условиями нормоксии наблюдалось только у ВУ крыс в условиях *ex vivo* гипоксического воздействия при 1% O_2.

Показано, что через один месяц после определения устойчивости к гипоксии только у НУ крыс при стимуляции ЛПС, ФГА и КонА *ex vivo* повышалось содержание IL-1β в культуральной жидкости клеток крови, а продукция IL-10 увеличивалась как у ВУ, так и у НУ крыс. Выявленные различия могут быть обусловлены определением устойчивости к гипоксии в барокамере, поэтому проведено исследование продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов до и через один месяц после воздействия в барокамере у ВУ и НУ крыс.

В условиях *ex vivo* гипоксического воздействия продукция клетками крови провоспалительного цитокина IL-1β повышалась у ВУ и НУ крыс по сравнению с нормоксией как до определения устойчивости в барокамере, так и после, однако через один месяц после гипоксической нагрузки в барокамере значения были выше. Через один месяц после определения устойчивости к гипоксии в барокамере и инкубации клеток крови при 1% O_2 продукция IL-10 не увеличивалась, как IL-1β, а, напротив, снижалась у НУ животных, а у ВУ – не изменялась. После определения устойчивости к гипоксии в барокамере показатели спонтанной и стимулированной комплексным митогеном продукции IL-1β увеличивались как у ВУ, так и у НУ животных по сравнению с исходными значениями. При этом спонтанная продукция IL-10 при инкубации в течение 24 ч через один месяц после определения устойчивости к гипоксии повышалась только у ВУ животных. Стимулированная *ex vivo* гипоксическим воздействием и ЛПС, ФГА и КонА продукция IL-10 клетками крови снижалась через один месяц после определения устойчивости к гипоксии только у НУ животных (табл. 3.8.15).

Таким образом, сублетальная гипоксическая нагрузка, которая используется при определении устойчивости животных к недостатку кислорода в барокамере оказывает модулирующий эффект на иммунные клетки, который сохраняется спустя один месяц после воздействия. При этом у НУ животных клетки приобретают более провоспалительный фенотип за счет снижения продукции IL-10 и повышения продукции IL-1β.

Таблица 3.8.15

Изменение продукции IL-1β и IL-10 клетками крови ВУ и НУ крыс Вистар после сублетальной гипоксической нагрузки в барокамере по сравнению с показателями до нее

Условие инкубации клеток крови	**ВУ**		**НУ**	
	IL-1β	**IL-10**	**IL-1β**	**IL-10**
Спонтанная продукция (нормоксия, 1 ч)	↑	↑	↑	↑
Стимулированная продукция (гипоксия, 1 ч)	↑	=	↑	↓
Спонтанная продукция (без комплексного митогена, 24 ч)	↑	↑	↑	=
Стимулированная продукция (с комплексным митогеном, 24 ч)	↑	=	↑	↓

↑ – повышение, ↓ – снижение, = – без статистически значимых изменений

Поскольку у ВУ и НУ животных были выявлены различия тяжести течения СВО при прогрессии опухолей – КРР, глиобластомы и карциномы легких Льюис, задачей следующей части работы было оценить баланс провоспалительных и противовоспалительных реакций у животных с разной устойчивостью к гипоксии. Как в воспалительных, так и в опухолевых процессах ключевую роль играют макрофаги, они выполняют иммунорегуляторную и фагоцитарную функции (Ельчанинов и Фатхудинов, 2023). Нами показано, что у ВУ животных при КРР повышалось относительное число моноцитов в крови, а у НУ снижалось относительное число F4/80+ макрофагов в БЛУ. При прогрессии карциномы легких только у НУ животных повышалось относительное число CD11b+ моноцитов в крови. Вероятно, особенности функционирования макрофагов во многом определяют прогрессию опухолей у ВУ и НУ животных, поэтому были охарактеризованы молекулярно-биологические и функциональные особенности макрофагов и оценен уровень продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов у крыс Вистар с разной устойчивостью к гипоксии.

Макрофаги являются ключевыми клетками врожденного иммунитета. Они происходят из моноцитов, мигрирующих из кровяного русла в ткани. Одной из основных функций моноцитов и макрофагов является участие в воспалительных процессах (Almansour et al., 2024). Макрофаги для эффективного выполнения своих функций в процессе дифференцировки приобретают фенотип, характерный для конкретного микроокружения, т.е. способны адаптировать его к изменяющимся условиям (Chen et al., 2023б; Khan et al., 2023). В солидных опухолях TAMs являются одной из ключевых популяций иммунных клеток, они играют важную роль в инвазии

опухолевых клеток, ангиогенезе и метастазировании (Condeelis и Pollard, 2006; Salmaninejad et al., 2019). Инфильтрация М1 макрофагами считается благоприятным прогностическим фактором при прогрессии опухолей, а М2 макрофаги, напротив, способствуют формированию иммуносупрессивной среды (Mantovani et al., 2004a; Zhang и Sioud, 2023). Существуют экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что TAMs представляют собой как М1, так и М2 макрофаги (Allavena et al., 2008). Таким образом, макрофаги контролируют многие важные процессы, обеспечивающие прогрессию опухолей, включая ангиогенез, инвазию опухолевых клеток, миграцию и интравазацию, а также метастазирование. В каждом из этих процессов участвуют различные субпопуляции макрофагов, которые осуществляют их регуляцию (Qian и Pollard, 2010). Следовательно, функционал этих клеток может выступать в роли важной терапевтической мишени для лечения опухолей. Переключение направления дифференцировки макрофагов с М2 фенотипа на М1 было предложено в качестве терапевтического подхода для лечения злокачественных новообразований (Грачев и соавт., 2018; Mantovani et al., 2011). Тем не менее, М1-М2 классификация макрофагов в последние годы подвергается значительной критике, так как макрофаги – динамичная популяция клеток, экспрессия генов в которых может постоянно меняться в зависимости от микроокружения (Ельчанинов и Фатхудинов, 2023; Murray et al., 2014). Показано, что макрофаги могут спонтанно увеличивать синтез провоспалительных и противовоспалительных маркеров даже при отсутствии стимулов (Specht et al., 2021). Исследования TAMs активно продолжаются, в том числе с помощью секвенирования единичных клеток (Ma et al., 2022a; Wang et al., 2023б; Vishnyakova et al., 2025). Проявления М1 или М2 фенотипа макрофагов сопровождаются комплексом молекулярных изменений, которые можно разделить на уровни: секретируемые, поверхностные и внутриклеточные молекулы (Murray et al., 2014; Vishnyakova et al., 2025). В исследованиях фенотипа и функциональных свойств макрофагов *in vitro* и *in vivo* не учитывается исходная устойчивость организма к гипоксии. Поэтому мы оценивали молекулярно-биологические и функциональные особенности макрофагов у ВУ и НУ крыс Вистар по комплексу молекул.

Нами впервые показано, что существуют молекулярно-биологические и функциональные особенности макрофагов в зависимости от устойчивости организма к гипоксии (рис. 3.8.14-3.8.16).

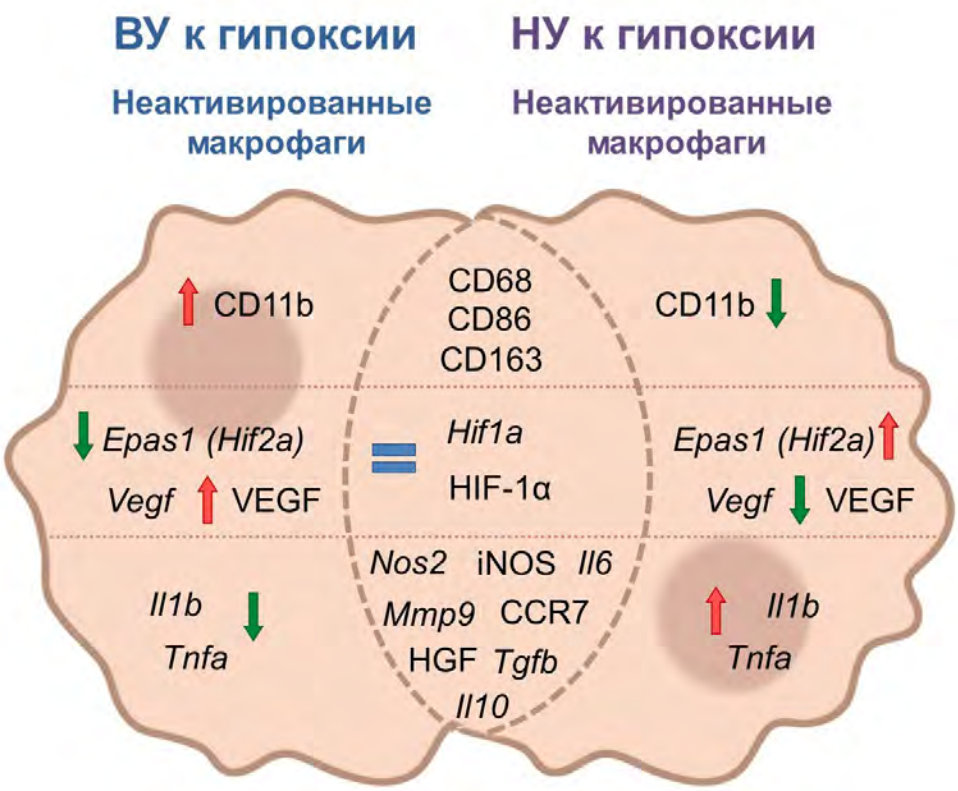


Рис. 3.8.14. Суммарные результаты исследования молекулярно-биологических и функциональных особенностей неактивированных макрофагов у ВУ и НУ крыс Вистар

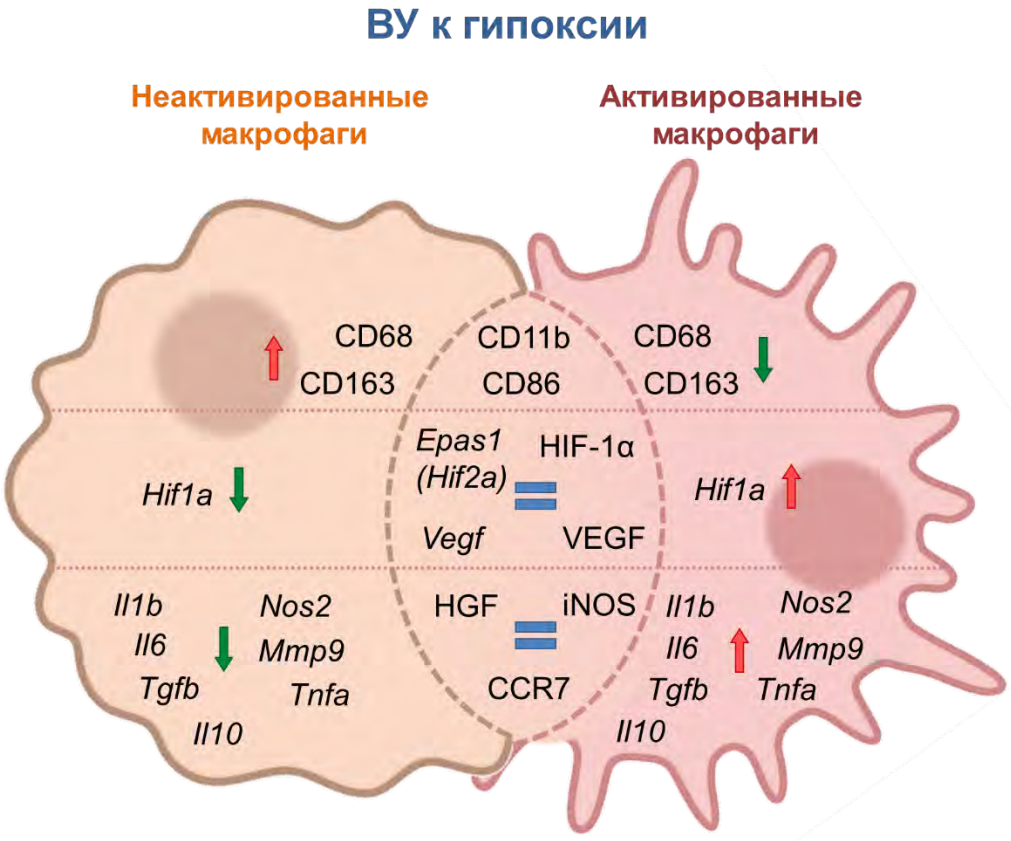


Рис. 3.8.15. Суммарные результаты исследования молекулярно-биологических и функциональных особенностей неактивированных и активированных ЛПС макрофагов у ВУ крыс Вистар

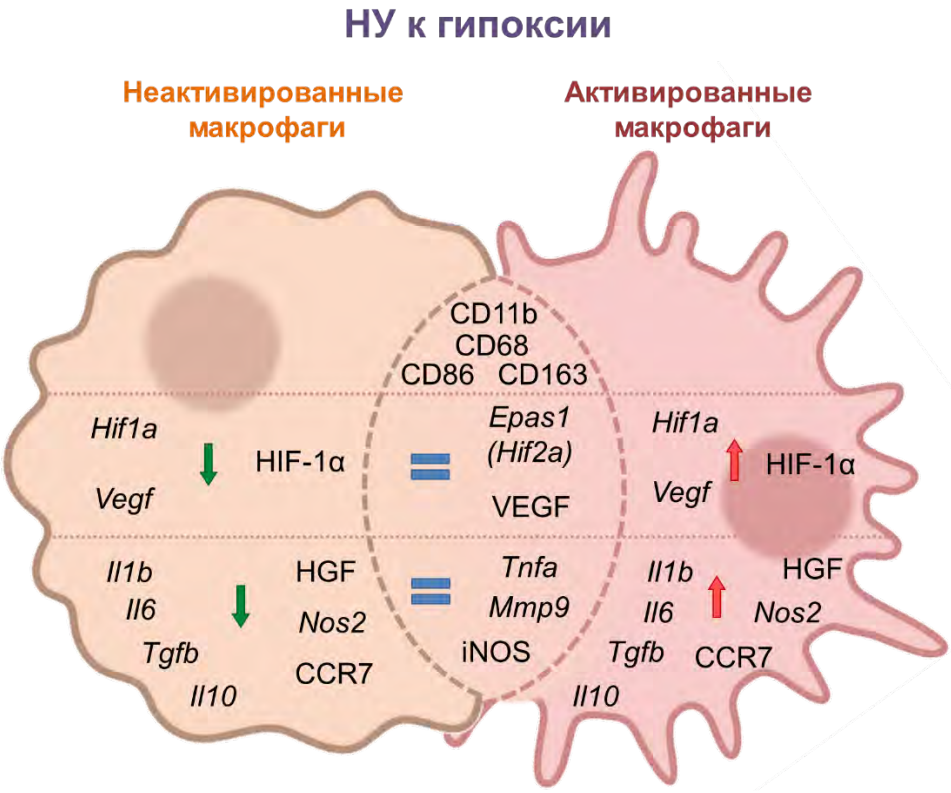


Рис. 3.8.16. Суммарные результаты исследования молекулярно-биологических и функциональных особенностей неактивированных и активированных ЛПС макрофагов у НУ крыс Вистар

Показано, что ВУ и НУ крысы различаются по иммунофенотипу макрофагов костномозгового происхождения. У ВУ крыс Вистар по сравнению с НУ было выше число CD11b+ клеток. CD11b интегрин регулирует миграцию макрофагов в очаг воспаления и их провоспалительную поляризацию (Schmid et al., 2018). По данным литературы макрофаги, выделенные в первичную культуру из костного мозга, синтезируют CD11b на высоком уровне (Ikarashi et al., 2013; Nishiyama et al., 2015; Hoeffel и Ginhoux, 2018), поэтому CD11b чаще всего используют в качестве маркера макрофагов костномозгового происхождения. Активация CD11b способствует провоспалительной поляризации макрофагов, стимулируя экспрессию микроРНК *Let7a*, и подавляет рост злокачественных опухолей у мышей (Schmid et al., 2018). Глобальная делеция *CD11b* у мышей *(CD11b−/−)* приводила к увеличению объема опухолей по сравнению с таковым у животных дикого типа, что позволяет предположить, что CD11b играет важную роль в контроле роста опухолей (Schmid et al., 2018). Ингибирование CD11b предотвращает экспрессию *Let7a* и вызывает экспрессию *cMyc*, что приводит к иммуносупрессивной поляризации макрофагов, ангиогенезу и ускоренному росту опухолей. Эти данные позволяют рассматривать CD11b как негативный регулятор иммуносупрессии и мишень для иммунотерапии злокачественных опухолей. На модели LLC показано, что у мутантных мышей с высоким уровнем CD11b снижена плотность TAMs, а также меньше размер опухолей и скорость их развития (Geraghty et al., 2020). Таким образом, более низкое количество CD11b+

неактивированных макрофагов у НУ животных может влиять на течение как воспалительных, так и опухолевых процессов.

В нашей работе снижение числа CD68+ и CD163+ макрофагов при активации ЛПС наблюдалось только у ВУ животных. L. Song и соавт. в 2011 г. провели комплексное исследование влияния дефицита CD68 в миелоидных клетках мышей на течение воспалительных и иммунных реакций (Song et al., 2011). Как и макрофаги дикого типа, мышиные макрофаги без CD68 характеризовались нормальной фагоцитарной активностью по отношению к *Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes*, *Legionella pneumophila* и вирусу везикулярного стоматита. Макрофаги с дефицитом CD68 стимулировали воспалительные реакции, так же как и макрофаги дикого типа (Song et al., 2011). В целом, эти данные не предполагают очевидной роли CD68 в реакциях врожденного и адаптивного иммунитета. Таким образом, роль CD68 в воспалительных и иммунных реакциях остается недостаточно изученной (Chistiakov et al., 2017). CD163+ является ключевым маркером М2 макрофагов (Mantovani et al., 2008). Увеличение числа CD68+ и CD163+ макрофагов, ассоциированных с опухолью, считается неблагоприятным прогностическим фактором при развитии многих опухолей (Troiano et al., 2019; Zhang et al., 2022a; Jääskeläinen et al., 2024).

По нашим данным экспрессия генов провоспалительных цитокинов Il1b и Tnfa в неактивированных макрофагах была статистически значимо выше у НУ крыс по сравнению с ВУ. По данным литературы высокие уровни синтеза IL-6, TNF-α и iNOS свидетельствуют о провоспалительном фенотипе макрофагов (Askenase et al., 2015; Nakanishi et al., 2018).

При воздействии ЛПС экспрессия гена Il1b увеличивалась в макрофагах как у ВУ, так и у НУ крыс. Однако повышение экспрессии гена Tnfa в активированных ЛПС макрофагах по сравнению с неактивированными было выявлено только у ВУ крыс. Следовательно, у НУ крыс наблюдается исходно высокий уровень экспрессии генов провоспалительных цитокинов Il1b и Tnfa в неактивированных макрофагах, а при воздействии ЛПС увеличение экспрессии Tnfa происходит только у ВУ животных. Исходный провоспалительный фенотип неактивированных макрофагов у НУ животных может определять развитие и тяжесть течения различных заболеваний. ЛПС обычно используют для провоспалительной активации макрофагов, что приводит к синтезу провоспалительных цитокинов, включая IL-1, IL-6 и TNF-α (Mantovani et al., 2011; Zhang et al., 2025).

По нашим данным различий по экспрессии гена Nos2 и белка iNOS в макрофагах у ВУ и НУ крыс не выявлено. Экспрессия гена Nos2 увеличивалась в активированных ЛПС макрофагах по сравнению с неактивированными как у ВУ, так и у НУ крыс. Однако по результатам Вестерн-блоттинга не выявлено различий по содержанию белка iNOS в неактивированных и активированных макрофагах у животных с разной устойчивостью к гипоксии. iNOS является

ключевым ферментом, участвующим в воспалительной реакции, так как является источником оксида азота (NO) и индуцируется в ответ на провоспалительные стимулы. iNOS продуцируется различными клетками, включая макрофаги, ДК, NK клетки и клетки первичных опухолей (Bogdan, 2001). Мыши с дефицитом iNOS более восприимчивы к воспалительным заболеваниям (Niedbala et al., 2011; Mao et al., 2013). iNOS является важным маркером провоспалительной активации макрофагов. Тем не менее, роль iNOS в контроле поляризации макрофагов до конца не изучена.

Транскрипция и трансляция любого белка – динамический процесс. Индуцированная транскрипция немедленно не приводит к повышению содержания белка, поскольку созревание, экспорт и трансляция мРНК занимают некоторое время. Таким образом, существует задержка между индукцией транскрипции и повышением содержания белка (Liu et al., 2016). По данным S.-C. Lu и соавт. (2009) уровни мРНК и белка iNOS значительно увеличивались через 8 ч после воздействия ЛПС на клетки Raw 264.7, а по данным J. Wang и соавт. (2019) – через 12 ч. Длительная активация iNOS приводит к образованию высокого уровня NO, что может вызвать повреждение тканей, поэтому эффективная деградация iNOS является важным механизмом устранения воспаления (Golde et al., 2003).

По нашим данным экспрессия гена Hif1a не различалась в неактивированных макрофагах у ВУ и НУ животных, а экспрессия Epas1 (Hif2a) была статистически значимо выше в неактивированных макрофагах у НУ крыс. Макрофаги животных с разной устойчивостью к гипоксии различаются по активации изоформ HIF: у НУ животных по сравнению с ВУ в неактивированных макрофагах выше экспрессия Epas1 (Hif2a), а в активированных ЛПС – Hif1a. Воздействие ЛПС на макрофаги приводит к переключению метаболизма в сторону гликолиза и пентозофосфатного пути. Такая активация гликолиза происходит за счет HIF-1α как в условиях гипоксии, так и после стимуляции макрофагов ЛПС (Cramer et al., 2003; Tannahill et al., 2013). При отсутствии активации HIF-1α клеточный пул АТФ резко снижается, что приводит к нарушениям агрегации, подвижности, инвазии и уничтожения бактерий миелоидными клетками (Cramer et al., 2003). G.M. Tannahill и соавт. (2013) выявили стабилизацию HIF-1α после стимуляции макрофагов ЛПС, что приводит к их поляризации в M1 фенотип (Tannahill et al., 2013). Активация HIF-1α может быть вызвана различными классическими активаторами через индукцию NF-κB, что способствует продукции провоспалительных цитокинов и других медиаторов M1 фенотипа макрофагов, таких как гликолитические ферменты и переносчики глюкозы. С другой стороны, активация HIF-2α происходит независимо от NF-κB, что соответствует альтернативной активации (Galván-Peña и O'Neill, 2014). Значительное увеличение содержания HIF-1α, наблюдаемое в ЛПС-активированных культурах макрофагов у НУ крыс, указывает на их высокую провоспалительную способность, так как HIF-1α способствует

переключению с окислительного фосфорилирования на гликолиз, и обусловливает повышение экспрессии генов провоспалительных цитокинов. Вероятно, это во многом определяет более тяжелое течение ЛПС-индуцированного СВО – более выраженные воспалительные изменения в легких и печени, повышенный уровень провоспалительных цитокинов наблюдались у НУ крыс Вистар (Dzhalilova et al., 2019a, б). Кроме того, показано, что HIF-1α играет ключевую роль в формировании тренированного иммунитета, так как блокирование пути mTOR-HIF-1α полностью его подавляло (Cheng et al., 2014).

По нашим данным как экспрессия гена, так и содержание белка VEGF в неактивированных макрофагах у ВУ крыс были статистически значимо выше по сравнению с НУ. Однако экспрессия Epas1 (Hif2a) была выше в неактивированных макрофагах НУ крыс. Ранее нами и другими авторами было установлено (Kirova et al., 2013; Dzhalilova et al., 2019a), что животные с разной устойчивостью к гипоксии различаются по экспрессии гена и содержанию белка HIF-1α. Показано, что содержание белка HIF-1α в печени, мозге и других органах у НУ животных выше, однако данных по содержанию HIF-2α у животных с разной устойчивостью к гипоксии в литературе не представлено. HIF-1α и HIF-2α являются ключевыми молекулами, поддерживающими гомеостаз O_2, но, несмотря на сходство в структуре и регуляции, в процессе онтогенеза они выполняют разные и во многом неперекрывающиеся функции. HIF-2α активирует гены, участвующие почти в каждом этапе ангиогенеза, например, в прорастании, элонгации и созревании сосудов (Befani и Liakos, 2018). Предполагается, что HIF-1α также регулирует VEGF на разных этапах ангиогенеза (Bakleh и Al Haj Zen, 2025). В промоторах или энхансерах генов многих ангиогенных факторов HREs или подобные последовательности распознаются HIF-2α. Основной ангиогенный фактор VEGF и его рецепторы VEGFR-1 и VEGFR-2 в условиях гипоксии индуцируются непосредственно HIF-2α через связывание им HREs (Elvert et al., 2003; Takeda et al., 2004). Накопление HIF-2α происходит преимущественно за счет посттрансляционной регуляции (Wiesener et al., 2003). Вероятно, у НУ крыс экспрессия гена *Epas1 (Hif2a)* в нормоксических условиях выше по сравнению с ВУ, однако белок HIF-2α подвергается протеасомной деградации под действием пролилгидроксилаз (Patel и Simon, 2008) и не приводит к повышению содержания VEGF. У ВУ крыс высокий уровень экспрессии гена и содержание белка VEGF в условиях нормоксии по сравнению с НУ животными могут быть обусловлены другими механизмами. Например, установлено (Riazy et al., 2009), что окисленные липопротеины низкой плотности (ЛПНП) могут активировать синтез VEGF в макрофагах. Нами показано (Dzhalilova et al., 2023д), что фагоцитарная активность моноцитов выше у ВУ животных в условиях гипоксии. Возможно, б*о*льшая фагоцитарная активность моноцитов у ВУ животных способствует большему поглощению окисленных ЛПНП и активации VEGF.

В активированных ЛПС макрофагах у НУ животных наблюдалось увеличение экспрессии гена Hif1a и содержания белка HIF-1α, а также гена и белка VEGF по сравнению с неактивированными макрофагами. При этом у ВУ животных при воздействии ЛПС увеличивалась только экспрессия гена Hif1a, а экспрессия гена и содержание белка VEGF в макрофагах не изменялись. У ВУ крыс при исходно высоком содержании VEGF в неактивированных макрофагах изменений при воздействии ЛПС не наблюдалось, что может быть обусловлено отсутствием увеличения содержания белка HIF-1α, несмотря на увеличение экспрессии его гена. По данным литературы М2 макрофаги могут способствовать васкуляризации опухоли, продуцируя проангиогенные факторы, такие как VEGF (Lai et al., 2018). Высокое содержание М2 макрофагов и продукция VEGF связаны с неблагоприятным прогнозом при развитии опухолей (Hwang et al., 2020).

Нами показано, что при воздействии ЛПС содержание CCR7 увеличивалось только в макрофагах у НУ крыс Вистар, что сопровождалось повышением экспрессии гена и содержания белка HIF-1α у этих крыс. Одним из маркеров М1 поляризации макрофагов является хемокиновый рецептор CCR7, также известный как CD197, участвующий в контроле миграции клеток памяти в лимфатических узлах и стимуляции созревания ДК (Bono et al., 2007; Woodland и Kohlmeier, 2009). Рецептор CCR7 на макрофагах рассматривается как специфичный маркер М1 макрофагов (Tateyama et al., 2009). Синтез CCR7-специфичных лигандов CCL19 и CCL21 наблюдается в начале воспалительной реакции (Zlotnik и Yoshie, 2000; Badylak et al., 2008; Oh et al., 2012). CCR7 играет важную роль во взаимодействиях между иммунными клетками (Qi et al., 2006). У мышей с дефицитом CCR7 нарушаются гуморальные иммунные реакции (Scandella et al., 2007). Ранее нами было показано, что у НУ крыс Вистар в ответ на введение ЛПС более выражены реакции гуморального иммунитета, в то время как у ВУ – клеточного (Dzhalilova et al., 2019б). Вероятно, во многом это может быть обусловлено повышением содержания CCR7 в макрофагах НУ крыс. С другой стороны, в недавних работах показано, что повышение синтеза CCR7 в опухолевых клетках взаимосвязано с инфильтрацией противовоспалительными макрофагами и неблагоприятным прогнозом, а также метастазами в лимфатические узлы (Zhou et al., 2022). В гене, кодирующем CCR7, в опухолевых клетках выявлены HREs, которые являются сайтами связывания изоформ HIF. HIF-1α и HIF-2α распознают HREs генов и способны активировать транскрипцию генов-мишеней, например, способствовать метастазированию в лимфатические узлы, увеличивая синтез CCR7 при немелкоклеточном раке легких (Wilson et al., 2006; Li et al., 2009). Ингибирование CCR7 уменьшает поляризацию TAMs в М2 фенотип, а также способствует активации CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов, пролиферации и повышению их противоопухолевой активности (Yan et al., 2024).

При воздействии ЛПС в макрофагах у НУ крыс увеличивалось содержание белка HGF, в то время как у ВУ не изменялось. HGF представляет собой многофункциональный белок, который обладает митогенной и ангиогенной активностью за счет взаимодействия с его клеточным рецептором c-MET (Nakamura и Mizuno, 2010). Известно, что передача сигналов HGF-MET способствует ангиогенезу, повышению подвижности клеток, инвазии, дифференцировке, контролирует эмбриональное развитие, регенерацию тканей и заживление ран в различных органах (Bolanos-Garcia, 2005). Показано, что активация HGF-MET способствует поляризации макрофагов из M1 в M2 фенотип, что обусловливает иммуносупрессию и прогрессию опухолей (Choi et al., 2019; Nishikoba et al., 2020). N. Nishikoba и соавт. (2020) рассматривают активацию сигнального пути HGF как возможный фактор, участвующий в изменении провоспалительного фенотипа на противовоспалительный во время восстановления тканей. В M1 макрофагах активация сигнального пути HGF-MET индуцирует экспрессию *Arg1* и продукцию IL-10 и TGF-β, но снижает экспрессию *iNos, Tnfa* и *Il6* (Nishikoba et al., 2020). Связывание HGF с его рецептором c-MET может стимулировать экспрессию *Hif1a* по PI3K-зависимому пути в клетках гепатомы HepG2 (Tacchini et al., 2001). HGF активирует сигнальные пути HGF/c-MET, ERK1/2/MAPK и PI3K/AKT в опухолевых клетках (Dong et al., 2019). Увеличение содержания HGF в активированных ЛПС макрофагах НУ крыс, но не ВУ, при взаимодействии с c-MET может способствовать M2 поляризации макрофагов и в условиях *in vivo*, вероятно, могло бы способствовать активации сигнальных путей MAPK/ERK1/2 и PI3K/AKT/mTOR в клетках и росту опухолей.

Различий экспрессии матриксной металлопротеиназы Mmp9 в неактивированных и активированных ЛПС макрофагах у животных с разной устойчивостью к гипоксии выявлено не было. Экспрессия Mmp9 увеличивалась в активированных ЛПС макрофагах только у ВУ крыс, а у НУ – не изменялась. Главная функция MMPs – это разрушение компонентов ВКМ за счет синтеза, высвобождения и протеолитической активации цитокинов и хемокинов (Nissinen и Kähäri, 2014; Lee и Kim, 2022). MMP9 играет важную роль в воспалении, ангиогенезе, активации цитокинов и является важным маркером тяжести воспалительного процесса. MMP9 синтезируется нейтрофилами и макрофагами и способствует инфильтрации иммунных клеток за счет разрушения компонентов базальной мембраны (Luchian et al., 2022). Показано, что MMP9 может индуцироваться провоспалительными стимулами, в том числе ЛПС (Yang et al., 2019). По данным N.A. Jager и соавт. (2016) в условиях *in vitro* преимущественно M2 макрофаги экспрессируют *MMP9* по сравнению с M1, но по другим данным (Roma-Lavisse et al., 2015), напротив, M1 макрофаги. По данным литературы HIF-1α может способствовать увеличению синтеза MMP9 (Wan et al., 2011), тем не менее, у НУ крыс, несмотря на увеличение содержания HIF-1α, экспрессия *Mmp9* не изменялась. Необходимо проведение дополнительных

исследований зависимости активации MMP9 от индивидуальной устойчивости организма к гипоксии.

Таким образом, нами показано, что у ВУ и НУ животных фенотипы неактивированных и активированных ЛПС макрофагов различаются. Известно, что макрофаги очень пластичны, обладают способностью приобретать многочисленные состояния поляризации или фенотипы с различными про- или противовоспалительными свойствами (Almansour et al., 2024). Появляется все больше доказательств того, что M1-M2 классификация макрофагов представляет собой крайности гораздо более широкого спектра фенотипов, и что промежуточные фенотипы могут играть важную роль в прогрессии заболеваний или эффективности их терапии. Все больше исследований указывают на существование различных промежуточных или «смешанных» фенотипов макрофагов, которые демонстрируют некоторые черты, родственные и M1, и M2 (Reinartz et al., 2014; Calle и Hotter, 2020; Strizova et al., 2023). Разделение макрофагов на M1 и M2 фенотипы в настоящее время считается чрезмерным упрощением, поскольку эти клетки очень пластичны в зависимости от стимулов микроокружения и, таким образом, представляют собой большое разнообразие иммунофенотипов с перекрывающимися функциональными свойствами (Strizova et al., 2023). Изменение баланса M1-M2 макрофагов может происходить как за счет подавления M1-пути активации, так и за счет стимуляции M2-пути, при этом часть макрофагов может оставаться в неактивированном состоянии (Almansour et al., 2024). Таким образом, согласно полученным нами данным, необходимо учитывать индивидуальную устойчивость организма к гипоксии, которая также определяет фенотип макрофагов. Необходимо проведение дополнительных исследований макрофагов у ВУ и НУ животных с помощью технологии секвенирования единичных клеток.

Таким образом, неактивированные макрофаги НУ животных, с одной стороны, имеют провоспалительный фенотип, а с другой стороны, при активации провоспалительным стимулом (ЛПС) преимущественно дифференцируются в M1 фенотип, что обусловлено увеличением как экспрессии гена, так и содержания белка HIF-1α и подтверждается высоким содержанием маркера M1 макрофагов – CCR7. У НУ животных выявлена провоспалительная активность неактивированных и активированных ЛПС макрофагов костномозгового происхождения, что согласуется с более тяжелым течением острого и хронического колита у этих животных. В контексте развития опухолей провоспалительная активность макрофагов эффективна на этапе элиминации появившихся трансформированных клеток. Однако, по-видимому, у НУ животных этот этап быстро преодолевается опухолевыми клетками, и они «ускользают» от иммунного надзора даже несмотря на более провоспалительный фенотип макрофагов. Кроме того, известно, что опухолевые клетки могут супрессировать микроокружение за счет синтеза противовоспалительных цитокинов, а макрофаги быстро меняют фенотип в зависимости от

окружающих условий (Almansour et al., 2024). Поэтому, вероятно, при развитии опухолей у НУ животных макрофаги могут быстро изменять свой фенотип в сторону иммуносупрессивного. Это подтверждается повышением содержания VEGF и HGF в активированных макрофагах только у этих крыс. Тем не менее, необходимо проведение дополнительных исследований особенностей функционирования макрофагов при прогрессии опухолей у ВУ и НУ животных *in vivo*.

Фагоцитарная активность моноцитов периферической крови, которая является интегративным показателем их функционального состояния, в условиях нормоксии не различалась у ВУ и НУ крыс, а после in vivo и ex vivo гипоксического воздействия была выше у ВУ животных по сравнению с НУ. Активация клеток крови *ex vivo* является перспективным подходом для исследования иммунных реакций и воспроизводит условия, наиболее близкие к условиям *in vivo* (Chick et al., 2024; Müller et al., 2024). Как упоминалось выше, функциональная активность моноцитов во многом определяется активацией фактора HIF-1α, который способствует переключению метаболизма с окислительного фосфорилирования на гликолиз и обусловливает повышение экспрессии генов провоспалительных цитокинов и фагоцитарной активности (Peyssonnaux et al., 2005; Anand et al., 2007; McGettrick и O'Neill, 2020). Ранее нами было показано, что после острого гипоксического воздействия содержание HIF-1α 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). Очевидно, у ВУ крыс в условиях недостатка кислорода в моноцитах происходит более выраженная активация HIF-1α, что обусловливает повышение их фагоцитарной активности и ускорение метаболизма глюкозы. Различия в фагоцитарной активности моноцитов периферической крови после гипоксического воздействия могут определять тяжесть течения СВО, а также опухолевых процессов, в которых ключевую роль играют макрофаги (Han et al., 2016; Zhou et al., 2021). Следует отметить, что более выраженная активация HIF-1α, как упоминалось выше, при *in vitro* воздействии воспалительного стимула – ЛПС на макрофаги наблюдалась, напротив, у НУ животных. Ранее нами показано, что после введения животным ЛПС фагоцитарная активность клеток периферической крови была выше у НУ крыс Вистар, что коррелировало с более тяжелым течением СВО (Джалилова и соавт., 2019). Таким образом, функциональная активность макрофагов у ВУ и НУ животных может различаться в зависимости от стимула – гипоксического или воспалительного. Это подтверждает данные литературы об эффекте активации HIF-1α в зависимости от типа стимула: условия активации HIF-1α (гипоксия или воспаление) напрямую влияют на эффект, который эта субъединица реализует. В условиях недостатка кислорода наблюдается усиление транскрипции генов, отвечающих за адаптацию организма к гипоксии, а при воспалении – генов, регулирующих воспалительные реакции (Jantsch et al., 2011).

Недавно было показано, что воздействие гипоксии может модифицировать свойства макрофагов и снижать их иммуносупрессивное действие на цитотоксические Т-лимфоциты, что ассоциировано с благоприятным прогнозом при прогрессии злокачественных опухолей (de la Calle-Fabregat et al., 2024). Наличие активированных гипоксией макрофагов было ассоциировано с благоприятным исходом у пациентов с карциномой яичника и мочевого пузыря. Макрофаги, которые дифференцировались из моноцитов в условиях гипоксии, в ответ на воздействие ЛПС демонстрировали усиленную провоспалительную программу, для которой характерно повышение секреции провоспалительных цитокинов (IL-6, TNF-α), более высокий уровень HLA-DR (Human Histocompatibility Leukocyte Antigen, лиганд для TCR) и костимулирующих белков CD80 и CD86. Синтез поверхностных маркеров покоящихся макрофагов (CD14, CD163, CD206) был снижен, как и продукция противовоспалительного цитокина IL-10. Кроме того, иммуносупрессивное действие на CD8+ цитотоксические Т-лимфоциты ослабевало (de la Calle-Fabregat et al., 2024). Ключевую роль в таких изменениях играл фермент, демитилирующий ДНК. Транскриптомный профиль макрофагов изменялся в условиях гипоксии и регулировался HIF-1α и NF-κB. Полученные данные позволяют рассматривать активированные гипоксией макрофаги и их репрограммирование как одну из стратегий в борьбе с онкологическими заболеваниями. Таким образом, показано, что гипоксия способна вызывать эпигенетические изменения, что приводит к активации иммунных клеток и снижению иммуносупрессивного эффекта микроокружения опухоли (de la Calle-Fabregat et al., 2024). Вероятно, характер этих изменений различается в зависимости от индивидуальной устойчивости к гипоксии и необходимо проведение дополнительных исследований в этой области.

Актуальность использования макрофагов для клеточной терапии в качестве мишени или агента в последние годы увеличивается. Регулирование клеточного гомеостаза при патологических условиях путем модуляции поляризации макрофагов в пораженных тканях и органах является важным перспективным направлением современной биомедицины. Такие подходы могут включать репрограммирование *in situ* или *ex vivo*. Разрабатывающиеся на основе регуляции поляризации макрофагов методы терапии опухолей предполагают, что индуцированная поляризация макрофагов в М1 фенотип будет стимулировать процессы воспаления и гибели опухолевых клеток. При этом в случае терапии воспалительных заболеваний индуцированное увеличение содержания М2 макрофагов будет стимулировать процессы регенерации, ангиогенеза и ремоделирования ВКМ (Poltavets et al., 2020; Jumaniyazova et al., 2023). Использование макрофагов в качестве терапевтического инструмента ограничивается отсутствием безопасных и эффективных подходов к их репрограммированию, а также выбору источника макрофагов. Гетерогенность субпопуляций макрофагов у мышей и людей выявлена давно. Однако зависимость фенотипа и функциональных свойств макрофагов от

исходной устойчивости организма к гипоксии остается неизученной. В нашей работе впервые получены данные о различиях у ВУ и НУ крыс Вистар в условиях нормоксии уровней экспрессии и синтеза макрофагами провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, а также молекул, обеспечивающих реакцию на гипоксическое воздействие (Dzhalilova et al., 2023в). Таким образом, в зависимости от исходной устойчивости организма к гипоксии иммунофенотип и функциональные свойства макрофагов различаются, что может определять тяжесть течения как воспалительных, так и опухолевых заболеваний.

Следует отметить, что статистически значимое увеличение фагоцитарной активности моноцитов по сравнению с условиями нормоксии наблюдалось только у ВУ крыс в условиях ex vivo гипоксического воздействия. Стимуляция фагоцитарной активности макрофагов может быть использована в качестве нового подхода к противоопухолевой терапии (Chen et al., 2021; Li et al., 2023б). 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 поиске неинвазивных биомаркеров устойчивости организма к гипоксии и разработке лабораторных способов ее определения целесообразно использовать *ex vivo* воздействие на клетки крови.

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*, ФГА и КонА продукции цитокинов клетками крови *ex vivo* через один месяц после определения устойчивости к гипоксии в барокамере. Комплекс активаторов является митогеном, стимулирующим продукцию цитокинов всеми лейкоцитами крови (Дружинина и соавт., 2009; Kosyreva et al., 2023).

Показано, что только у НУ крыс при стимуляции комплексным митогеном повышалось содержание IL-1β в культуральной жидкости клеток крови, а продукция IL-10 увеличивалась как у ВУ, так и у НУ крыс. Выявленные различия у ВУ и НУ крыс молекулярно-биологических и функциональных особенностей макрофагов, а также продукции цитокинов свидетельствуют о провоспалительном фенотипе клеток крови у НУ крыс и позволят внести вклад в изучение механизмов течения опухолевых заболеваний у организмов с разной исходной устойчивостью к гипоксии (Dzhalilova et al., 2023в; Kosyreva et al., 2023). Так как мы выявили провоспалительный фенотип макрофагов и повышенную продукцию IL-1β клетками крови в ответ на стимуляцию комплексным митогеном у НУ животных, дальнейшей задачей работы было определить,

является ли эта особенность предсуществующей и/или отдаленным по времени следствием гипоксического воздействия в барокамере на критической «высоте». Для этого мы исследовали *ex vivo* спонтанную и стимулированную ЛПС, ФГА и КонА и гипоксическим воздействием продукцию цитокинов у одних и тех же крыс до и после определения их устойчивости к гипоксии в барокамере (Dzhalilova et al., 2025a).

До определения устойчивости к гипоксии в барокамере у НУ животных спонтанная продукция IL-10 при инкубации в течение 24 ч была выше по сравнению с ВУ, а в ответ на стимуляцию комплексным митогеном продукция IL-1β повышалась только у НУ крыс. Эти данные позволили обосновать способы определения устойчивости к гипоксии у лабораторных животных, основанные на продукции IL-1β и IL-10 (Dzhalilova et al., 2024д), что будет подробно обсуждаться ниже, в 3.9.3. Кроме того, эти данные свидетельствуют о наличии предсуществующих различий продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов у ВУ и НУ животных.

Реакция на стимуляцию кислородной недостаточностью и воздействие комплексным митогеном у ВУ и НУ животных через один месяц после сублетальной гипоксической нагрузки в барокамере отличалась от таковой до нее. Как у ВУ, так и у НУ крыс после *ex vivo* воздействия гипоксии и комплексного митогена повышалась продукция IL-1β, однако у НУ животных при этом снижалась продукция IL-10, а у ВУ – не изменялась. По сравнению с ВУ крысами у НУ животных выявлено смещение баланса реакций в сторону провоспалительных за счет снижения продукции IL-10 и повышения IL-1β. Снижение продукции IL-10 у НУ животных наблюдалось в ответ на стимуляцию клеток крови как гипоксией, так и комплексным митогеном. Это свидетельствует о формировании провоспалительного фенотипа у НУ животных после сублетальной гипоксической нагрузки в барокамере и о том, что воздействие сублетальной гипоксической нагрузки в барокамере при определении устойчивости к недостатку O_2 оказывает иммуномодулирующий эффект на продукцию цитокинов клетками крови, который сохраняется через один месяц после воздействия, что подтверждает данные о влиянии недостатка кислорода на функциональную способность иммунных клеток (Taylor и Scholz, 2022). Таким образом, определение устойчивости организма к гипоксии в барокамере оказывает активирующий эффект на иммунные клетки, который сохраняется через один месяц после воздействия.

Выявленные изменения продукции цитокинов клетками крови в условиях гипоксии и при стимуляции комплексным митогеном после определения устойчивости организма к недостатку кислорода в барокамере могут быть связаны с активацией тренированного иммунитета (памяти врожденного иммунитета). Тренированный иммунитет – это вызванное контактами с PAMPs и/или DAMPs изменение функционирования клеток врожденного иммунитета при повторном взаимодействии с широким спектром патогенов и факторов (Netea et al., 2020). В отличие от

классической памяти адаптивного иммунитета, которая требует перестройки генов и клональной экспансии антигенспецифических лимфоцитов, индукция памяти врожденного иммунитета определяется устойчивыми эпигенетическими изменениями, что приводит к активации клеточных транскрипционных программ с изменением функциональной активности и способствует увеличению готовности врожденного звена иммунной системы к повторному стимулу (Natoli и Ostuni, 2019; Netea et al., 2019, 2020). Предполагают, что память врожденного иммунного ответа может сохраняться от недель до месяцев, а в случае применения живых вакцин – до 5 лет (Nankabirwa et al., 2015; Netea et al., 2020).

Установлено, что ключевую роль в формировании тренированного иммунитета 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). Ранее считалось, что тренированный иммунитет индуцируется в основном экзогенными PAMPs. В настоящее время признано, что немикробные и эндогенные стимулы (DAMPs) могут индуцировать тренированный иммунитет (Netea et al., 2020). Вероятно, при гипоксическом воздействии в барокамере на критической «высоте» в результате повреждения клеток образуются DAMPs, что приводит к реализации реакций тренированного иммунитета, который может сохраняться длительное время – более чем один месяц. При этом у НУ животных наблюдался дисбаланс продукции IL-1β, уровень которого повышался, и IL-10, продукция которого снижалась.

Известно, что в ответ на связывание PAMPs и DAMPs с паттерн-распознающими рецепторами (PRRs, Pattern Recognition Receptors) активируется NF-κB, индуцирующий продукцию провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, таких как IL-1β и IL-10 (Saraiva и O'Garra, 2010; Lopez-Castejon и Brough, 2011). Преимущественной популяцией клеток, обеспечивающей распознавание PAMPs и DAMPs и реализацию реакций тренированного иммунитета, являются моноциты, имеющие PRRs (Janeway и Medzhitov, 2002; Netea et al., 2020). Важно отметить, что тренированный иммунитет представляет собой долговременную адаптацию клеток врожденного иммунитета, а не конкретную транскрипционную или функциональную программу: различные стимулы, например β-глюкан, ЛПС или БЦЖ, могут вызывать отличающиеся по выраженности и направленности реакции тренированного иммунитета (Netea et al., 2020).

По сравнению с нетренированными иммунными клетками тренированные способны к более выраженной функциональной активации при повторном воздействии различных стимулов. Эти качественные изменения функционирования иммунных клеток связаны с дифференциальной регуляцией экспрессии ряда провоспалительных генов, таких как *IL1B, IL6* и *TNFA*, а также противовоспалительного *IL10* за счет ремоделирования хроматина, модификаций гистонов и

перестройки клеточного метаболизма (Netea et al., 2020; Murphy et al., 2021). В частности, повышение продукции IL-1β, IL-6 и TNF-α и снижение IL-10 свидетельствуют о формировании провоспалительного типа тренированного иммунитета, а повышение IL-10 – противовоспалительного (Murphy et al., 2021).

Модификация эпигенома, которая лежит в основе тренированного иммунитета, тесно связана с клеточным метаболизмом, поскольку метаболиты могут модифицировать хроматин и изменять активность эпигенетических факторов (Dai et al., 2020; Hajishengallis et al., 2020). Вероятно, активность ферментов, которые осуществляют модификации гистонов, может различаться в зависимости от индивидуальной устойчивости организма к гипоксии, но таких данных в литературе не представлено.

Одним из механизмов формирования тренированного иммунитета является активация HIF-1α-зависимого аэробного гликолиза (Cheng et al., 2014). Увеличение mTOR- и HIF-1α-опосредованного аэробного гликолиза обнаружено как в тренированных БЦЖ, так и β-глюканом моноцитах (Cheng et al., 2014). Таким образом, формирование тренированного иммунитета зависит в том числе и от гипоксии, однако необходимы дальнейшие исследования точных механизмов этого процесса.

Данные о роли HIF-1α в активации тренированного иммунитета также обусловлены тем, что тренированный иммунитет, вызванный β-глюканом и БЦЖ, зависит от активации сигнального пути IL-1, ингибирование которого нарушает формирование необходимых для тренированного иммунитета эпигенетических модификаций (Arts et al., 2018; Ciarlo et al., 2020). Генетические варианты в гене *IL1B* связаны с изменением функционирования тренированного иммунитета, что еще больше подчеркивает его важность (Arts et al., 2018). IL-1 активирует такие сигнальные пути как AKT, mTOR, ERK и NF-κB, что приводит к стабилизации HIF-1α (Teufel et al., 2021). Активация сигнального пути IL-1 усиливает гликолиз во многих клеточных линиях (Tan et al., 2018) и имеет широкий спектр HIF-зависимых эффектов на функционирование миелоидных клеток (Teufel et al., 2021). Полученные нами данные косвенно подтверждают предположения L. Eades и соавт. (2022) о том, что гипоксия может активировать тренированный иммунитет. При этом, если гипоксическое воздействие действительно имеет такой эффект, то еще более актуальной становится гипоксическая тренировка организма или гипокситерапия. При этом следует учитывать исходную устойчивость организма к гипоксии, так как у НУ организмов гипоксическая тренировка может привести к провоспалительному фенотипу иммунных клеток и более тяжелому течению последующих заболеваний.

Необходимо проведение дальнейших исследований функциональных и эпигенетических изменений, вызванных гипоксией в клетках врожденного иммунитета, что позволит выявить биомаркеры модифицированных иммунных реакций при различных заболеваниях.

Индукция тренированного иммунитета может оказывать благотворное влияние в контексте гетерологичного иммунного ответа или активировать противоопухолевые сигнальные пути (Kalafati et al., 2023). В то же время избыточная активация тренированного иммунитета может иметь неблагоприятные последствия. Активация провоспалительных реакций, связанная с изменениями функциональной активности иммунных клеток при формировании тренированного иммунитета, может приводить к развитию острого и хронического воспаления (Leentjens et al., 2018; Musher et al., 2019). Вероятно, воздействие сублетальной гипоксии в барокамере приводит к DAMP-опосредованным изменениям в эпигенетической регуляции функционирования иммунных клеток и формированию тренированного иммунитета. При этом у ВУ животных за счет тренированного иммунитета реакция на повторный стимул (воспаление, развитие опухоли) более эффективная, а у НУ – имеет неблагоприятные последствия. Тем не менее, концепция тренированного иммунитета сформулирована не так давно и необходимы дальнейшие исследования для выяснения его механизмов.

Надежная и эффективная активация иммунной системы имеет основополагающее значение для элиминации опухолевых клеток. Однако чрезмерные и длительные воспалительные реакции способствуют иммуносупрессии и прогрессии опухолей. Метаболические изменения, наблюдающиеся при развитии опухолей и при тренированном иммунитете, имеют несколько общих черт, таких как активация гликолиза и усиление экспрессии и активности факторов транскрипции, таких как HIF-1α, однако точные механизмы остаются недостаточно изученными.

Полученные в работе данные следует учитывать при проведении исследований с использованием животных с разной устойчивостью к гипоксии. Они свидетельствуют о том, что сублетальное гипоксическое воздействие в барокамере при определении устойчивости к недостатку кислорода оказывает длительный эффект на иммунные клетки, который сохраняется в течение не менее одного месяца после воздействия. Следует отметить, что в контрольных группах мышей C57Bl/6 в экспериментах, посвященных острому, хроническому колиту, моделированию КРР и карциномы легких Льюис выявлены различия показателей крови у ВУ и НУ животных, также свидетельствующие о провоспалительном фенотипе у НУ мышей. В частности, у НУ мышей было выше число лейкоцитов, лимфоцитов, моноцитов, эритроцитов, гемоглобина, В-лимфоцитов и Т-регуляторных клеток. Таким образом, НУ животные характеризуются провоспалительным фенотипом до воздействия в барокамере, а после него эти особенности модифицируются, но сохраняются.

3.9. Разработка способов *ex vivo* оценки устойчивости к недостатку кислорода самцов крыс Вистар без сублетального гипоксического воздействия в барокамере[9]

В настоящее время отсутствуют стандартизованные способы оценки устойчивости к гипоксии экспериментальных животных и людей без гипоксического воздействия. Поэтому поиск молекулярно-биологических маркеров, позволяющих выявить организмы с различной устойчивостью к дефициту кислорода в условиях нормоксии, несомненно, является целесообразным. Такими маркерами могут быть легко измеряемые в лабораторных условиях показатели крови. Как показано в 3.8, через один месяц после определения устойчивости к гипоксии в барокамере ВУ и НУ животные различаются по фагоцитарной активности моноцитов периферической крови в условиях недостатка кислорода как *in vivo*, так и *ex vivo*, а также по стимулированной комплексным митогеном продукции IL-1β клетками крови. Поскольку гипоксическая нагрузка стимулирует провоспалительные и противовоспалительные реакции и модифицирует функциональное состояние быстро реагирующих на воздействие макрофагов, в качестве потенциальных способов оценки устойчивости животных к гипоксии без воздействия в барокамере были выбраны: фагоцитарная активность моноцитов в условиях нормоксии и гипоксии, спонтанная и стимулированная гипоксическим стимулом в течение 1 ч продукция клетками крови IL-1β и TGF-β, а также в течение 24 ч – спонтанная продукция IL-6, IL-10 и TNF-α, и стимулированная комплексным митогеном продукция IL-1β. Как было показано нами ранее, у НУ крыс наблюдается более тяжелое течение СВО, индуцированного ЛПС, с высоким содержанием IL-1β в сыворотке крови (Dzhalilova et al., 2019a), поэтому в работе мы исследовали содержание этого цитокина при стимуляции клеток крови комплексным митогеном, состоящим из ЛПС, ФГА и КонА.

---

[9]При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении научных степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования (в скобках приведен импакт-фактор журнала, объем публикации в условных печатных листах/вклад автора в условных печатных листах):

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-1β клетками крови // Патент РФ 2821643 от 25.06.2024 Опубл. 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 Опубл. 25.06.2024 Бюл. № 18 (Заявл. №2023126237 от 13.10.2023) (0,75/0,5)
3. **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 РИНЦ 0,880, RSCI (0,35/0,25) [**Dzhalilova D.Sh.**, Kosyreva 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 WoS (JIF), Q4 (0,35/0,25)]

По результатам определения устойчивости к гипоксии в барокамере по «времени жизни» на «высоте» 11 500 м среди половозрелых крыс Вистар 16,9% оказались ВУ со «временем жизни» более 240 с, 21,9% – НУ со «временем жизни» менее 80 с (рис. 3.9.1).

Рис. 3.9.1. Результаты разделения половозрелых крыс Вистар в барокамере на критической «высоте» 11 500 м на ВУ, СУ и НУ

3.9.1. Фагоцитарная активность моноцитов периферической крови до определения устойчивости самцов крыс Вистар к гипоксии

Вероятно, для выявления различий между ВУ и НУ животными необходимо стрессорное воздействие, например, гипоксическим или провоспалительным стимулом. Кроме того, способ определения устойчивости к гипоксии должен быть неинвазивным, поэтому перспективным является использование *ex vivo* воздействий на клетки, а не на организм в целом.

Поскольку нами показано, что фагоцитарная активность моноцитов периферической крови у крыс Вистар с разной устойчивостью к гипоксии различается после *in vivo* и *ex vivo* гипоксического воздействия, и воздействие *ex vivo* оказывает более выраженный эффект, мы провели аналогичное исследование *ex vivo* у животных до определения устойчивости к гипоксии в барокамере.

При исследовании фагоцитарной активности моноцитов до определения устойчивости животных к гипоксии в барокамере различий по этому показателю у ВУ и НУ крыс Вистар как в условиях нормоксии, так и при стимуляции гипоксическим воздействием *ex vivo*, не наблюдалось (табл. 3.9.1). Следовательно, выявленные нами различия фагоцитарной активности моноцитов у ВУ и НУ животных после *in vivo* и *ex vivo* гипоксического воздействия могут быть следствием

определения устойчивости к гипоксии в барокамере, а в качестве биомаркера данный показатель не подходит.

Таблица 3.9.1

Фагоцитарная активность моноцитов в условиях нормоксии и после *ex vivo* гипоксического воздействия у ВУ и НУ крыс Вистар до определения устойчивости к недостатку кислорода в барокамере, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Группы наблюдения / **Параметр**	**Нормоксия**		***Ex vivo* гипоксия, 1% O_2**		**p**
	ВУ[1] (n=7)	**НУ[2] (n=15)**	**ВУ[3] (n=7)**	**НУ[4] (n=15)**	
Фагоцитарная активность моноцитов, %	12,2 (5,9-15,1)	12,8 (6,8-21,1)	15,2 (8,5-22,7)	13,9 (12,9-20,9)	$0,52^{1-2}$; $0,48^{1-3}$ $0,40^{2-4}$; $0,66^{3-4}$

3.9.2. Спонтанная и стимулированная гипоксией продукция цитокинов клетками крови до определения устойчивости животных к гипоксии

В экспериментальных исследованиях используют моделирование гипоксического воздействия на клетки в условиях *ex vivo* (Kaur et al., 2023). Уровни кислорода, используемые в гипоксических камерах для клеточных линий, варьируют от 0,2% до 5% O_2. Гипоксическая камера обеспечивает контролируемую среду, которая позволяет определить влияние определенных уровней кислорода на клетки. Эта автономная и герметичная камера, предназначенная для использования внутри существующих лабораторных инкубаторов, помогает поддерживать гипоксическую среду с контролируемым уровнем кислорода и стабильной температурой. Гипоксические условия достигаются с помощью специальной газовой смеси, состоящей из 1, 5 или 10% O_2, 5% углекислого газа и остального – азота (Wu и Yotnda, 2011). Преимущество использования гипоксической камеры состоит в том, что в ней воспроизводятся естественные условия, вызывающие реакцию клеток на гипоксию, и контролируется процент O_2 в воздухе, окружающем клетки (Rinderknecht et al., 2021).

Мы провели исследование у интактных животных до разделения их на ВУ и НУ спонтанной и стимулированной гипоксией продукции цитокинов клетками крови путем инкубации в гипоксической камере и в CO_2-инкубаторе. После воздействия *ex vivo* 1% O_2 показано, что как у ВУ, так и у НУ крыс Вистар увеличивалась продукция IL-1β по сравнению с условиями нормоксии, а продукция TGF-β не изменялась. Различий между ВУ и НУ животными по продукции IL-1β и TGF-β выявлено не было (табл. 3.9.2). Таким образом, данные показатели не подходят в качестве биомаркеров для определения устойчивости организма к гипоксии.

Таблица 3.9.2

Продукция IL-1β и TGF-β клетками периферической крови в условиях нормоксии и после *ex vivo* гипоксического воздействия у ВУ и НУ крыс Вистар до определения устойчивости к недостатку кислорода в барокамере, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Группы наблюдения / **Параметры**	**Нормоксия**		***Ex vivo* гипоксия, 1% O_2**		**p**
	ВУ[1] (n=13)	**НУ[2] (n=9)**	**ВУ[3] (n=13)**	**НУ[4] (n=9)**	
IL-1β, пг/мл	13,0 (6,9-16,5)	8,5 (7,5-10,0)	18,0 (13,3-20,5)	13,8 (12,1-18,9)	$0,17^{1-2}$; $\mathbf{0,02}^{1-3}$ $\mathbf{0,0001}^{2-4}$; $0,33^{3-4}$
TGF-β, пг/мл	1,6 (1,3-3,5)	0,9 (0,7-2,3)	1,3 (0,97-2,2)	1,8 (1,2-2,4)	$0,18^{1-2}$; $0,32^{1-3}$ $0,23^{2-4}$; $0,40^{3-4}$

3.9.3. Спонтанная и стимулированная провоспалительными стимулами продукция цитокинов клетками крови до определения устойчивости животных к гипоксии

Еще одним подходом для выявления биомаркеров устойчивости к гипоксии может быть индукция провоспалительными стимулами в условиях *ex vivo* продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, так как ранее нами показано (Dzhalilova et al., 2019a), что в ответ на введение ЛПС у НУ крыс наблюдается более выраженный СВО, который сопровождается повышением содержания IL-1β в сыворотке крови.

Для выявления биомаркеров устойчивости к гипоксии до воздействия на животных в барокамере, исследовали спонтанную и стимулированную комплексным митогеном продукцию цитокинов клетками крови *ex vivo*.

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. В частности, спонтанная продукция IL-6 была выше у НУ крыс Вистар в 2,1 раза, IL-10 – в 5 раз, а TNF-α – в 5,5 раз по сравнению с ВУ (табл. 3.9.3 Приложения 9, рис. 3.9.2).

Так как согласно данным, полученным в 3.8, мы выявили увеличение продукции IL-1β после стимуляции комплексным митогеном только у НУ крыс Вистар после воздействия в барокамере, мы исследовали этот показатель у интактных животных и затем определяли у них устойчивость к гипоксии. После стимуляции клеток крови ЛПС, ФГА и КонА, продукция IL-1β клетками крови увеличивалась только у НУ крыс в 2,8 раза (табл. 3.9.4 Приложения 9, рис. 3.9.3).

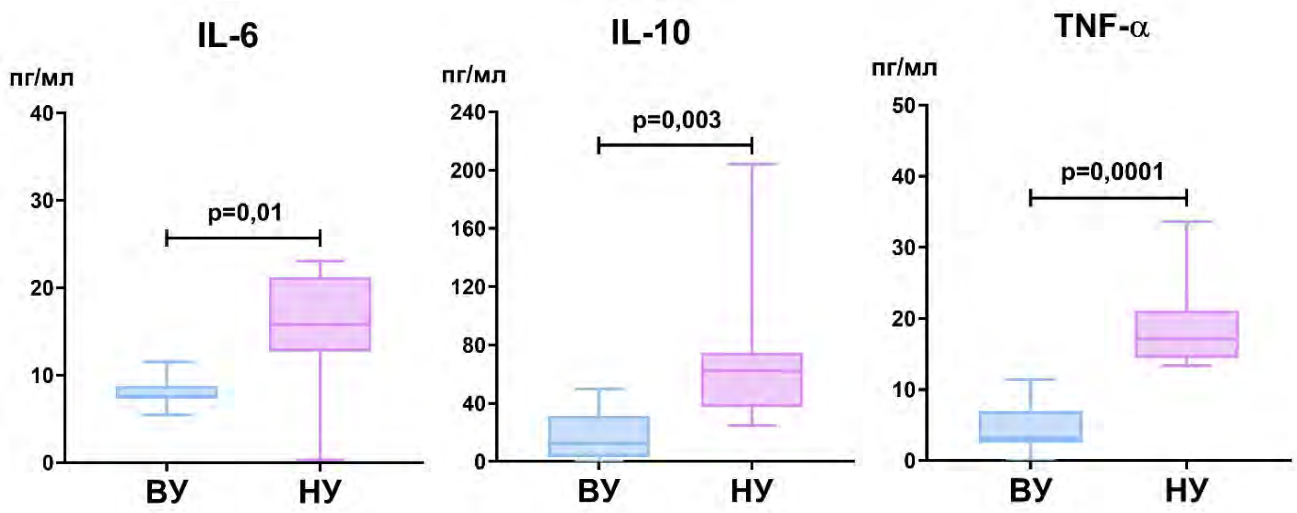


Рис. 3.9.2. Спонтанная продукция цитокинов клетками периферической крови при инкубации в течение 24 ч *ex vivo* у ВУ и НУ крыс Вистар до определения устойчивости к недостатку кислорода в барокамере, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

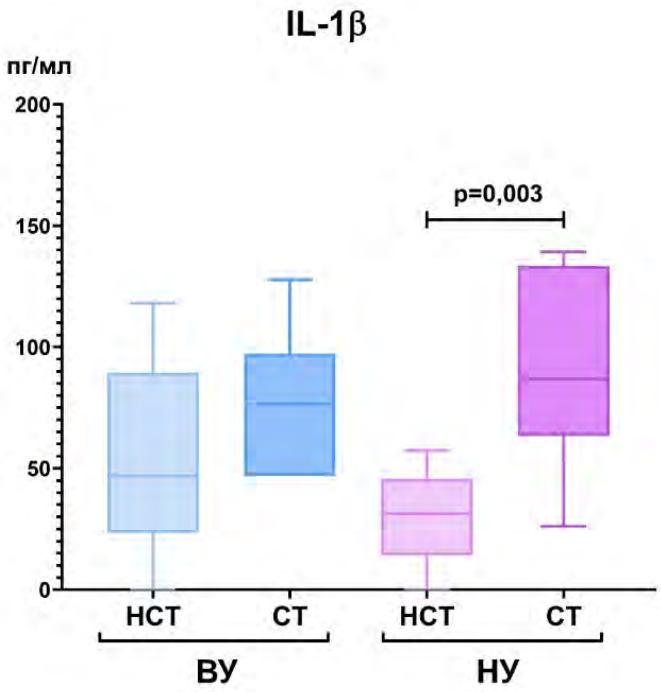


Рис. 3.9.3. Нестимулированная (НСТ) и стимулированная (СТ) комплексным митогеном (ЛПС, ФГА и КонА) в течение 24 ч *ex vivo* продукция провоспалительного цитокина IL-1β клетками периферической крови у ВУ и НУ крыс Вистар до определения устойчивости к недостатку кислорода в барокамере, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Заключение и обсуждение к 3.9

Таким образом, нами показано, что фагоцитарная активность моноцитов не различается у животных с разной устойчивостью к гипоксии до воздействия в барокамере. После воздействия *ex vivo* 1% O_2 показано, что как у ВУ, так и у НУ животных увеличивалась продукция IL-1β по

сравнению с условиями нормоксии, а продукция TGF-β не изменялась. Однако различий между ВУ и НУ животными по продукции IL-1β и TGF-β выявлено не было. Подходом для разработки лабораторных способов оценки устойчивости организма к гипоксии без воздействия в барокамере может быть индукция провоспалительными стимулами продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в условиях *ex vivo*. Нами 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. Кроме того, после стимуляции клеток крови комплексным митогеном – ЛПС, ФГА и КонА, продукция IL-1β клетками крови увеличивалась только у НУ крыс.

По данным проведенных нами исследований установлено, что в популяции как мышей C57Bl/6, так и крыс Вистар можно выделить НУ животных, которые характеризуются провоспалительным фенотипом и более тяжелым течением воспалительных и опухолевых заболеваний. Известно также, что 1-2% людей являются крайне чувствительными к недостатку кислорода (Караш и соавт., 1988). Ранее нами показано (Dzhalilova et al., 2019a), что в ответ на введение ЛПС у НУ крыс наблюдается более тяжелое течение СВО, который сопровождается повышением содержания IL-1β в сыворотке крови. Выраженность СВО при развитии опухолей значительно варьирует у пациентов (Dolan и McMillan, 2020). В литературе пока не представлены конкретные биомаркеры, позволяющие охарактеризовать биологические процессы, лежащие в основе индивидуальных особенностей развития ассоциированного с опухолевой прогрессией СВО, однако выявлено большое количество биомаркеров сепсиса, коррелирующих с исходом заболевания у пациентов отделений интенсивной терапии (Barichello et al., 2022; Xue et al., 2022). К этим биомаркерам относят около 1000 молекул, среди которых наиболее часто выделяют прокальцитонин, СРБ, эндотоксин, пресепсин, IL-6 и другие, содержание которых изменяется при развитии сепсиса и септического шока. Однако на ранних этапах развития синдрома СВО, до появления его клинических симптомов, они не позволяют предсказать риск развития инфекционных и воспалительных осложнений. Следует отметить, что тяжесть течения, исходы заболевания и вероятность присоединения вторичных инфекций даже в однородной популяции лиц одного возраста и пола различаются (Mayr et al., 2014; Hancock и соавт., 2025). Возможно, эти различия может определять индивидуальная устойчивость к недостатку кислорода, которая в настоящее время не учитывается при проведении терапии. Кроме того, в связи с гетерогенностью пациентов, различиями по полу и возрасту, наличию сопутствующих заболеваний, а также особенностями проводимой терапии эти биомаркеры, даже при оценке их динамики, недостаточно информативны. В нашей лаборатории показано, что пациенты, имеющие высокий риск развития послеоперационных инфекционно-воспалительных

осложнений, характеризуются высоким содержанием белка HIF-1α в сыворотке крови до операции, а также через 24 и 72 ч после нее и высоким уровнем экспрессии *HIF1A* в лейкоцитах через 72 ч после оперативного вмешательства (Силина и соавт., 2024). Поэтому как для людей, так и для экспериментальных животных актуальным остается определение индивидуальной устойчивости к гипоксии.

В настоящее время отсутствуют стандартизованные способы оценки устойчивости к недостатку кислорода экспериментальных животных и людей без гипоксического воздействия. В связи с тем, что чувствительность к дефициту O_2 определяет физиологические реакции и адаптивные процессы, и, очевидно, особенности течения ряда заболеваний, поиск маркеров для скрининга организмов по устойчивости к гипоксии без помещения в барокамеру или в условия гор, является актуальной задачей. Определение молекул, обеспечивающих устойчивость или чувствительность к стрессовым факторам, таким как гипоксия, будет играть важную роль в оценке адаптационных возможностей, вероятности развития послеоперационных осложнений и выживаемости людей в неблагоприятных условиях, включая космические полеты. Поэтому поиск молекулярно-биологических маркеров, позволяющих выявить людей с различной устойчивостью к дефициту кислорода в условиях нормоксии или при умеренном гипоксическом воздействии, несомненно, является целесообразным.

Нами показано, что до определения устойчивости к гипоксии фагоцитарная активность моноцитов периферической крови не различалась у животных с разной устойчивостью к недостатку кислорода. Однако через один месяц после гипоксического воздействия в барокамере фагоцитарная активность моноцитов в ответ на гипоксию как in vivo, так и ex vivo была выше у ВУ крыс по сравнению с НУ. Показано, что у здоровых волонтеров, подвергавшихся двухчасовой нормобарической гипоксии (12% O_2) *in vivo*, усиливался хемотаксис нейтрофилов, фагоцитоз и продукция АФК (Wang и Liu, 2009). Кроме того, при воздействии гипоксии, эквивалентной высоте 5500 м, в клетках периферической крови здоровых людей повышалась активность факторов HIF-1α и NF-κB (Fritzenwanger et al., 2011). Показано, что кратковременное (в течение 2 ч) воздействие системной гипоксии (5500 м) на организм здоровых добровольцев увеличивает фагоцитарную активность нейтрофилов, но не моноцитов (Fritzenwanger et al., 2011). Однако в данной работе не учитывали индивидуальную устойчивость к гипоксии, а в исследования включали и мужчин, и женщин. Позднее было показано, что *in vitro* воздействие гипоксии (0,5-3% O_2) в течение суток не влияет на фагоцитарную активность нейтрофилов здоровых добровольцев (Talla et al., 2019). При этом повышение фагоцитарной активности моноцитов в условиях гипоксии показано многими исследователями (Anand et al., 2007; Martins et al., 2020). Также показано, что гипоксия влияет на MDSCs у мышей (Xu et al., 2024). Тем не менее, в данных работах не учитывалась индивидуальная устойчивость организма к гипоксии.

Вероятно, выявленные нами различия фагоцитарной активности моноцитов у ВУ и НУ животных обусловлены гипоксическим воздействием на критической «высоте», хотя срок в один месяц после определения устойчивости к гипоксии по данным литературы считается достаточным для проведения последующих экспериментов. Показано, что гипоксическое воздействие может оказывать отсроченный эффект на клетки иммунной системы, в частности, вызывать формирование тренированного иммунитета (McGettrick и O'Neill, 2020). Таким образом, исследование фагоцитарной активности моноцитов в условиях нормоксии и *ex vivo* гипоксии не может использоваться для определения устойчивости организмов к гипоксии без воздействия недостатка кислорода в условиях барокамеры.

Нами показано, что гипоксическое воздействие ex vivo, при котором используются более низкие концентрации кислорода, оказывает более выраженный эффект на фагоцитарную активность моноцитов крови по сравнению с in vivo и позволяет избежать острого гипоксического воздействия на организм. Выраженный эффект гипоксического воздействия *ex vivo*, вероятно, обусловлен более низкими концентрациями O_2, а также отсутствием адаптационных изменений со стороны всего организма, таких как выброс гормонов, активация системы антиоксидантной защиты и т.д. Использование *ex vivo* гипоксического воздействия на клетки крови может быть перспективным методом для определения устойчивости организма к недостатку O_2. Следовательно, при поиске маркеров устойчивости к гипоксии целесообразно использовать моделирование воздействия недостатка кислорода на клетки крови *ex vivo*.

После воздействия ex vivo 1% O_2 нами показано, что как у ВУ, так и у НУ животных до определения устойчивости к гипоксии в барокамере увеличивалась продукция IL-1β по сравнению с условиями нормоксии, а продукция TGF-β не изменялась. Различий продукции IL-1β и TGF-β клетками крови у ВУ и НУ животных в условиях ex vivo гипоксии в течение 1 ч до определения устойчивости к гипоксии в барокамере выявлено не было. Следовательно, оценка данных показателей не может использоваться в качестве лабораторного способа определения устойчивости организма к гипоксии.

C.G. Julian и соавт. (2011) показали, что после 4 и 9 ч воздействия моделируемой в декомпрессионной камере «высоты» 4875 м у устойчивых к острой горной болезни людей в крови наблюдался более высокий уровень IL-1RA – агониста рецептора интерлейкина-1 (InterLeukin-1 Receptor Agonist). После 4 ч воздействия гипоксии MIP-1 (Macrophage Inflammatory Protein-1) был выше у чувствительных к острой горной болезни людей по сравнению с устойчивыми. Такие биомаркеры как IL-6, IL-8, IL-10, VEGF, TNF-α, MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) и матриксная металлопротеиназа MMP9 не различались в периферической крови у устойчивых и чувствительных к острой горной болезни людей (Julian et al., 2011).

По данным литературы кратковременное (до 4 сут) пребывание животных и человека в условиях гипоксии (на высоте более 3400 м над уровнем моря) приводит к увеличению в сыворотке крови содержания маркеров воспаления – IL-6 и С-реактивного белка (Klausen et al., 1997; Hartmann et al., 2000). Кроме того, ранее нами показано (Dzhalilova et al., 2019a), что в ответ на введение ЛПС у НУ крыс наблюдается более выраженный СВО, который сопровождается повышением содержания IL-1β в сыворотке крови. Поэтому мы исследовали спонтанную и стимулированную продукцию провоспалительных и противовоспалительных цитокинов клетками крови *ex vivo* в качестве потенциальных биомаркеров для определения устойчивости к гипоксии без воздействия в барокамере.

Нами показано, что спонтанная продукция провоспалительных цитокинов IL-6 и TNF-α, а также противовоспалительного цитокина IL-10 при инкубации в условиях нормоксии в течение 24 ч ex vivo была выше у НУ животных до определения устойчивости к гипоксии в барокамере. Повышенная продукция этих цитокинов у НУ крыс может быть обусловлена их провоспалительным фенотипом, что согласуется с данными, представленными выше, о том, что у НУ крыс Вистар неактивированные макрофаги характеризуются повышенной экспрессией *Tnfa* и *Il1b* по сравнению с ВУ животными (Dzhalilova et al., 2023в). Недавно установлено, что IL-2, IL-17A и TNF-α могут быть использованы в качестве потенциальных биомаркеров чувствительности к развитию острой горной болезни на высотах 3700 м и 5000 м (Guo et al., 2024).

Содержание цитокинов в сыворотке или плазме крови отражает функциональное состояние иммунной системы, тогда как в ситуациях, сопряженных с дефицитом или дисбалансом регуляторных факторов, необходимо оценить способность клеток крови к секреции цитокинов. При этом спонтанная продукция цитокинов свидетельствует о том, насколько клетки крови уже активированы *in vivo*, а митогениндуцированная — позволяет оценить потенциальную способность к секреции цитокинов в ответ на дополнительный стимул, что важно для оценки функционального состояния иммунной системы (Дружинина и соавт., 2009). Использование цельной крови в данном случае имеет ряд преимуществ, поскольку не требует выделения и подготовки клеток к культивированию, что упрощает проведение анализа и устраняет вероятность нежелательной активации или повреждения клеток при подготовке проб. Кроме того, культивирование клеток крови происходит в условиях естественного микроокружения, при сохранении баланса всех гуморальных факторов, действующих *in vivo* (Савилова и соавт., 2013). И хотя по мнению большинства исследователей эти методы должны занять центральное место в современной иммунодиагностике, в настоящее время ввиду существенных различий результатов разных лабораторий очень трудно, а иногда и невозможно корректно оценить нарушение цитокинового профиля в каждом конкретном клиническом случае. В настоящее время широкое

распространение получил метод оценки способности клеток крови к секреции цитокинов *ex vivo* (Дружинина и соавт., 2009). Например, стимуляция ЛПС клеток крови *ex vivo* является перспективным подходом для исследования иммунных реакций и приводит к продукции IL-1β (Tran et al., 2019; Chick et al., 2024; Müller et al., 2024).

Нами показано, что до определения устойчивости крыс Вистар к гипоксии в барокамере стимуляция клеток крови комплексным митогеном (ЛПС, ФГА и КонА) ex vivo способствует увеличению продукции IL-1β только у НУ крыс по сравнению со спонтанной продукцией. Таким образом, до определения устойчивости животных к гипоксии в барокамере нами показано (Джалилова и соавт., 2024б, в, Dzhalilova et al., 2024д), что спонтанная продукция *ex vivo* клетками крови провоспалительных цитокинов IL-6 и TNF-α, а также противовоспалительного IL-10 была выше у НУ крыс Вистар. Кроме того, после стимуляции клеток крови комплексным митогеном (ЛПС, ФГА и КонА) продукция IL-1β увеличивалась только у НУ крыс. Это позволяет рассматривать данные показатели и подход *ex vivo* оценки продукции цитокинов клетками крови в качестве потенциальных биомаркеров устойчивости к гипоксии, которые в перспективе могут использоваться для определения индивидуальной устойчивости организма к недостатку кислорода без сублетальной гипоксической нагрузки в барокамере.

Глава 4. ОБЩЕЕ ОБСУЖДЕНИЕ

Организмы человека и лабораторных животных отличаются по устойчивости к гипоксии, т.е. гипоксическое воздействие одной и той же степени тяжести вызывает разные реакции у особей одной популяции, одного возраста и пола (Jain et al., 2013; Kirova et al., 2013; Dzhalilova и Makarova, 2020; Glazachev et al., 2020; Kurhaluk, 2023; Mallet et al., 2023; Post et al., 2024). ВУ и НУ животные 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; Dzhalilova et al., 2019a; Kurhaluk, 2023). Известно, что HIF участвует в регуляции множества генов, ответственных за различные процессы в организме, в том числе воспалительные и опухолевые (Wicks и Semenza, 2022; Semenza, 2023). При развитии опухолей наблюдается активация HIF-1α и фактора, регулирующего воспалительный ответ – NF-κB, что способствует экспрессии одних и тех же генов-мишеней, регулирующих изменения метаболизма, ангиогенез, аутофагию, клеточный цикл, апоптоз, миграцию, инвазию и метастазирование (Semenza, 2010; Murata, 2018; Greten и Grivennikov, 2019; Turizo-Smith et al., 2024). В процессах инициации и прогрессии опухолей на молекулярно-биологическом уровне ключевую роль играют взаимосвязанные между собой гипоксия, воспалительный и иммунный ответы, однако механизмы этой взаимосвязи недостаточно изучены. Вероятно, различия в индивидуальной устойчивости организма к гипоксии и активности HIF могут определять темпы инициации и прогрессии опухолей и ассоциированного с их развитием воспалительного ответа. Очевидно, что более высокая исходная активность HIF-1α у НУ организмов может влиять как на процессы воспаления, так и онкогенеза, а также на эффективность терапии различных видов злокачественных опухолей. Несмотря на ведущую роль гипоксии практически на всех этапах опухолевого процесса, индивидуальная исходная устойчивость организма к недостатку кислорода до сих пор не рассматривалась в качестве фактора, влияющего на процессы инициации и прогрессии опухолей.

В литературе представлено множество работ, в которых охарактеризован уровень локальной гипоксии в различных опухолях, и предлагаются принципиальные подходы к ее нивелированию путем ингибирования HIF (Fallah и Rini, 2019; Semenza, 2019; Della Rocca et al., 2022; Luo et al., 2022; Qannita et al., 2024). Однако ингибиторы HIF, как правило, оказывают системное действие на организм, кроме того, при их применении не учитывается исходная устойчивость организма к гипоксии, а также исходный уровень активности HIF. Различная предрасположенность людей к развитию опухолей разных типов может быть обусловлена не только внешними и генетическими факторами, возрастом, полом, но и определяться

индивидуальной устойчивостью к гипоксии и уровнем экспрессии различных регулирующих ответ на гипоксию генов.

В литературе отсутствуют данные о механизмах взаимосвязи исходной устойчивости организма к гипоксии, воспаления, инициации и прогрессии опухолей. Поэтому целью работы было установить клеточные и молекулярно-биологические механизмы взаимосвязи исходной устойчивости к гипоксии, воспаления, инициации и прогрессии опухолей.

В работе выполнен комплекс исследований, позволивший установить зависимость темпов опухолевого процесса и выраженности связанного с ним системного воспаления от индивидуальной устойчивости организма к гипоксии.

Из данных литературы известно, что организмы различаются по устойчивости к гипоксии, однако, как правило, обсуждаются только половозрелые животные. Прежде чем исследовать особенности опухолевого процесса в зависимости от устойчивости к гипоксии, была проведена сравнительная оценка устойчивости к гипоксии и содержания HIF-1α, а также провоспалительных и противовоспалительных молекул у животных разного возраста. Нами впервые показано, что исходная устойчивость к гипоксии самцов крыс Вистар, а также содержание HIF-1α зависят от возраста, при этом различия между ВУ и НУ животными наиболее выражены в половозрелом периоде. По сравнению с новорожденными и половозрелыми животные препубертатного периода наименее устойчивы к гипоксии и характеризуются наименьшим содержанием фактора, индуцируемого гипоксией – HIF-1α в сыворотке крови. При этом уровень экспрессии гена *Hif1a* в печени у них был выше по сравнению с половозрелыми животными. По сравнению с новорожденными крысами в печени относительное содержание белка PHD2 у препубертатных было ниже, а белка HIF-1α – не различалось, и было ниже, чем у половозрелых животных. По-видимому, у препубертатных животных в регуляции деградации субъединицы HIF-1α доминирующую роль играют дополнительные механизмы, не связанные с активностью пролилгидроксилаз, например, KLF2 и RACK1, которые влияют на взаимодействие HIF-1α с шапероном HSP90 и способствуют разрушению HIF-1α в протеасоме (Liu et al., 2007; Kawanami et al., 2009). Для выявления конкретных механизмов регуляции HIF-1α у препубертатных животных необходимо проведение дальнейших исследований.

Выявлен высокий уровень экспрессии гена *Hif1a* в печени у новорожденных крыс, но низкое содержание белка HIF-1α, что связано с его деградацией из-за высокого содержания пролилгидроксилазы PHD2. Низкий уровень экспрессии гена *Hif1a* в печени у половозрелых животных, низкое содержание пролилгидроксилазы PHD2, но высокое содержание белка HIF-1α, связаны с высокой продукцией АФК и провоспалительных цитокинов – TNF-α и IFN-γ, что подтверждает роль HIF-1α в регуляции баланса провоспалительных и противовоспалительных

реакций у половозрелых животных. Полученные данные необходимо учитывать при проведении экспериментальных исследований с использованием животных разного возраста.

Вопрос об изменении функционирования HIF и PHD с возрастом активно обсуждается в современной литературе, посвященной их роли в развитии нейродегенеративных и опухолевых заболеваний (Galkin et al., 2024). Представлены данные как об увеличении, так и о снижении уровней экспрессии гена и содержания белка HIF-1α с возрастом (Kang et al., 2005; Ndubuizu et al., 2009). Противоречивость данных может быть связана с различиями в исходной устойчивости организма к гипоксии, которая не учитывалась при проведении этих исследований. Нами показано, что при оценке устойчивости к гипоксии на «высоте» 11 500 м в барокамере среди новорожденных и препубертатных животных не удается выявить особей, чье «время жизни» на «высоте» различается как минимум в три раза. Однако внутри групп половозрелых и старых самцов крыс Вистар на «высоте» 11 500 м можно выделить ВУ и НУ. Эти особенности сопряжены с различиями в экспрессии *Hif1a* и *Vegf* в печени в условиях нормоксии в половозрелом периоде между животными с разной устойчивостью к гипоксии – у НУ животных их уровень экспрессии выше. С возрастом эти показатели изменяются у ВУ и НУ крыс неодинаково, в частности, у ВУ уровень экспрессии *Hif1a* и *Vegf* в печени увеличивается, а у НУ – не изменяется, что может вносить вклад в дальнейшие исследования. Различия экспрессии *Hif1a* и *Vegf* у ВУ и НУ у старых животных не выражены, более того, с возрастом увеличивается уровень окислительного стресса и развивается инфламэйджинг, который может влиять на результаты исследований развития опухолевого процесса. Поэтому исследование механизмов опухолевого роста в зависимости от исходной устойчивости к гипоксии целесообразно проводить у половозрелых животных. В нашей работе были использованы самцы, так как эстральный цикл у самок также может вносить вклад в механизмы опухолевой прогрессии (Sharpe et al., 2021), а животные разного пола отличаются по устойчивости к гипоксии – у самок она выше (Косырева и соавт., 2019, 2024).

Наиболее широко используемой и высоковоспроизводимой моделью злокачественного опухолевого процесса на фоне хронического воспаления является модель колит-ассоциированного КРР у мышей (Li et al., 2022; Dzhalilova et al., 2023г). Перед исследованием взаимосвязи инициации и прогрессии опухолевого процесса и устойчивости к гипоксии была проведена оценка тяжести течения острого и хронического ЯК, которые являются факторами риска развития КРР, у ВУ и НУ мышей. Нами показано, что острый колит по сравнению с ВУ у НУ мышей характеризовался более выраженными клиническими проявлениями, большей тяжестью язвенно-воспалительного процесса в ободочной кишке и развитием транзиторного вторичного иммунодефицита (Джалилова и соавт., 2018а). Кроме того, по сравнению с ВУ НУ мыши характеризовались более тяжелым течением хронического колита: высокой гибелью

животных, более выраженными клиническими проявлениями, снижением массы тела, большей распространенностью воспалительного инфильтрата в проксимальном отделе ободочной кишки, а также развитием компенсированного вторичного иммунодефицита (Джалилова и соавт., 2018б). При хроническом колите у ВУ животных выявлен дисбаланс субпопуляций Т-лимфоцитов. Полученные данные необходимо учитывать при изучении механизмов ЯК у человека и разработке новых подходов к диагностике и персонализированному лечению этого заболевания.

Впервые показано, что ВУ и НУ животные в норме характеризуются молекулярно-биологическими особенностями эпителиального барьера ободочной кишки. 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 различия в тяжести течения острого и хронического ЯК, а также колит-ассоциированного КРР (рис. 4.1). Нормальная эпителиальная ткань существует в состоянии гомеостаза, где регенерация регулируется эпителиальными стволовыми клетками, расположенными в зоне дна крипт. При повреждении тканей восполнение потери эпителиальных клеток обеспечивается пролиферацией этих стволовых клеток в ответ на провоспалительные цитокины и факторы роста (Eming et al., 2007). Пролиферация и миграция клеток – два ключевых процесса, необходимых для заживления ран и прогрессии опухолей, – активируются путем EGFR. Молекулы, участвующие как в заживлении ран, так и в онкогенезе, включают EGF, VEGF, TGF-β, HGF/c-Met, FGF и др. (Sundaram et al., 2018). Нами выявлены различия в экспрессии генов *Cldn2, Cldn7, Muc1* и *Muc13* в ободочной кишке в норме у ВУ и НУ мышей. Низкая экспрессия *Cldn7* у НУ мышей может обусловливать высокую проницаемость эпителиального барьера и чувствительность к развитию колита и КРР (Wang et al., 2021). Напротив, высокая экспрессия *Cldn2* в контрольной группе у НУ мышей, который в норме способствует заживлению слизистой оболочки кишки и регенерации крипт (Ahmad et al., 2023), может приводить к избыточной регенерации крипт и предрасположенности к развитию КРР. Более высокая экспрессия *Muc1, Muc13* и *Cldn7* в контрольной группе у ВУ мышей по сравнению с НУ, очевидно, обеспечивает защиту эпителиальных клеток от воспалительных факторов, таких как ДСН.

На локальном уровне молекулярно-биологические особенности функционирования клеток кишечного эпителия (рис. 4.1) могут определять его проницаемость, а также темпы инициации КРР. На системном уровне нарушение проницаемости эпителиального барьера может определять уровень эндотоксина (ЛПС), поступающего в кровоток (Trivedi и Jena, 2012). Воздействие ЛПС может способствовать формированию провоспалительного фенотипа иммунных клеток у НУ организмов, который, в свою очередь, определяет тяжесть течения СВО при прогрессии опухолей, в том числе глиобластомы и карциномы легких.

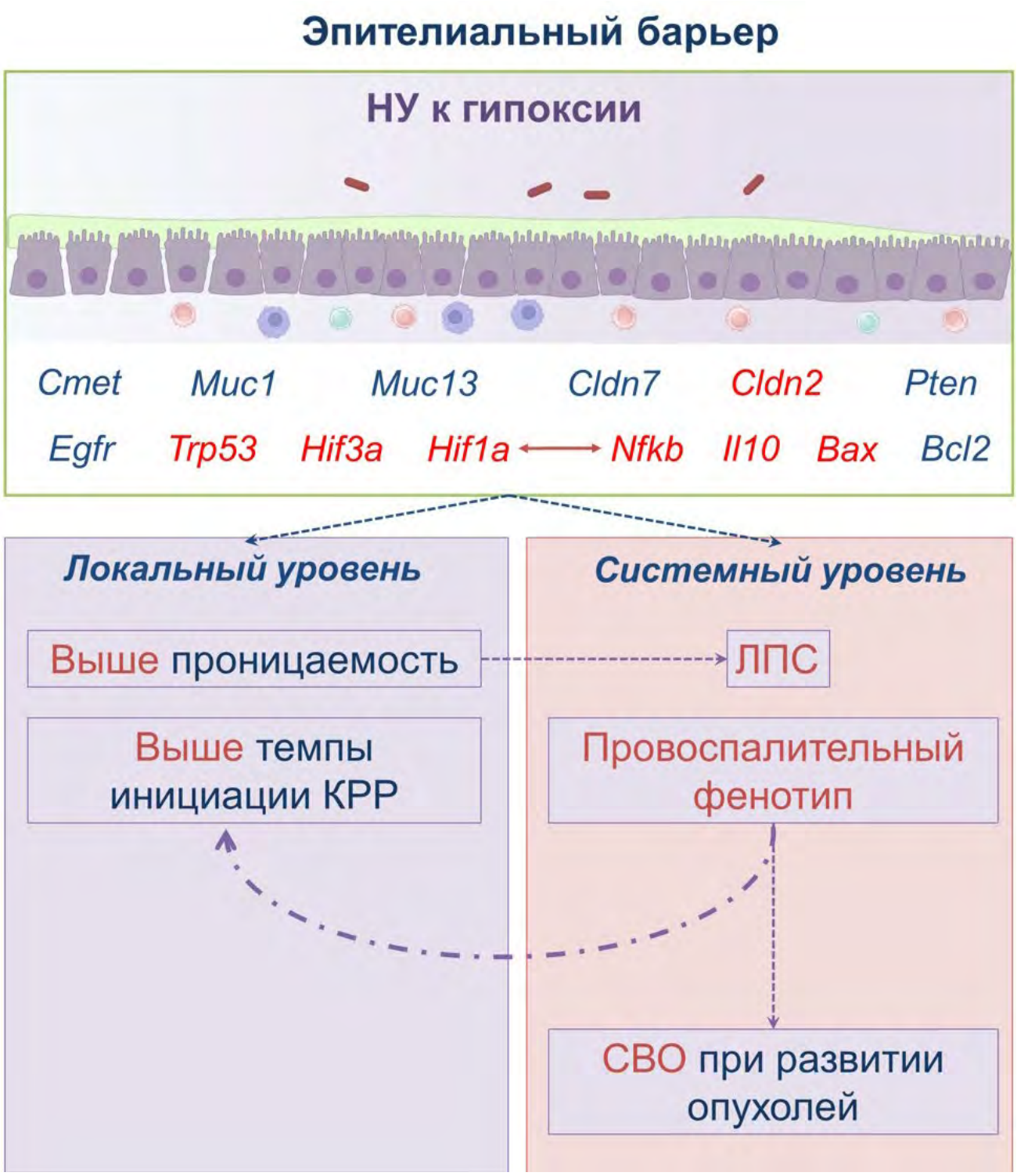


Рис. 4.1. Схема предполагаемых механизмов взаимосвязи индивидуальной устойчивости к гипоксии и связанных с ней особенностей эпителиального барьера кишки с процессами онкогенеза и воспаления

В дистальном отделе ободочной кишки у НУ мышей контрольной группы по сравнению с ВУ были выше уровни экспрессии генов *Nfkb* и *Il10*, а также *Hif1a* и *Hif3a*. Вероятно, более высокая экспрессия *Nfkb* у НУ животных контрольной группы связана с высоким уровнем экспрессии *Hif1a* по сравнению с ВУ. Исходно высокий уровень экспрессии *Nfkb* и *Hif1a,* и

«провоспалительный фон» могут обусловливать быструю прогрессию опухолей, так как показано, что развитие опухолей во многом зависит от активации HIF-1α и NF-κB (Rastogi et al., 2023).

Нами впервые показано, что инициация и прогрессия опухолей зависят от устойчивости организма к гипоксии (рис. 4.2). Темпы инициации и прогрессии колит-ассоциированного КРР по сравнению с ВУ животными у НУ выше – у них большая частота развития опухолей и показатели их площади. Все опухоли у НУ животных представлены более поздней стадией прогрессии – аденокарциномами, в то время как у ВУ преимущественно железистой интраэпителиальной неоплазией (Dzhalilova et al., 2024a).

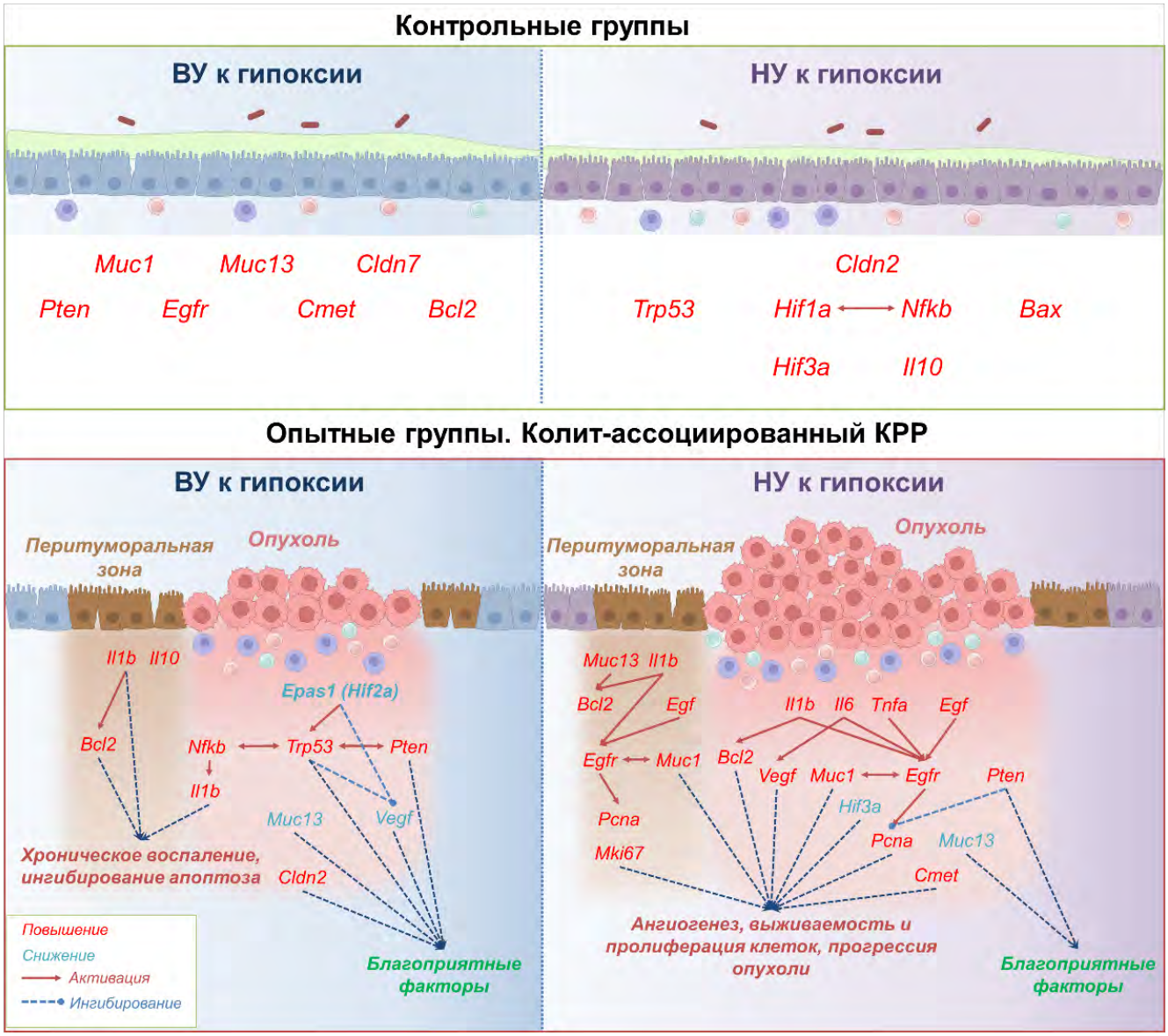


Рис. 4.2. Механизмы развития колит-ассоциированного КРР у ВУ и НУ животных

При прогрессии колит-ассоциированного КРР в тканях опухоли у ВУ мышей по сравнению с контрольной группой снижаются уровни экспрессии генов *Epas1 (Hif2a)* и *Vegf*, что по данным литературы способствует гибели опухолевых клеток и активации p53 (Bertout et al., 2009). У ВУ

мышей в опухолях повышалась экспрессия обоих опухолевых супрессоров – и *Trp53*, и *Pten*, что замедляет темпы инициации и прогрессии КРР.

По данным морфологического исследования у ВУ мышей опухолевый процесс в ободочной кишке находится на начальных этапах. В ткани опухолей у ВУ животных выявлена высокая экспрессия *Nfkb* и *Il1b*, сопровождаемая высокой экспрессией *Il1b, Il10* и *Tgfb* в перитуморальной зоне. Известно, что экспрессия провоспалительных и противовоспалительных цитокинов зависит от активации NF-κB (Liu et al., 2017) и наблюдается на ранних этапах развития опухоли на фоне хронического воспаления (Rastogi et al., 2023). В опухолях у ВУ мышей наблюдалось увеличение экспрессии *Cldn2*, сопровождающееся низкой экспрессией *Muc13* по сравнению с контрольной группой. С использованием модели АОМ и ДСН у мышей показано, что повышенное содержание CLDN2 взаимосвязано с регенерацией эпителия крипт и препятствует развитию КРР (Ahmad et al., 2023).

В опухолях ободочной кишки у НУ мышей по сравнению с ВУ наблюдается более высокая экспрессия генов, регулирующих пролиферацию опухолевых клеток, ангиогенез и апоптоз – *Hif3a, Vegf, Cmet, Egf, Egfr, Bax, Muc1* и *Cldn7*, что свидетельствует о более поздней стадии прогрессии опухоли и подтверждается данными морфологического исследования. Высокое содержание VEGF коррелирует с увеличением количества микрососудов в опухолях толстой кишки и ассоциируется с прогрессией опухоли, метастазированием, неблагоприятным прогнозом и низкой выживаемостью пациентов (Balasubramanian et al., 2022). У НУ животных в опухолях была выше экспрессия *Egf, Egfr* и *Cmet,* а в перитуморальной зоне выявлена более высокая экспрессия *Egf* по сравнению с опытной группой ВУ особей, что может быть связано с активной пролиферацией опухолевых клеток и, соответственно, более поздней стадией развития опухоли. При связывании EGF с EGFR в клетках запускаются сигнальные каскады (PI3K/AKT/mTOR, MAPK и др.), приводящие к пролиферации, миграции и ингибированию p53 (Ghosh et al., 2010; Abraham и O'Neill, 2014; Stefani et al., 2021). По-видимому, в опухолях и перитуморальной зоне у НУ мышей за счет повышения экспрессии *Egf, Egfr* и *Cmet* активируется PI3K/AKT/mTOR сигнальный путь, регулирующий пролиферацию клеток, выживаемость, способность к миграции и др. (Hervieu и Kermorgant, 2018). Уровень экспрессии гена *Muc1* повышался у НУ мышей как в опухолях, так и в перитуморальной зоне по сравнению с контрольной группой, и в опухолях был выше по сравнению с ВУ животными. На нескольких опухолевых клеточных линиях показано, что EGFR активирует MUC1 (Dharmaraj et al., 2013), а MUC1 в свою очередь активирует EGFR (Engel et al., 2016). MUC1 взаимодействует с EGFR на клеточной мембране, с одной стороны индуцируя его активацию, а с другой активируя PI3K/AKT/mTOR путь, что было показано на клеточных линиях рака молочной железы человека (Kufe, 2013; Piyush et al., 2017). Высокая

экспрессия *Muc1* в процессе роста опухоли связана с усилением ее инвазии и метастазирования (Pinzón Martín et al., 2019; Szlendak et al., 2020).

Выявленные различия в темпах прогрессии опухолей связаны с несколькими факторами. По данным литературы устойчивость к гипоксии коррелирует с общей физической активностью, стрессоустойчивостью, функциональным состоянием иммунной системы и др. (Безруков и соавт., 2012). Кроме того, ВУ и НУ животные характеризуются различиями в структурной организации и функциональной активности митохондрий в клетках коры головного мозга, печени и сердца (Pavlik et al., 2018; Mironova et al., 2019). Выявленные особенности митохондрий указывают на большую активность дыхательной цепи у ВУ животных по сравнению с НУ, и предполагается, что энергетический обмен является одним из факторов, определяющих индивидуальную устойчивость к гипоксии и связанную с ней тяжесть течения различных заболеваний. Вероятно, что защитные механизмы, включая большую активность ферментов антиоксидантной защиты, белков теплового шока и эффективный иммунный ответ, у ВУ животных способствуют замедлению роста опухоли на фоне хронического воспаления.

Кроме того, промоция и прогрессия опухолей у ВУ и НУ животных могут зависеть от функционального состояния иммунной системы. Ранее нами показано, что реакции клеточного и врожденного иммунитета были более выражены у ВУ крыс, а гуморального – у НУ (Dzhalilova et al., 2019б). В опухолях развиваются воспалительные и иммунные реакции, сопровождающиеся системными проявлениями, которые могут быть выражены в разной степени, оказывать влияние на прогрессию опухолей и определять прогноз заболевания (Diakos et al., 2014). В развитии опухолей ключевую роль играют реакции иммунной системы и активация противоопухолевого иммунитета. 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 СВО и активации реакций как врожденного иммунитета, так и гуморального звена адаптивного иммунитета (Nost et al., 2021; Graham et al., 2024). В целом, функциональная активация иммунной системы при развитии КРР более выражена у НУ мышей, и она сочетается с СВО. Это необходимо учитывать при разработке новых персонализированных подходов к иммунотерапии КРР (Dzhalilova et al., 2025б).

В настоящее время в соответствии с последними рекомендациями контрольные колоноскопии у пациентов с ВЗК обычно проводят через 8-10 лет после постановки диагноза или появления симптомов ЯК. Однако наблюдение должно быть персонализировано с учетом факторов риска развития КРР, таких как возраст на момент постановки диагноза, длительность заболевания и тяжесть ЯК (Yamamoto-Furusho и Gutierrez-Herrera, 2025). По нашим данным одним из факторов возникновения КРР на фоне хронического колита может быть

индивидуальная устойчивость организма к гипоксии. Следовательно, необходимо своевременное выявление НУ организмов, что предполагает разработку новых подходов к диспансеризации и ведению лечения пациентов с учетом индивидуальной устойчивости к недостатку кислорода. Кроме того, полученные нами данные необходимо учитывать при проведении экспериментальных исследований на модели с использованием АОМ и ДСН, и при тестировании эффективности различных противовоспалительных и противоопухолевых препаратов на животных.

Модель колит-ассоциированного КРР наиболее релевантна для оценки инициации и начальных этапов прогрессии опухолей. При этом поскольку нами выявлены реакции на опухолевую прогрессию на системном уровне, для оценки более поздних стадий прогрессии опухолей и выраженности СВО исследование было проведено на моделях глиобластомы и карциномы легких – опухолей с высоким злокачественным потенциалом и скоростью прогрессии.

На модели трансплантированной в головной мозг глиобластомы 101.8 нами показано (Dzhalilova et al., 2023a), что связанный с опухолями СВО более выражен у НУ животных, и он обусловливает их гибель, несмотря на то, что объем опухолей и пролиферативная активность опухолевых клеток выше у ВУ крыс. СВО при прогрессии глиобластомы характеризовался высокой продукцией провоспалительных цитокинов – IL-1β и TNF-α на 15-е сут эксперимента только у НУ животных. Известно, что увеличение продукции этих цитокинов при прогрессии глиобластомы коррелирует с ее агрессивностью и неблагоприятным прогнозом (Yeung et al., 2013; Hwang et al., 2016). Повышенные уровни TNF-α и IL-1β в сыворотке крови у пациентов с опухолями головного мозга связаны с неблагоприятным прогнозом (Shamsdin et al., 2019). Установлено, что в физиологических условиях продолжительность жизни ВУ крыс на 15% выше, чем 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 СВО при развитии опухолей (Jain et al., 2013; Dzhalilova и Makarova, 2020).

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 клеток перевиваемой опухоли – карциномы легких Льюис, которая при подкожной трансплантации характеризуется высокой воспроизводимостью метастазирования в легкие (Janker et al., 2018; Skurikhin et al., 2022). На данной модели также выявлен более выраженный СВО при прогрессии опухоли у НУ мышей – у них повышалась экспрессия *Hif1a, Nfkb* и *Tnfa* в

печени, а также индекс SIRI, несмотря на то, что размер опухолей и площадь метастазов у мышей с разной устойчивостью к недостатку кислорода не различались, а пролиферативная активность опухолевых клеток была выше у ВУ животных. В последние годы активно разрабатываются подходы к терапии злокачественных опухолей противовоспалительными препаратами, а в качестве прогностического фактора используется индекс SIRI (Xie et al., 2025; Yang et al., 2025). Противовоспалительные препараты в качестве противоопухолевых средств имеют уникальные преимущества благодаря относительно меньшему количеству побочных эффектов при длительном применении по сравнению с химиотерапевтическими препаратами. Однако поскольку выраженность СВО при опухолевой прогрессии, согласно полученным в работе данным, зависит от индивидуальной устойчивости организма к гипоксии, эффективность противовоспалительных препаратов для терапии опухолей может варьировать, следовательно, при их применении необходимо определение устойчивости пациентов к недостатку кислорода.

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 СВО (рис. 4.3). Исследованные нами опухоли имели разный гистогенетический тип, следовательно, не локализация опухоли является определяющим фактором, а исходная устойчивость всего организма к гипоксии. При разработке подходов к персонализированной терапии опухолей необходимо учитывать устойчивость организма к гипоксии, особенно на ранних этапах опухолевого процесса. На более поздних этапах прогрессии опухолей необходимо учитывать индивидуальную устойчивость организма к гипоксии с целью коррекции ассоциированного с опухолевой прогрессией СВО. Для повышения эффективности терапии злокачественных опухолей необходима разработка комбинированных подходов, включающих как противоопухолевые, так и противовоспалительные средства, в сочетании с оценкой индивидуальной устойчивости организма к гипоксии.

Рис. 4.3. Клеточные и молекулярно-биологические механизмы взаимосвязи прогрессии опухолей и воспалительного ответа у ВУ и НУ животных

В работе у ВУ и НУ животных были впервые выявлены различия тяжести течения СВО при прогрессии опухолей – КРР, глиобластомы и карциномы легких Льюис, а также провоспалительный фенотип эпителиальных клеток ободочной кишки у НУ мышей контрольной группы. Вероятно, связанный с индивидуальной устойчивостью к гипоксии провоспалительный фенотип клеток во многом определяет темпы инициации и прогрессии опухолей. Поэтому задачей следующей части работы было оценить баланс провоспалительных и противовоспалительных реакций у животных с разной устойчивостью к гипоксии. Ключевую роль как в воспалительных, так и в опухолевых процессах играют макрофаги – клетки врожденного иммунитета, которые выполняют иммунорегуляторную и фагоцитарную функции (Ельчанинов и Фатхудинов, 2023). Нами показано, что у ВУ животных при КРР повышалось относительное число моноцитов в крови, а у НУ снижалось относительное число макрофагов в БЛУ. При прогрессии карциномы легких только у НУ животных повышалось относительное число моноцитов в крови. Вероятно, молекулярно-биологические и функциональные особенности макрофагов во многом определяют прогрессию опухолей у ВУ и НУ животных.

Нами впервые установлено, что существуют особенности иммунофенотипа и функциональных свойств макрофагов в зависимости от устойчивости организма к гипоксии. Экспрессия гена *Hif1a* в неактивированных макрофагах у ВУ и НУ крыс не различалась, а экспрессия *Epas1 (Hif2a)* была выше в неактивированных макрофагах у НУ животных по сравнению с ВУ. В неактивированных макрофагах ВУ крыс Вистар по сравнению с НУ выше экспрессия гена и содержание белка VEGF, в то время как у НУ выше экспрессия генов *Il1b* и *Tnfa*. По данным литературы высокий уровень продукции IL-6, TNF-α и iNOS свидетельствует о дифференцировке моноцитов по провоспалительному фенотипу (Askenase et al., 2015; Nakanishi et al., 2018).

На воздействие ЛПС макрофаги животных с разной устойчивостью к гипоксии реагировали увеличением экспрессии генов, регулирующих воспалительные реакции – *Il1b*, *Il6*, *Nos2*, *Tgfb*, *Il10,* а также ответ на гипоксию – *Hif1a*. Тем не менее, только у ВУ крыс в активированных макрофагах по сравнению с неактивированными увеличивается экспрессия генов *Tnfa* и *Mmp9*, в то время как у НУ животных повышается экспрессия гена *Vegf* и содержание белка HGF. HGF – фактор, индуцирующий направленную миграцию и дифференцировку моноцитов, содержание его рецептора c-MET в неактивированных макрофагах низкое, и увеличивается после стимуляции ЛПС и IFN-γ (Galimi et al., 2001; Nishikoba et al., 2020). Известно, что активация HGF-MET играет важную роль при прогрессии опухолей – способствует ангиогенезу, миграции клеток и инвазии (Yao et al., 2024).

Другой важный результат, полученный в ходе исследования, это то, что при воздействии ЛПС макрофаги ВУ и НУ крыс также различаются между собой (Dzhalilova et al., 2023в): у НУ

крыс выше содержание CCR7, являющегося маркером провоспалительного фенотипа макрофагов (Van Raemdonck et al., 2020), и экспрессия гена и белка HIF-1α по сравнению с ВУ. Более значительное увеличение содержания белка HIF-1α в культуральной жидкости активированных ЛПС макрофагов у НУ крыс, вероятно, обусловливает повышение экспрессии зависимого гена ангиогенеза *Vegf*. Кроме того, увеличение содержания белка HIF-1α у НУ животных свидетельствует об их высокой провоспалительной активности, так как HIF-1α способствует переключению метаболизма с окислительного фосфорилирования на гликолиз, и обусловливает повышение экспрессии генов провоспалительных цитокинов (Tannahill et al., 2013; Wang et al., 2017).

Таким образом, выявленные в зависимости от индивидуальной устойчивости к гипоксии особенности развития колит-ассоциированного КРР, прогрессии глиобластомы и карциномы легких могут быть во многом обусловлены особенностями функционального состояния иммунной системы, в частности, макрофагов. Полученные данные послужат основой для разработки новых подходов к терапии опухолевых заболеваний с учетом индивидуальной устойчивости к гипоксии, в том числе основанных на клеточной терапии с использованием репрограммированных макрофагов.

Активация клеток крови *ex vivo* является перспективным подходом для оценки воспалительных и иммунных реакций и воспроизводит условия, наиболее близкие к условиям *in vivo* (Müller et al., 2024). Фагоцитарная активность моноцитов периферической крови, которая является интегративным показателем их функционального состояния, в условиях нормоксии не различалась у ВУ и НУ крыс, а после *in vivo* и *ex vivo* гипоксического воздействия была выше у ВУ животных по сравнению с НУ. Функциональная активность моноцитов во многом определяется активацией фактора HIF-1α, который способствует переключению метаболизма с окислительного фосфорилирования на гликолиз и обусловливает повышение экспрессии генов провоспалительных цитокинов и фагоцитарной активности (Anand et al., 2007; McGettrick и O'Neill, 2020). Ранее нами было показано, что после острого гипоксического воздействия содержание HIF-1α в сыворотке крови и его экспрессия в печени выше у ВУ крыс по сравнению с НУ, что обеспечивает адаптацию к недостатку кислорода (Dzhalilova et al., 2018). Очевидно, у ВУ крыс в условиях гипоксии в моноцитах происходит более выраженная активация HIF-1α, что обусловливает повышение их фагоцитарной активности и ускорение метаболизма глюкозы (Anand et al., 2007). Различия в фагоцитарной активности моноцитов периферической крови после гипоксического воздействия могут определять тяжесть течения СВО, а также опухолевых процессов, в которых ключевую роль играют макрофаги (Han et al., 2016; Zhou et al., 2021). Следует отметить, что более выраженная активация HIF-1α при воздействии ЛПС на макрофаги наблюдалась у НУ животных. Таким образом, функциональная активность макрофагов у ВУ и

НУ животных может различаться в зависимости от стимула – гипоксического или воспалительного. Это подтверждает данные литературы об эффекте активации HIF-1α в зависимости от типа стимула: условия активации HIF-1α (гипоксия или воспаление) напрямую влияют на эффект, который эта субъединица реализует. В условиях недостатка кислорода наблюдается усиление транскрипции генов, отвечающих за адаптацию организма к гипоксии, а при воспалении – генов, регулирующих воспалительные реакции (Jantsch et al., 2011).

Исходно провоспалительный фенотип макрофагов, а также б*о*льшая активация экспрессии *Hif1a* и связанных с ним молекул, обеспечивающих воспалительный ответ, в макрофагах у НУ животных в ответ на флогогенный стимул приводит к более тяжелому воспалительному ответу и, вероятно, высоким темпам инициации и прогрессии опухолевого процесса на фоне хронического воспаления, что показано на модели КРР. При этом у ВУ животных в ответ на воспалительный стимул активация макрофагов не столь выражена, а в ответ на гипоксическое воздействие увеличивается фагоцитарная активность моноцитов, что может обеспечивать активацию противоопухолевого иммунитета на начальных стадиях развития опухолей и способствовать более медленным темпам прогрессии колит-ассоциированного КРР.

В целом, в контексте данных по реакции на гипоксию, воспаление и онкогенез у НУ животных более выражена воспалительная компонента, а у ВУ – ответ на гипоксию. Эти различия во многом обусловливают особенности инициации и прогрессии опухолевого процесса. Можно предположить, что у ВУ животных в ответ на гипоксию, которая развивается как на фоне воспаления, так и опухолевого процесса, включаются защитные и адаптивные механизмы, например, антиоксидантная система и активация клеточного иммунитета, что обеспечивает протективный эффект как в отношении хронического воспалительного процесса, так и в отношении инициации и прогрессии опухолей. В то же время у НУ животных эти адаптивные механизмы несовершенны, что обусловливает неэффективный ответ, избыточную активацию клеток иммунной системы, и приводит к более тяжелому течению воспалительных процессов и на их фоне к быстрым темпам прогрессии опухолей.

Выявленный провоспалительный фенотип клеток иммунной системы, а также особенности функциональных свойств макрофагов позволили предположить, что уровень продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов может быть исходно разным у ВУ и НУ животных до определения устойчивости к гипоксии в барокамере. Это может быть связано с различным функциональным состоянием эпителиального барьера ободочной кишки, которое во многом определяется устойчивостью к гипоксии, а также составом микробиоты. ЛПС является одним из основных факторов, вызывающих развитие СВО, так как поступает в кровоток при повышении проницаемости эпителиального барьера кишки. Исследование микробиоты кишки у ВУ и НУ животных не являлось целью данной работы, но может быть перспективным для

коррекции эпителиального барьера, например, за счет применения биодобавок, в состав которых входит, например, *Akkermansia muciniphila* (Jin et al., 2025).

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*, ФГА и КонА продукции цитокинов клетками крови *ex vivo* через один месяц после определения устойчивости к гипоксии в барокамере. Комплекс активаторов содержит факторы, стимулирующие продукцию цитокинов основными популяциями лейкоцитов крови (Дружинина и соавт., 2009; Kosyreva et al., 2023). Показано, что только у НУ крыс при стимуляции клеток крови повышалось содержание IL-1β в культуральной жидкости (Kosyreva et al., 2023).

Так как мы выявили провоспалительный фенотип макрофагов и повышенную продукцию IL-1β клетками крови в ответ на стимуляцию комплексным митогеном у НУ животных, дальнейшей задачей работы было определить, является ли эта особенность предсуществующей или это следствие гипоксического воздействия в барокамере на критической «высоте».

В отличие от ВУ у НУ крыс Вистар по сравнению с исходными значениями через один месяц после сублетального гипоксического воздействия наблюдается сочетание снижения продукции противовоспалительного цитокина IL-10 и повышения продукции IL-1β клетками крови при воздействии как гипоксического, так и воспалительного стимулов, что свидетельствует о провоспалительном фенотипе этих животных (Dzhalilova et al., 2025a). Выявленные изменения продукции цитокинов клетками крови в условиях гипоксии и при стимуляции комплексным митогеном после определения устойчивости к недостатку кислорода в барокамере могут быть связаны с активацией тренированного иммунитета. Тренированный иммунитет – это вызванное контактами с PAMPs и/или DAMPs изменение функционирования клеток врожденного иммунитета при повторном взаимодействии с широким спектром патогенов и факторов (Netea et al., 2020). Вероятно, при гипоксическом воздействии в барокамере на критической «высоте» в результате повреждения клеток образуются DAMPs, что приводит к реализации реакций тренированного иммунитета, который может сохраняться длительное время – более чем один месяц (Netea et al., 2020). При этом у НУ животных наблюдается дисбаланс продукции провоспалительного цитокина IL-1β, уровень которого повышается, и противовоспалительного цитокина IL-10, продукция которого снижается.

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. Кроме того, воздействие на организм человека гипоксии, соответствующей высоте в несколько тысяч метров

(например, у профессиональных спортсменов – 6400 м, а также меньших высот при проведении гипокситерапии), может приводить к активации провоспалительных реакций и нежелательным побочным эффектам у людей с низкой устойчивостью к недостатку кислорода. Необходима разработка способов определения устойчивости к кислородной недостаточности без гипоксического воздействия. На основании выявленного провоспалительного фенотипа у НУ организмов мы предположили, что подходом для лабораторного определения устойчивости к гипоксии может быть оценка спонтанной и стимулированной продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в условиях *ex vivo*.

Показано, что спонтанная продукция провоспалительных цитокинов IL-6 и TNF-α, а также противовоспалительного IL-10 была выше у НУ животных до определения устойчивости к гипоксии в барокамере. Кроме того, после стимуляции клеток крови ЛПС, ФГА и КонА, продукция IL-1β клетками крови увеличивалась только у НУ крыс. На основе полученных данных о провоспалительном фенотипе у НУ животных разработан способ определения устойчивости организма к недостатку кислорода без гипоксического воздействия в барокамере (Джалилова и соавт., 2024б, в; Dzhalilova et al., 2024д).

Таким образом, в результате проведенного комплексного исследования на трех экспериментальных моделях впервые установлены особенности течения опухолевого процесса у животных с разной устойчивостью к гипоксии. ВУ и НУ животные различаются состоянием эпителиального барьера ободочной кишки, что определяет большую тяжесть острого и хронического колита у НУ животных и высокие темпы развития химически индуцируемых опухолей толстой кишки. Кроме того, ВУ и НУ животные различаются особенностями функционирования клеток иммунной системы, в частности, макрофагов и уровнями продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов. У ВУ животных темпы онкогенеза ниже, что во многом обусловлено активацией опухолевых супрессоров, высокой фагоцитарной активностью клеток врожденного иммунитета при гипоксическом воздействии. Показано, что у ВУ животных реакция на *in vivo* и *ex vivo* гипоксическое воздействие более выражена – у них выше фагоцитарная активность моноцитов. При этом у НУ крыс Вистар более выражена реакция макрофагов на воспалительные стимулы, такие как ЛПС – в активированных макрофагах экспрессия *Hif1a* увеличивается более значительно по сравнению с ВУ, а содержание HIF-1α в культуральной жидкости макрофагов повышается только у этих животных. Вероятно, у ВУ животных повышение фагоцитарной активности моноцитов в ответ на гипоксию обеспечивает адаптивную реакцию, и после прекращения воздействия быстро нивелируется адаптивными механизмами. В то время как у НУ животных исходный уровень экспрессии *Hif1a* выше, макрофаги имеют провоспалительный фенотип, а активация HIF-1α значительно выражена при

воспалении, что приводит к более тяжелому течению опухолевых процессов, особенно развившихся на фоне хронического воспаления.

Следует отметить, что выявленные различия молекулярно-биологических особенностей макрофагов, а также темпов инициации и прогрессии опухолей установлены через один месяц после определения устойчивости к гипоксии в барокамере. При этом показано, что в эти сроки продукция цитокинов IL-1β и IL-10 клетками крови у ВУ и НУ животных различается по сравнению с продукцией до определения устойчивости к гипоксии в барокамере. Это может свидетельствовать о том, что гипоксическое воздействие на критической «высоте» в барокамере оказывает повреждающий эффект, который приводит к продукции DAMPs и активации иммунной системы. Все это способствует формированию тренированного иммунитета, который в ответ на новый повторный стимул может оказывать как благоприятный эффект, так и негативный. Поэтому, вероятно, у ВУ и НУ животных эти реакции различаются. Изучение тренированного иммунитета началось чуть более 10 лет назад, поэтому данных о различиях реакций тренированного иммунитета между ВУ и НУ животными в литературе не представлено. Необходимо проведение дополнительных исследований в этой области.

В настоящее время для терапии опухолей активно разрабатываются новые лекарственные препараты – ингибиторы HIF, которые, как правило, оказывают системное действие на организм, кроме того, при их применении 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 к гипоксии в развитии опухолей и связанного с ними воспаления, и свидетельствуют о необходимости определения групп риска с неблагоприятным прогнозом, а также персонализированного применения ингибиторов HIF. В перспективе комбинированное применение ингибиторов HIF с хирургическими и медикаментозными подходами у пациентов с учетом их индивидуальной устойчивости к гипоксии может позволить улучшить прогноз опухолевых заболеваний.

Полученные данные по особенностям спонтанной и стимулированной продукции цитокинов могут быть использованы в качестве неинвазивных способов определения устойчивости к недостатку кислорода у людей без гипоксического воздействия в барокамере. Экстраполяция этих экспериментальных данных на человека позволит разработать методы оценки устойчивости к гипоксии без системного воздействия на организм недостатка кислорода и стратифицировать пациентов по устойчивости. Это необходимо для решения ряда важнейших проблем: персонализации профилактики и лечения опухолевых заболеваний, а также инфекционных и воспалительных осложнений при хирургических операциях, сопровождающихся кислородной недостаточностью.

Полученные нами приоритетные результаты расширяют представления о фундаментальных клеточных и молекулярно-биологических основах взаимосвязи устойчивости к гипоксии, воспаления и онкогенеза, а также имеют прикладное значение, так как они позволят разработать новые подходы к персонализированной профилактике и терапии злокачественных опухолей с учетом индивидуальной устойчивости к гипоксии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Организмы лабораторных животных и человека отличаются по устойчивости к недостатку кислорода, а также содержанию фактора, индуцируемого гипоксией – HIF-1α, 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 СВО от индивидуальной устойчивости организма к гипоксии (рис. 5.1). На экспериментальных моделях колит-ассоциированного КРР, 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 КРР 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 СВО. Таким образом, процессы инициации и прогрессии опухолей на фоне хронического воспаления при КРР у НУ животных происходят быстрее и сопровождаются более выраженными ассоциированными с опухолью СВО 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 СВО при прогрессии опухолей, в том числе глиобластомы и карциномы легких (рис. 5.1).

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 СВО. 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.

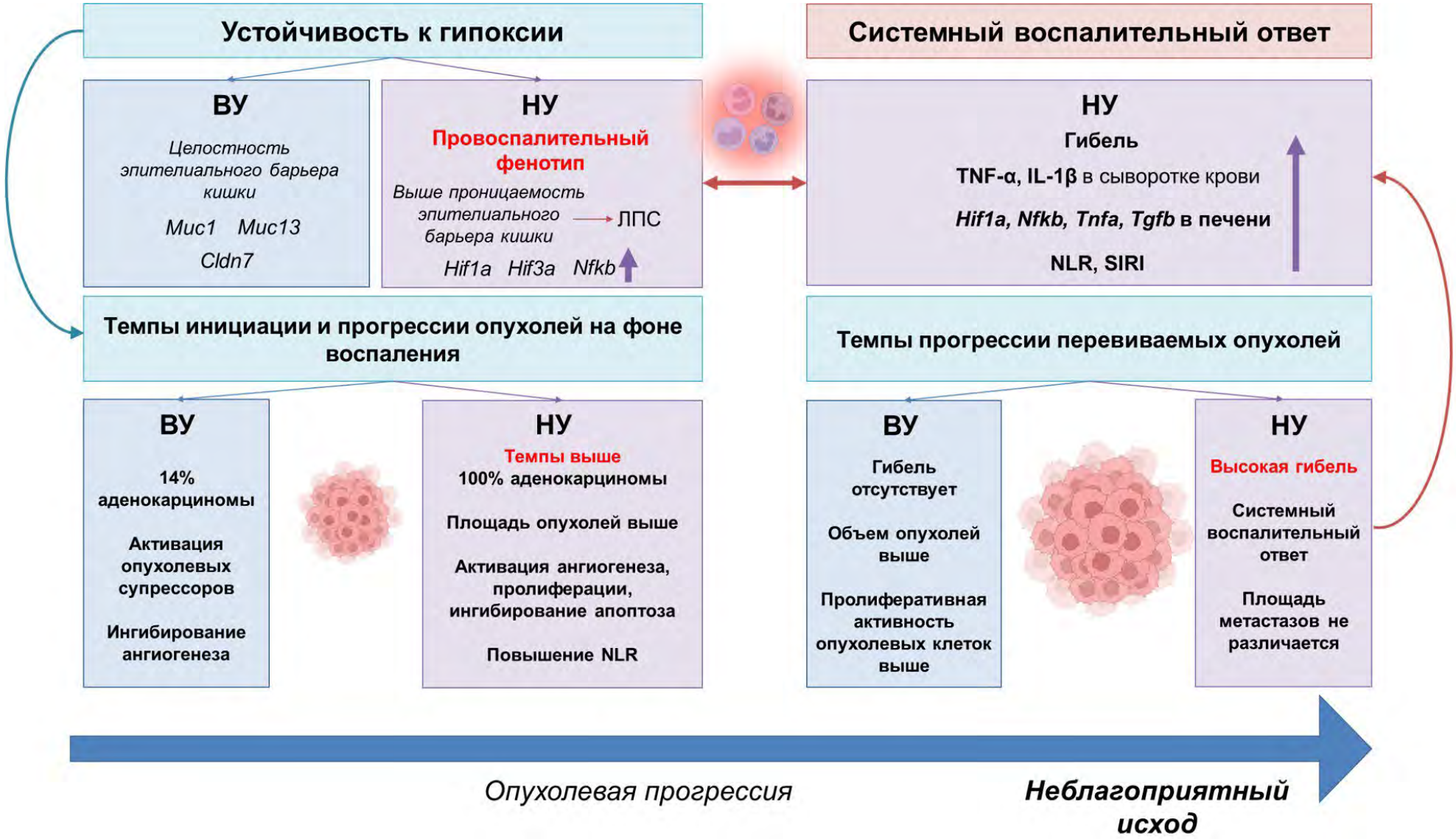


Рис. 5.1. Схема механизмов взаимосвязи устойчивости к гипоксии, опухолевого процесса и воспаления

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 PHD2, 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абазова З.Х. Клинико-патогенетическое значение взаимоотношений между иммунной и эндокринной системами при аутоиммунном тиреоидите. // Аллергология и иммунология. 2007. Т. 8. № 1. С. 212–218.
2. Абрашова Т.В. и др. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных. // СПБ.: Изд-во «ЛЕМА». 2013. 116 с.
3. Абдулаева С.О. и др. Сравнительная морфологическая, бактериологическая и иммунологическая характеристика индуцированного декстрансульфатом натрия острого язвенного колита у мышей BALB/c и C57Bl/6. // Клиническая и экспериментальная морфология. 2013. № 4. С. 27–33.
4. Автандилов Г.Г. Морфометрия в патологии. // М.: Медицина. 1973. 248 с.
5. Авцын А.П. Халанский А.С., Кондакова Л.И. Биологическая характеристика перевиваемой глиомы крысы штамма 101.8 // Сборник научных трудов. «Актуальные вопросы современной гистопатологии». М.: 1988. С. 45–46.
6. Авцын А.П., Кондакова Л.И., Халанский А.С. Биологические основы нейроонкологии // Вестник РАМН. 1993. №7. С. 51–54.
7. Агаджанян Н.А., Брагин Л.Х., Давыдов Г.А., Спасский Ю.А. Динамика внешнего дыхания и газообмена при комбинированном воздействии на организм гипоксии и гиперкапнии. // Физиология человека. 1984. Т. 10. № 4. С. 610–616.
8. Агаджанян Н.А., Хачатурьян М.Л., Панченко Л.А. Влияние острого гипоксического воздействия на устойчивость крыс к гипоксии. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1999. Т. 127. № 6. С. 625–628.
9. Безруков В.В. и др. Некоторые физиологические показатели и продолжительность жизни у крыс с различной устойчивостью к гипоксии. // Проблемы старения и долголетия. 2012. Т. 21. № 4. С. 431–443.
10. Березовский В.А. Гипоксия и индивидуальные особенности реактивности. // Киев: Наукова думка. 1978. 216 с.
11. Болотная Л.А., Сербина И.М. Паранеопластические дерматозы. // Международный медицинский журнал. 2008. № 3. С. 86–90.
12. Васильева С.В., Карпенко Л.Ю., Душенина О.А. Поиск оптимальных способов забора крови у лабораторных крыс в условиях хронического опыта. // Генетика и разведение животных. 2022. № 4. С. 56–60.
13. Венерин А.А. и др. Индивидуальная толерантность к гипоксии: индикаторы, прикладное значение и методы определения. // Вестник РУДН. Серия: Медицина. 2025. Т. 29. № 1. С. 57–72.
14. Воронин Р.М., Огородников В.И. Опыт использования пробы с задержкой дыхания в психологических исследованиях. // Прикладная юридическая психология. 2022. № 4. С. 84–92.
15. Газенко О.Г. Физиология человека в условиях высокогорья. // М.: Наука. 1987. 530 с.
16. Гаркави Л.Х. и др. Адаптационные реакции и резистентность организма. // Ростов-на-Дону: РГУ. 1990. 224 с.
17. Глазачев О.С. Клинические аспекты интервальной гипоксической тренировки при реабилитации стресс-индуцированных психосоматических нарушений. // Эмоциональный стресс: теоретические и клинические аспекты. / Под ред. К.В. Судакова, В.И. Петрова. Волгоград. 1997. С. 148–152.
18. Глазачев О.С., Крыжановская С.Ю. Адаптационная медицина: стратегия психофизиологического приспособления человека к критически измененной окружающей среде. // Вестник Международной академии наук. Русская секция. 2019.
19. Гланц С. Медико-биологическая статистика. // М.: Практика. 1998. 459 с.
20. Гольдерова А.С. и др. Особенности продукции цитокинов больных нестабильной стенокардией в зависимости от этнической принадлежности в Республике Саха (Якутия). // Мед. иммунол. 2012. Т. 14. № 1-2. С. 143–148.
21. Горанчук В.В., Сапова Н.И., Иванов А.О. Гипокситерапия. // СПб.: ЭЛБИ-СПб. 2003. 536 с.

22. Грачев А.Н. и др. Макрофаги, ассоциированные с опухолью: современное состояние исследований и перспективы клинического использования. // Успехи молекулярной онкологии. 2018. Т. 5. № 4. С. 20–28.
23. Грек О.Р., Ефремов А.В., Шарапов В.И. Гипобарическая гипоксия и метаболизм ксенобиотиков. // М.: ГЭОТАР-Медиа. 2007. 120 с.
24. Гржибовский А.М., Иванов С.В., Горбатова М.А. Сравнение количественных данных двух независимых выборок с использованием программного обеспечения Statistica и SPSS: параметрические и непараметрические критерии. // Наука и здравоохранение. 2016. № 2. С. 5–28.
25. Джалилова Д.Ш. и др. Зависимость устойчивости к гипоксии от фазы 4-суточного биоритма кортикостерона. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2017. Т. 163. № 5. С. 647–651.
26. Джалилова Д.Ш. и др. Морфологические изменения толстой кишки и состав лимфоцитов периферической крови при остром колите у мышей с разной устойчивостью к гипоксии. // Молекулярная медицина. 2018а. Т. 28. №6. С. 46–50.
27. Джалилова Д.Ш. и др. Морфологические особенности воспалительного процесса и субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови при хроническом колите у мышей с разной устойчивостью к гипоксии. // Клиническая и экспериментальная морфология. 2018б. №4. С. 13–19.
28. Джалилова Д.Ш. и др. Морфология печени и легких и фагоцитарная активность клеток периферической крови при системной воспалительной реакции у самцов крыс с разной устойчивостью к гипоксии. // Клиническая и экспериментальная морфология. 2019. Т. 29. № 1. С. 47–55.
29. Джалилова Д.Ш., Макарова О.В. Молекулярно-биологические механизмы взаимосвязи гипоксии, воспалительных и иммунных реакций. Обзор литературы. // Иммунология. 2019. Т. 40. № 5. С. 97–105.
30. Джалилова Д.Ш., Макарова О.В. Устойчивость к гипоксии и системный воспалительный ответ. // М.: Группа МДВ. 2022. 200 с.
31. 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. 2024а. Т. 27. № 3. С. 413–420.
32. Джалилова Д.Ш. и др. Способ определения низкой устойчивости к гипоксии лабораторных животных *in vitro* по уровню спонтанной и стимулированной продукции IL-1β клетками крови. // Патент РФ 2821643. 2024б. Опубл. 25.06.2024 Бюл. № 18.
33. Джалилова Д.Ш. и др. Способ определения устойчивости к гипоксии лабораторных животных по уровню продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов клетками крови. Патент РФ 2821545. 2024в. Опубл. 25.06.2024 Бюл. № 18.
34. 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.
35. Дмитриева Т.В. Влияние адаптации к периодической гипобарической гипоксической стимуляции на аллергическое воспаление при бронхиальной астме у детей. // Оренбург. 2006. 22 с.
36. Домбровская Ю.Ф. Клиника и патогенез гипоксемии растущего организма, Клинико-экспериментальные наблюдения. // М.: Медгиз. 1961. 255 с.
37. Дружинина Ю.Г. и др. Определение уровней спонтанной и митоген-индуцированной продукции цитокинов условно здоровых доноров *ex vivo*. // Мед. иммунол. 2009. Т. 11. № 4-5. С. 473.
38. Дудченко А.М. Лукьянова Л.Д. Параметры аденилатного пула как предикторы нарушений энергетического обмена в гепатоцитах при гипоксии. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2003. Т. 136. №7. С. 41–44.

39. Зиновьев Ю.В., Козлов С.А., Савельев О.Н. Резистентность к гипоксии. // Красноярск: Издательство Красноярского университета. 1988. 176 с.
40. Золотова Н.А., Макарова О.В. Эпителиальный барьер толстой кишки в норме и при язвенном колите. М.: Группа МДВ. 2020. 112 с.
41. Игнатенко Г.А., Дубовая А.В., Науменко Ю.В. Возможности применения нормобарической гипокситерапии в терапевтической и педиатрической практиках. // Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2022. Т. 67. № 6. С. 46–53.
42. Кадагидзе З.Г., Черткова А.И. Иммунная система и рак. // Практическая онкология. 2016. Т. 17. № 2. С. 62–73.
43. Капланский А.С. Антиинфекционная резистентность и иммунобиологическая реактивность организма при гипоксической гипоксии. // Космическая биология. 1971. Т. 5. № 1. С. 3–9.
44. Караш Ю.Ш., Стрелков Р.Б., Чижов А.Я. Нормобарическая гипоксия в лечение, профилактике и реабилитации. // М.: Медицина. 1988. 351 с.
45. Каркищенко Н.Н. Биомедицинское (доклиническое) изучение антигипоксической активности лекарственных средств. Методические рекомендации. // М.: ФМБА России. 2017. 98 с.
46. Кашин С.В. и др. Стандарты качественной колоноскопии. // Доказательная гастроэнтерология. 2019. Т. 8. № 1. С. 1–32.
47. Колчинская А.З. Недостаток кислорода и возраст. // Киев: Наукова Думка. 1964. 336 с.
48. Корнеев А.А., Комиссарова И.А., Нарциссов Я.Р. Использование глутатиона в качестве протекторного средства при гипоксическом воздействии. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1993. № 9. С. 261–263.
49. Косырева А.М. Половые и возрастные различия морфофункциональных изменений иммунной системы и воспалительного ответа при экспериментальной эндотоксинемии. Диссертация на соискание уч. ст. докт. биол. наук. 2018.
50. Косырева А.М., Джалилова Д.Ш., Макарова О.В., Сладкопевцев А.С. Морфофункциональные изменения тимуса и содержание субпопуляций лимфоцитов в крови у самок крыс Вистар с разной устойчивостью к гипоксии при системном воспалительном ответе. // Медицинская иммунология. 2019. Т. 21. № 4. С. 643–652.
51. Косырева А.М., Джалилова Д.Ш., Цветков И.С., Макарова О.В. Половые различия системного воспалительного ответа у низкоустойчивых к гипоксии крыс. // Морфология. 2024. Т. 162. № 3. С. 316–328.
52. Котеров А.Н. и др. Соотношение возрастов основных лабораторных животных (мышей, крыс, хомячков и собак) и человека: актуальность для проблемы возрастной радиочувствительности и анализ опубликованных данных. // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2018. Т. 63. № 1. С. 5–27.
53. Копнин Б.П. Основные свойства неопластической клетки и базовые механизмы их возникновения. // В кн.: Канцерогенез. Под. ред. Д.Г. Заридзе. М.: Медицина. 2004.
54. Логинова Е.Н. и др. Основы иммуноонкологии и иммунотерапии в онкологии. // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2022. Т. 205. № 9. С. 129–139.
55. Лукьянова Л.Д., Германова Э.Л., Копаладзе Р.А. Закономерности формирования резистентности организма при разных режимах гипоксического прекондиционирования: роль гипоксического периода и реоксигенации. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2009. Т. 147. № 4. С. 380–384.
56. Лукьянова Л.Д., Кирова Ю.И. Влияние гипоксического прекондиционирования на свободнорадикальные процессы в тканях крыс с различной толерантностью к гипоксии. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2011. Т. 151. № 3. С. 263–268.
57. Лукьянова Л.Д. Сигнальные механизмы гипоксии. // М.: РАН. 2019. 215 с.
58. Лушников Е.Ф., Абросимов А.Ю. Гибель клетки (апоптоз). // М.: Медицина. 2001. 189 с.
59. Максимов А.Л. Информативность температурных реакций кисти при воздействии на человека гипоксических факторов. // Физиология человека. 2005. Т. 31. № 3. С. 108–117.

60. Макарова О.В. и др. Морфофункциональные изменения иммунной системы мышей BALB/c и C57Bl/6 при хроническом бактериальном грамотрицательном эндотоксикозе. // Архив патологии. 2012. № 74(3). С. 43–48.
61. Малышев А.Л., Лукьянова Л.Д., Крапивин С.В. Действие гипоксии нарастающей тяжести на ЭЭГ коры головного мозга крыс с разной резистентностью к острому дефициту кислорода. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1996. № 7. С. 262–275.
62. Мастицкий С.Э. Методическое пособие по использованию программы STATISTICA при обработке данных биологических исследований. // Мн.: РУП «Институт рыбного хозяйства», 2009. – 76 с.
63. Меерсон Ф.З., Пшенникова М.Г. Адаптация к стрессорным и физическим нагрузкам. // М.: Медицина. 1988. 256 с.
64. Меерсон Ф.З. и др. Адаптация к периодической гипоксии в терапии и профилактике. // М.: Наука. 1989. 70 с.
65. Меерсон Ф.З. Адаптационная медицина: механизмы и защитные эффекты адаптации. // М.: Hypoxia Medical LTD. 1993. 331 с.
66. Мельник А.А. Гипоксией индуцированный фактор для лечения анемии при хронической болезни почек // Почки. 2018. Т. 7. № 4. С. 311–321.
67. Менчиков Л.Г., Шестов А.А., Попов А.В. Новый взгляд на эффект Варбурга: слияние классической биохимии и органической химии. Современное состояние и перспективы. // Успехи биологической химии. 2023. Т. 63. С. 3–40.
68. Мхитаров В.А. и др. Методика оценки объема экспериментальных опухолей с помощью 3D реконструирования. // Клиническая и экспериментальная морфология. 2015. № 4(16). С. 42–48.
69. Николаева А.Г. Использование адаптации к гипоксии в медицине и спорте. // Витебск: ВГМУ. 2015.
70. Новиков В.Е., Левченкова О.С. Возможности фармакологической регуляции HIF для коррекции опосредованных ими патологических состояний в клинической практике. // Вестник РАМН. 2024. Т. 79. № 3. С. 261–270.
71. Павлова В.Ю., Соколов С.В., Гайдай А.В. Паранеопластический синдром – прогностическая значимость. // Лечащий врач. 2020. № 4. С. 48.
72. Пшенникова М.Г. Феномен стресса. Эмоциональный стресс и его роль в патологии // Актуальные проблемы патофизиологии: Избранные лекции. // М.: Медицина. 2001. С. 220–353.
73. Пшенникова М.Г. Устойчивость к повреждающим воздействиям и защитные эффекты адаптации у животных разных генетических линий. // Патогенез. 2012. Т. 10. № 1. С. 20–26.
74. Рагозин О.Н., Пащенко И.Г., Балыкин М.В. Нормобарическая гипоксия в хронотерапии бронхиальной астмы. // Ульяновск, Стрежень. 2001. 100 с.
75. Рыбникова Е.А., Баранова К.А., Зенько М.Ю. Влияние интервальной гипоксии на экспрессию глюкокортикоидных рецепторов и гипоксия-индуцибельного фактора в мозге крыс. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2025. Т. 179. № 1. С. 113–117.
76. Савилова А.М., Чулкина М.М., Алексеев Л.П. Сравнительное исследование экспрессии мРНК интерлейкина-2 и рецептора интерлейкина-2α в лимфоцитах, активированных ФГА и КонА. // Иммунология. 2013. № 2. С. 76–80.
77. Сергеева Н.С. и др. Системная воспалительная реакция как фактор прогноза при раке молочной железы. Часть I. Опухоль-промотирующее воспаление. Сывороточные маркеры воспаления. // Вестник РАМН. 2022. Т. 77. №5. С. 345–353.
78. Середенко М.М. К вопросу о некоторых особенностях реакции старческого организма на острую гипоксию. // В кн.: «Кислородная недостаточность». К.: Издательство АН УССР. 1963.
79. Силина М.В., Джалилова Д.Ш., Диатроптова М.А., Гринь О.О., Бабаев М.А., Макарова О.В. Различия содержания белков HIF-1α и VNN1 в сыворотке крови и экспрессии *HIF1A* и *NFKB1* в лейкоцитах у пациентов кардиохирургического профиля с риском послеоперационных осложнений. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2024. Т. 178. № 12. С. 664–669.

80. Сиротинин Н.Н. Эволюция резистентности и реактивности организма. // М.: Медицина. 1981. 236 с.
81. Стрелков Р.Б., Чижов А.Я. Прерывистая нормобарическая гипоксия в профилактике, лечении и реабилитации. // Екатеринбург: Уральский рабочий. 2001. 400 с.
82. Фурсова Л.А., Лихачева Е.М. Паранеопластические спинальные синдромы (научный обзор и личное наблюдение). // Международный неврологический журнал. 2017. № 4. С. 69–76.
83. Халанский А.С., Кондакова Л.И. Перевиваемый штамм глиомы крысы 101.8. Биологическая характеристика. // Клиническая и экспериментальная морфология. 2013. № 4. С. 63–69.
84. Хочанский Д.Н., Макарова О.В., Буравков С.В., Черников В.П. Нейромышечный комплекс ободочной кишки в норме и при экспериментальном остром колите. // М.: Группа МДВ. 2020. 108 с.
85. Шустов Е.Б. и др. Экспрессия гипоксия-индуцибельного фактора HIF1α как критерий развития гипоксии тканей. // Биомедицина. 2015. № 4. С. 4–15.
86. Шутов Е.В., Горелова Е.Н., Сороколетов С.М. Ингибиторы пролилгидроксилазы индуцируемого гипоксией фактора в лечении анемии больных с хронической болезнью почек. // Эффективная фармакотерапия. 2022. Т. 18. № 3. С. 22–28.
87. Яблоновская Л.Я., Спрышкова Н.А. Морфологическая и биологическая характеристика экспериментальных опухолей мозжечка крыс. // Архив патологии. 1967. Т. 33. № 2. С. 50–53.
88. Abraham A.G., O'Neill E. PI3K/Akt-mediated regulation of p53 in cancer. // Biochem. Soc. Trans. 2014. Т. 42. № 4. С. 798–803.
89. Abramson J.L. и др. Association between novel oxidative stress markers and C-reactive protein among adults without clinical coronary heart disease. // Atherosclerosis. 2005. Т. 178. № 1. С. 115–121.
90. Abu El Maaty M.A. и др. Hypoxia-mediated stabilization of HIF1A in prostatic intraepithelial neoplasia promotes cell plasticity and malignant progression. // Sci. Adv. 2022. Т. 8. № 29. С. eabo2295.
91. Aceituno-Madera P. и др. Melanoma, altitude, and UV-B radiation. // Actas Dermosifiliogr. 2011. Т. 102. № 3. С. 199–205.
92. Adeberg S. и др. A comparison of long-term survivors and short-term survivors with glioblastoma, subventricular zone involvement: a predictive factor for survival? // Radiat. Oncol. 2014. Т. 9. С. 95.
93. Aguilar-Cazares D. и др. The systemic-level repercussions of cancer-associated inflammation mediators produced in the tumor microenvironment. // Front. Endocrinol. (Lausanne). 2022. Т. 13. С. 929572.
94. Ahlawat S. и др. Comprehensive evaluation and validation of optimal reference genes for normalization of qPCR data in different caprine tissues. // Mol. Biol. Rep. 2024. Т. 51. № 1. С. 268.
95. Ahmad R. и др. Claudin-2 protects against colitis-associated cancer by promoting colitis-associated mucosal healing. // J. Clin. Invest. 2023. Т. 133. № 23.
96. Ahn S.-I., Cho S., Choi N.-J. Effect of dietary probiotics on colon length in an inflammatory bowel disease-induced murine model: A meta-analysis. // J. Dairy Sci. 2020. Т. 103. № 2. С. 1807–1819.
97. Akhmetkaliyev A. и др. EMT/MET plasticity in cancer and Go-or-Grow decisions in quiescence: the two sides of the same coin? // Mol. Cancer. 2023. Т. 22. № 1. С. 90.
98. Albulescu R. и др. Cytokine patterns in brain tumour progression. // Mediators Inflamm. 2013. Т. 2013. С. 979748.
99. Alekseeva A.I. и др. Changes in Oncogene Expression in Experimental Glioblastoma 101.8 Rats during Therapy with PLGA Nanoparticles Loaded with Doxorubicin. // Bull. Exp. Biol. Med. 2023. Т. 174. № 4. С. 518–522.
100. Alekseeva T.M. и др. Hypercapnic hypoxia as a rehabilitation method for patients after ischemic stroke. // Neurol. Res. 2024. С. 1–11.
101. Alexandrova A.Y., Chikina A.S., Svitkina T.M. Actin cytoskeleton in mesenchymal-to-amoeboid transition of cancer cells. // Int. Rev. Cell Mol. Biol. 2020. Т. 356. С. 197–256.

102. Alkhaibary A. и др. Ki-67 labeling index in glioblastoma; does it really matter? // Hematol. Oncol. Stem Cell Ther. 2019. Т. 12. № 2. С. 82–88.
103. Allavena P. и др. The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. // Immunol. Rev. 2008. Т. 222. С. 155–161.
104. Allsopp G.L. и др. The effect of normobaric hypoxia on resistance training adaptations in older adults. // J. Strength Cond. Res. 2022. Т. 36. № 8. С. 2306–2312.
105. Almansour S. и др. Modelling the continuum of macrophage phenotypes and their role in inflammation. // Math. Biosci. 2024. Т. 377. С. 109289.
106. Alpuim Costa D. и др. Hyperbaric Oxygen Therapy as a Complementary Treatment in Glioblastoma-A Scoping Review. // Front. Neurol. 2022. Т. 13. С. 886603.
107. Amsel J. и др. Relationship of site-specific cancer mortality rates to altitude // Carcinogenesis. 1982. Т. 3. № 5. С. 461–465.
108. Anand R.J. и др. Hypoxia causes an increase in phagocytosis by macrophages in a HIF-1alpha-dependent manner. // J. Leukoc. Biol. 2007. Т. 82. № 5. С. 1257–1265.
109. Andersen S. и др. Overexpression of the HIF hydroxylases PHD1, PHD2, PHD3 and FIH are individually and collectively unfavorable prognosticators for NSCLC survival. // PLoS ONE. 2011. Т. 6. № 8. С. e23847.
110. Angelova M., Mascaux C., Galon J. Evasion before invasion: Pre-cancer immunosurveillance. // Oncoimmunology. 2021. Т. 10. № 1. С. 1912250.
111. Antoni L. и др. Intestinal barrier in inflammatory bowel disease. // World J. Gastroenterol. 2014. Т. 20. № 5. С. 1165–1179.
112. Antonica F. и др. Modeling Brain Tumors: A Perspective Overview of in vivo and Organoid Models. // Front. Mol. Neurosci. 2022. Т. 15. С. 818696.
113. Anwar F. и др. Nanomedicines: intervention in inflammatory pathways of cancer. // Inflammopharmacology. 2023. Т. 31. № 3. С. 1199–1221.
114. Appelhoff R.J. и др. Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. // J. Biol. Chem. 2004. Т. 279. № 37. С. 38458–38465.
115. Apte R.N. и др. The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. // Cancer Metastasis Rev. 2006. Т. 25. № 3. С. 387–408.
116. Aragonés J. и др. Oxygen sensors at the crossroad of metabolism. // Cell Metab. 2009. Т. 9. № 1. С. 11–22.
117. Aran D. и др. Comprehensive analysis of normal adjacent to tumor transcriptomes. // Nat. Commun. 2017. Т. 8. № 1. С. 1077.
118. Ardhini R., Tugasworo D. Epidemiology of primary brain tumors in dr. Kariadi Hospital Semarang in 2015-2018. // E3S Web of Conferences. 2019. Т. 125. С. 16004.
119. Armstrong G.R. и др. The utility of c-Met as a diagnostic tissue biomarker in primary colorectal cancer. // Int. J. Exp. Pathol. 2021. Т. 102. № 3. С. 172–178.
120. Arnaiz E., Harris A.L. Role of hypoxia in the interferon response. // Front. Immunol. 2022. Т. 13. С. 821816.
121. Arts R.J.W. и др. BCG Vaccination Protects against Experimental Viral Infection in Humans through the Induction of Cytokines Associated with Trained Immunity. // Cell Host Microbe. 2018. Т. 23. № 1. С. 89- 100.e5.
122. Askeland E.J. и др. Bladder cancer immunotherapy: BCG and beyond. // Adv. Urol. 2012. Т. 2012. С. 181987.
123. Askenase M.H. и др. Bone-Marrow-Resident NK Cells Prime Monocytes for Regulatory Function during Infection. // Immunity. 2015. Т. 42. № 6. С. 1130–1142.
124. Astrom K. и др. Altitude is a phenotypic modifier in hereditary paraganglioma type 1: evidence for an oxygen-sensing defect. // Hum. Genet. 2003. Т. 113. № 3. С. 228–237.
125. Avellanas Chavala M.L. A journey between high altitude hypoxia and critical patient hypoxia: What can it teach us about compression and the management of critical disease? // Med. Intensiva. 2018. Т. 42. № 6. С. 380–390.

126. Ayob A.Z., Ramasamy T.S. Cancer stem cells as key drivers of tumour progression. // J. Biomed. Sci. 2018. Т. 25. № 1. С. 20.
127. Azad P. и др. High-altitude adaptation in humans: from genomics to integrative physiology. // J. Mol. Med. 2017. Т. 95. № 12. С. 1269–1282.
128. Baba Y. и др. HIF1A overexpression is associated with poor prognosis in a cohort of 731 colorectal cancers. // Am. J. Pathol. 2010. Т. 176. № 5. С. 2292–2301.
129. Bäcker V. и др. Knockdown of myeloid cell hypoxia-inducible factor-1α ameliorates the acute pathology in DSS-induced colitis. // PLoS ONE. 2017. Т. 12. № 12. С. e0190074.
130. Bader S.B., Dewhirst M.W., Hammond E.M. Cyclic hypoxia: an update on its characteristics, methods to measure it and biological implications in cancer. // Cancers (Basel). 2020. Т. 13. № 1.
131. Badylak S.F. и др. Macrophage phenotype as a determinant of biologic scaffold remodeling. // Tissue Eng. Part A. 2008. Т. 14. № 11. С. 1835–1842.
132. Bahrami H., Tafrihi M. Global trends of cancer: The role of diet, lifestyle, and environmental factors. // Cancer Innovation. 2023. Т. 2. № 4. С. 290–301.
133. Bailey C.M. и др. Targeting HIF-1α abrogates PD-L1-mediated immune evasion in tumor microenvironment but promotes tolerance in normal tissues. // J. Clin. Invest. 2022. Т. 132. № 9.
134. Baillieul S. и др. Hypoxic conditioning and the central nervous system: A new therapeutic opportunity for brain and spinal cord injuries? // Exp Biol Med (Maywood). 2017. Т. 242. № 11. С. 1198–1206.
135. Bakleh M.Z., Al Haj Zen A. The distinct role of HIF-1α and HIF-2α in hypoxia and angiogenesis. // Cells. 2025. Т. 14. № 9.
136. Balasubramanian S., Priyathersini N., Johnson T. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in colorectal adenoma and carcinoma in a tertiary care center. // Cureus. 2022. Т. 14. № 11. С. e31393.
137. Balkwill F., Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? // Lancet. 2001. Т. 357. № 9255. С. 539–545.
138. Balkwill F.R., Mantovani A. Cancer-related inflammation: common themes and therapeutic opportunities. // Semin. Cancer Biol. 2012. Т. 22. № 1. С. 33–40.
139. Bandarra D. и др. HIF-1α restricts NF-κB-dependent gene expression to control innate immunity signals. // Dis. Model. Mech. 2015. Т. 8. № 2. С. 169–181.
140. Baptista R.B., Souza-Castro N., Almeida-Val V.M.F. Acute hypoxia up-regulates HIF-1α and VEGF mRNA levels in Amazon hypoxia-tolerant Oscar (Astronotus ocellatus). // Fish Physiol. Biochem. 2016. Т. 42. № 5. С. 1307–1318.
141. Barcellos-Hoff M.H., Lyden D., Wang T.C. The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis. // Nat. Rev. Cancer. 2013. Т. 13. № 7. С. 511–518.
142. Barichello T. и др. Biomarkers for sepsis: more than just fever and leukocytosis-a narrative review. // Crit. Care. 2022. Т. 26. № 1. С. 14.
143. Barker F.G. и др. Necrosis as a prognostic factor in glioblastoma multiforme. // Cancer. 1996. Т. 77. № 6. С. 1161–1166.
144. Barré-Sinoussi F., Montagutelli X. Animal models are essential to biological research: issues and perspectives. // Future Sci. OA. 2015. Т. 1. № 4. С. FSO63.
145. Barrera E.C. и др. Influence of high altitude on the expression of HIF-1 and on the prognosis of Ecuadorian patients with gastric adenocarcinoma. // Oncotarget. 2022. Т. 13. С. 1043–1053.
146. Batie M. и др. Hypoxia induces rapid changes to histone methylation and reprograms chromatin. // Science. 2019. Т. 363. № 6432. С. 1222–1226.
147. Beall C.M. Andean, Tibetan, and Ethiopian patterns of adaptation to high-altitude hypoxia. // Integr. Comp. Biol. 2006. Т. 46. № 1. С. 18–24.
148. Beato F. и др. Establishing a living biobank of patient-derived organoids of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. // Lab Invest. 2021. Т. 101. № 2. С. 204–217.
149. Befani C., Liakos P. The role of hypoxia-inducible factor-2 alpha in angiogenesis. // J. Cell. Physiol. 2018. Т. 233. № 12. С. 9087–9098.

150. Beheshti A. и др. Tumor-host signaling interaction reveals a systemic, age-dependent splenic immune influence on tumor development. // Oncotarget. 2015. Т. 6. № 34. С. 35419–35432.
151. Behranvand N. и др. Chemotherapy: a double-edged sword in cancer treatment. // Cancer Immunol. Immunother. 2022. Т. 71. № 3. С. 507–526.
152. Belaiba R.S. и др. Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB in pulmonary artery smooth muscle cells. // Mol. Biol. Cell. 2007. Т. 18. № 12. С. 4691–4697.
153. Belder N. и др. From RNA isolation to microarray analysis: Comparison of methods in FFPE tissues. // Pathol. Res. Pract. 2016. Т. 212. № 8. С. 678–685.
154. Belisario D.C. и др. Hypoxia dictates metabolic rewiring of tumors: implications for chemoresistance. // Cells. 2020. Т. 9. № 12.
155. Bell E.L. и др. The Qo site of the mitochondrial complex III is required for the transduction of hypoxic signaling via reactive oxygen species production. // J. Cell Biol. 2007. Т. 177. № 6. С. 1029–1036.
156. Belosludtsev K.N. и др. Transport of Ca2+ and Ca2+-dependent permeability transition in the liver and heart mitochondria of rats with different tolerance to acute hypoxia. // Biomolecules. 2020. Т. 10. № 1.
157. Berghoff A.S. и др. Clinical neuropathology practice guide 3-2013: levels of evidence and clinical utility of prognostic and predictive candidate brain tumor biomarkers. // Clin. Neuropathol. 2013. Т. 32. № 3. С. 148–158.
158. Bernardazzi C. и др. The P2X7 receptor promotes colorectal inflammation and tumorigenesis by modulating gut microbiota and the inflammasome. // Int. J. Mol. Sci. 2022. Т. 23. № 9.
159. Berra E. и др. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. // EMBO J. 2003. Т. 22. № 16. С. 4082–4090.
160. Bert P. La pression barometrique; recherches de physiologie experimentale. // Paris, G. Masson. 1878. 1168 с.
161. Bertout J.A. и др. HIF2alpha inhibition promotes p53 pathway activity, tumor cell death, and radiation responses. // Proc Natl Acad Sci USA. 2009. Т. 106. № 34. С. 14391–14396.
162. Bickler P.E., Hansen B.M. Hypoxia-tolerant neonatal CA1 neurons: relationship of survival to evoked glutamate release and glutamate receptor-mediated calcium changes in hippocampal slices. // Brain Res. Dev. Brain Res. 1998. Т. 106. № 1–2. С. 57–69.
163. Bickler P.E. Clinical perspectives: neuroprotection lessons from hypoxia-tolerant organisms. // J. Exp. Biol. 2004. Т. 207. № Pt 18. С. 3243–3249.
164. Birner P. и др. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in epithelial ovarian tumors: its impact on prognosis and on response to chemotherapy. // Clin. Cancer Res. 2001. Т. 7. № 6. С. 1661–1668.
165. Bishop T., Ratcliffe P.J. HIF2α: the interface between oxygen-sensing systems in physiology and pathology. // Physiology (Bethesda). 2025. Т. 40. № 5.
166. Biswas S.K., Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. // Nat. Immunol. 2010. Т. 11. № 10. С. 889–896.
167. Blouin C.C. и др. Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: implication of hypoxia-inducible factor 1alpha. // Blood. 2004. Т. 103. № 3. С. 1124–1130.
168. Boennelykke A. и др. Cancer risk in persons with new-onset anaemia: a population-based cohort study in Denmark. // BMC Cancer. 2022. Т. 22. № 1. С. 805.
169. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. // Nat. Immunol. 2001. Т. 2. № 10. С. 907–916.
170. Bolanos-Garcia V.M. MET meet adaptors: functional and structural implications in downstream signalling mediated by the Met receptor. // Mol. Cell. Biochem. 2005. Т. 276. № 1–2. С. 149–157.
171. Bono M.R. и др. The essential role of chemokines in the selective regulation of lymphocyte homing. // Cytokine Growth Factor Rev. 2007. Т. 18. № 1–2. С. 33–43.
172. Boos C.J. и др. The relationship between anxiety and acute mountain sickness. // PLoS ONE. 2018. Т. 13. № 6. С. e0197147.

173. Borst J. и др. CD4+ T cell help in cancer immunology and immunotherapy. // Nat. Rev. Immunol. 2018. Т. 18. № 10. С. 635–647.
174. Bos R. и др. Levels of hypoxia-inducible factor-1 alpha during breast carcinogenesis. // J. Natl. Cancer Inst. 2001. Т. 93. № 4. С. 309–314.
175. Bowman R.L. и др. Macrophage ontogeny underlies differences in tumor-specific education in brain malignancies. // Cell Rep. 2016. Т. 17. № 9. С. 2445–2459.
176. Brackmann S. и др. Relationship between clinical parameters and the colitis-colorectal cancer interval in a cohort of patients with colorectal cancer in inflammatory bowel disease. // Scand. J. Gastroenterol. 2009. Т. 44. № 1. С. 46–55.
177. Brandenburg S. и др. Resident microglia rather than peripheral macrophages promote vascularization in brain tumors and are source of alternative pro-angiogenic factors. // Acta Neuropathol. 2016. Т. 131. № 3. С. 365–378.
178. Brat D.J. и др. Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population. // Cancer Res. 2004. Т. 64. № 3. С. 920–927.
179. Braun R.D. и др. Comparison of tumor and normal tissue oxygen tension measurements using OxyLite or microelectrodes in rodents. // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2001. Т. 280. № 6. С. H2533-44.
180. Bray F. и др. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. // CA Cancer J. Clin. 2024. Т. 74. № 3. С. 229–263.
181. Brentnall T.A. и др. Mutations in the p53 gene: an early marker of neoplastic progression in ulcerative colitis. // Gastroenterology. 1994. Т. 107. № 2. С. 369–378.
182. Brizel D.M. и др. Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer. // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2001. Т. 51. № 2. С. 349–353.
183. Brocherie F., Millet G.P. Hypoxic exercise as an effective nonpharmacological therapeutic intervention. // Exp. Mol. Med. 2020. Т. 52. № 3. С. 529–530.
184. Bronte V., Pittet M.J. The spleen in local and systemic regulation of immunity. // Immunity. 2013. Т. 39. № 5. С. 806–818.
185. Brooks J.T.S. и др. Variations within oxygen-regulated gene expression in humans. // J. Appl. Physiol. 2009. Т. 106. № 1. С. 212–220.
186. Brown E., Taylor C.T. Hypoxia-sensitive pathways in intestinal inflammation. // J. Physiol. (Lond). 2018. Т. 596. № 15. С. 2985–2989.
187. Brown J.M., Wilson W.R. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. // Nat. Rev. Cancer. 2004. Т. 4. № 6. С. 437–447.
188. Brown L.A. и др. Potential for using simulated altitude as a means of prehabilitation: a physiology study. // Anaesthesia. 2023. Т. 78. № 12. С. 1472–1480.
189. Brunelle J.K. и др. Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation. // Cell Metab. 2005. Т. 1. № 6. С. 409–414.
190. Bryson Y.J. и др. Deficiency of immune interferon production by leukocytes of normal newborns. // Cell. Immunol. 1980. Т. 55. № 1. С. 191–200.
191. Buck M.D. и др. Metabolic instruction of immunity. // Cell. 2017. Т. 169. № 4. С. 570–586.
192. Budde A. и др. Retinoblastoma susceptibility gene product pRB activates hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). // Oncogene. 2005. Т. 24. № 10. С. 1802–1808.
193. Bürtin F., Mullins C.S., Linnebacher M. Mouse models of colorectal cancer: Past, present and future perspectives. // World J. Gastroenterol. 2020. Т. 26. № 13. С. 1394–1426.
194. Burtscher J., Samaja M. Healthy aging at moderate altitudes: hypoxia and hormesis. // Gerontology. 2024. Т. 70. № 11. С. 1152–1160.
195. Burtscher M. и др. Effects of interval hypoxia on exercise tolerance: special focus on patients with CAD or COPD. // Sleep Breath. 2010. Т. 14. № 3. С. 209–220.
196. Burtscher M. и др. Short-term exposure to hypoxia for work and leisure activities in health and disease: which level of hypoxia is safe? // Sleep Breath. 2012. Т. 16. № 2. С. 435–442.

197. Cadenas S. ROS and redox signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection. // Free Radic. Biol. Med. 2018. Т. 117. С. 76–89.
198. Cai K.X. и др. Suppression of lung tumor growth and metastasis in mice by adeno-associated virus-mediated expression of vasostatin. // Clin. Cancer Res. 2008. Т. 14. № 3. С. 939–949.
199. Calderón-Gerstein W.S., Torres-Samaniego G. High altitude and cancer: An old controversy. // Respir. Physiol. Neurobiol. 2021. Т. 289. С. 103655.
200. Calle P., Hotter G. Macrophage phenotype and fibrosis in diabetic nephropathy. // Int. J. Mol. Sci. 2020. Т. 21. № 8.
201. Calle-Fabregat C. de la и др. NF-κB and TET2 promote macrophage reprogramming in hypoxia that overrides the immunosuppressive effects of the tumor microenvironment. // Sci. Adv. 2024. Т. 10. № 38. С. eadq5226.
202. Camacho-Cardenosa A. и др. Editorial: Hypoxia as a therapeutic tool in search of healthy aging. // Front. Physiol. 2022. Т. 13. С. 1112129.
203. Campbell E.L. и др. Transmigrating neutrophils shape the mucosal microenvironment through localized oxygen depletion to influence resolution of inflammation. // Immunity. 2014. Т. 40. № 1. С. 66–77.
204. Camuzi D. и др. Regulation is in the air: the relationship between hypoxia and epigenetics in cancer. // Cells. 2019. Т. 8. № 4.
205. Canli Ö. и др. Myeloid cell-derived reactive oxygen species induce epithelial mutagenesis. // Cancer Cell. 2017. Т. 32. № 6. С. 869- 883.e5.
206. Carlini V. и др. The multifaceted nature of IL-10: regulation, role in immunological homeostasis and its relevance to cancer, COVID-19 and post-COVID conditions. // Front. Immunol. 2023. Т. 14. С. 1161067.
207. Carmeliet P., Jain R.K. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. // Nat. Rev. Drug Discov. 2011. Т. 10. № 6. С. 417–427.
208. Catalano M. и др. Inflammation in urological malignancies: the silent killer. // Int. J. Mol. Sci. 2023. Т. 24. № 1.
209. Cavadas M.A.S., Cheong A., Taylor C.T. The regulation of transcriptional repression in hypoxia. // Exp. Cell Res. 2017. Т. 356. № 2. С. 173–181.
210. Cervellati C., Bergamini C.M. Oxidative damage and the pathogenesis of menopause related disturbances and diseases. // Clin. Chem. Lab. Med. 2016. Т. 54. № 5. С. 739–753.
211. Cha S.-T. и др. MicroRNA-519c suppresses hypoxia-inducible factor-1alpha expression and tumor angiogenesis. // Cancer Res. 2010. Т. 70. № 7. С. 2675–2685.
212. Chan I.S., Ewald A.J. The changing role of natural killer cells in cancer metastasis. // J. Clin. Invest. 2022. Т. 132. № 6.
213. Chandel N.S. и др. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O2 sensing. // J. Biol. Chem. 2000. Т. 275. № 33. С. 25130–25138.
214. Chang J.T. Pathophysiology of inflammatory bowel diseases. // N. Engl. J. Med. 2020. Т. 383. № 27. С. 2652–2664.
215. Chanmee T. и др. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. // Cancers (Basel). 2014. Т. 6. № 3. С. 1670–1690.
216. Chaudhry G.-E.-S. и др. Cancer and apoptosis: The apoptotic activity of plant and marine natural products and their potential as targeted cancer therapeutics. // Front. Pharmacol. 2022. Т. 13. С. 842376.
217. Chen L., Liu S., Tao Y. Regulating tumor suppressor genes: post-translational modifications. // Signal Transduct. Target. Ther. 2020a. Т. 5. № 1. С. 90.
218. Chen R. и др. Lymphocyte subsets for predicting inflammatory bowel disease progression and treatment response: a systematic review. // Front. Immunol. 2024. Т. 15. С. 1403420.
219. Chen S. и др. Harnessing and enhancing macrophage phagocytosis for cancer therapy. // Front. Immunol. 2021. Т. 12. С. 635173.
220. Chen S. и др. Estimates and projections of the global economic cost of 29 cancers in 204 countries and territories from 2020 to 2050. // JAMA Oncol. 2023a. Т. 9. № 4. С. 465–472.

221. Chen S. и др. Macrophages in immunoregulation and therapeutics. // Signal Transduct. Target. Ther. 2023б. Т. 8. № 1. С. 207.
222. Chen W. и др. Overexpression of vascular endothelial growth factor indicates poor outcomes of glioma: a systematic review and meta-analysis. // Int. J. Clin. Exp. Med. 2015a. Т. 8. № 6. С. 8709–8719.
223. Chen W.-J. и др. Ki-67 is a valuable prognostic factor in gliomas: evidence from a systematic review and meta-analysis // Asian Pac. J. Cancer Prev. 2015б. Т. 16. № 2. С. 411–420.
224. Chen Y. и др. Over-expression of semaphorin4D, hypoxia-inducible factor-1α and vascular endothelial growth factor is related to poor prognosis in ovarian epithelial cancer. // Int. J. Mol. Sci. 2012. Т. 13. № 10. С. 13264–13274.
225. Chen Y. и др. Romance of the three kingdoms in hypoxia: HIFs, epigenetic regulators, and chromatin reprogramming. // Cancer Lett. 2020б. Т. 495. С. 211–223.
226. Chen Y., Gaber T. Hypoxia/hif modulates immune responses. // Biomedicines. 2021. Т. 9. № 3.
227. Chen Z. и др. Prognostic value and clinicopathological differences of HIFs in colorectal cancer: evidence from meta-analysis. // PLoS ONE. 2013. Т. 8. № 12. С. e80337.
228. Chen Z.Y. и др. Cytokine profile and prognostic significance of high neutrophil-lymphocyte ratio in colorectal cancer. // Br. J. Cancer. 2015в. Т. 112. № 6. С. 1088–1097.
229. Cheng S.-C. и др. mTOR- and HIF-1α-mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. // Science. 2014. Т. 345. № 6204. С. 1250684.
230. Chiarelli P.A. и др. Bionanotechnology and the future of glioma. // Surg. Neurol. Int. 2015. Т. 6. С. S45-58.
231. Chick H.M. и др. Using the traditional ex vivo whole blood model to discriminate bacteria by their inducible host responses. // Biomedicines. 2024. Т. 12. № 4.
232. Chipuk J.E. и др. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. // Science. 2004. Т. 303. № 5660. С. 1010–1014.
233. Chistiakov D.A. и др. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. // Lab. Invest. 2017. Т. 97. № 1. С. 4–13.
234. Cho S.H. и др. Germinal centre hypoxia and regulation of antibody qualities by a hypoxia response system. // Nature. 2016. Т. 537. № 7619. С. 234–238.
235. Choi W. и др. Hepatocyte growth factor regulates macrophage transition to the M2 phenotype and promotes murine skeletal muscle regeneration. // Front. Physiol. 2019. Т. 10. С. 914.
236. Chou C.H. и др. MMP-9 from sublethally irradiated tumor promotes Lewis lung carcinoma cell invasiveness and pulmonary metastasis. // Oncogene. 2012. Т. 31. № 4. С. 458–468.
237. Chouchani E.T. и др. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. // Nature. 2014. Т. 515. № 7527. С. 431–435.
238. Chua W. и др. Neutrophil/lymphocyte ratio predicts chemotherapy outcomes in patients with advanced colorectal cancer. // Br. J. Cancer. 2011. Т. 104. № 8. С. 1288–1295.
239. Ciarlo E. и др. Trained immunity confers broad-spectrum protection against bacterial infections. // J. Infect. Dis. 2020. Т. 222. № 11. С. 1869–1881.
240. Colgan S.P., Furuta G.T., Taylor C.T. Hypoxia and innate immunity: keeping up with the HIFsters. // Annu. Rev. Immunol. 2020. Т. 38. С. 341–363.
241. Comoglio P.M., Trusolino L., Boccaccio C. Known and novel roles of the MET oncogene in cancer: a coherent approach to targeted therapy. // Nat. Rev. Cancer. 2018. Т. 18. № 6. С. 341–358.
242. Compernolle V. и др. Loss of HIF-2alpha and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. // Nat. Med. 2002. Т. 8. № 7. С. 702–710.
243. Compton C. Cancer initiation, promotion, and progression and the acquisition of key behavioral traits. // Cancer: the enemy from within: a comprehensive textbook of cancer's causes, complexities and consequences. Cham: Springer International Publishing. 2020. С. 25–48.
244. Condeelis J., Pollard J.W. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. // Cell. 2006. Т. 124. № 2. С. 263–266.

245. Corrado C., Fontana S. Hypoxia and HIF signaling: one axis with divergent effects. // Int. J. Mol. Sci. 2020. Т. 21. № 16.
246. Corrò C., Moch H. Biomarker discovery for renal cancer stem cells. // J. Pathol. Clin. Res. 2018. Т. 4. № 1. С. 3–18.
247. Costa E. и др. Experimental models as refined translational tools for breast cancer research // Sci. Pharm. 2020. Т. 88. № 3. С. 32.
248. Coussens L.M., Werb Z. Inflammation and cancer. // Nature. 2002. Т. 420. № 6917. С. 860–867.
249. Couvelard A. и др. Overexpression of the oxygen sensors PHD-1, PHD-2, PHD-3, and FIH Is associated with tumor aggressiveness in pancreatic endocrine tumors. // Clin. Cancer Res. 2008. Т. 14. № 20. С. 6634–6639.
250. Cox K.E. и др. The expression of the claudin family of proteins in colorectal cancer. // Biomolecules. 2024. Т. 14. № 3.
251. Coventry B.J. и др. The immune system and responses to cancer: coordinated evolution // F1000Res. 2015. Т. 4. С. 552.
252. Cramer T. и др. HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. // Cell. 2003. Т. 112. № 5. С. 645–657.
253. Cummins E.P. и др. Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates IkappaB kinase-beta, giving insight into hypoxia-induced NFkappaB activity. // Proc Natl Acad Sci USA. 2006. Т. 103. № 48. С. 18154–18159.
254. Cummins E.P. и др. The hydroxylase inhibitor dimethyloxalylglycine is protective in a murine model of colitis. // Gastroenterology. 2008. Т. 134. № 1. С. 156–165.
255. Curtius K., Wright N.A., Graham T.A. An evolutionary perspective on field cancerization. // Nat. Rev. Cancer. 2018. Т. 18. № 1. С. 19–32.
256. D'Ignazio L., Batie M., Rocha S. Hypoxia and inflammation in cancer, focus on HIF and NF-κB. // Biomedicines. 2017. Т. 5. № 2.
257. D'Ignazio L., Rocha S. Hypoxia Induced NF-κB. // Cells. 2016. Т. 5. № 1.
258. Dai S. и др. Intratumoral CXCL13+CD8+T cell infiltration determines poor clinical outcomes and immunoevasive contexture in patients with clear cell renal cell carcinoma. // J. Immunother. Cancer. 2021. Т. 9. № 2.
259. Dai Z., Ramesh V., Locasale J.W. The evolving metabolic landscape of chromatin biology and epigenetics. // Nat. Rev. Genet. 2020. Т. 21. № 12. С. 737–753.
260. Däster S. и др. Induction of hypoxia and necrosis in multicellular tumor spheroids is associated with resistance to chemotherapy treatment. // Oncotarget. 2017. Т. 8. № 1. С. 1725–1736.
261. Datta A. и др. Impact of hypoxia on cervical cancer outcomes. // Int. J. Gynecol. Cancer. 2021. Т. 31. № 11. С. 1459–1470.
262. Davis L. и др. Targeting HIF-2α in the tumor microenvironment: redefining the role of HIF-2α for solid cancer therapy. // Cancers (Basel). 2022. Т. 14. № 5.
263. Dayan F. и др. The oxygen sensor factor-inhibiting hypoxia-inducible factor-1 controls expression of distinct genes through the bifunctional transcriptional character of hypoxia-inducible factor-1alpha. // Cancer Res. 2006. Т. 66. № 7. С. 3688–3698.
264. Dayan F. и др. Gene regulation in response to graded hypoxia: the non-redundant roles of the oxygen sensors PHD and FIH in the HIF pathway. // J. Theor. Biol. 2009. Т. 259. № 2. С. 304–316.
265. De Bacco F. и др. Induction of MET by ionizing radiation and its role in radioresistance and invasive growth of cancer. // J. Natl. Cancer Inst. 2011. Т. 103. № 8. С. 645–661.
266. Delaney M.A. и др. Initial case reports of cancer in naked mole-rats (Heterocephalus glaber). // Vet. Pathol. 2016. Т. 53. № 3. С. 691–696.
267. deLeeuw R.J. и др. The prognostic value of FoxP3+ tumor-infiltrating lymphocytes in cancer: a critical review of the literature. // Clin. Cancer Res. 2012. Т. 18. № 11. С. 3022–3029.
268. Della Rocca Y. и др. Hypoxia: molecular pathophysiological mechanisms in human diseases. // J. Physiol. Biochem. 2022. Т. 78. № 4. С. 739–752.
269. DeNardo D.G. и др. CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. // Cancer Cell. 2009. Т. 16. № 2. С. 91–102.

270. DeNardo D.G., Ruffell B. Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy. // Nat. Rev. Immunol. 2019. Т. 19. № 6. С. 369–382.
271. Denny W.A. The role of hypoxia-activated prodrugs in cancer therapy. // Lancet Oncol. 2000. Т. 1. № 1. С. 25–29.
272. Deng J. и др. Pre-administration of berberine exerts chemopreventive effects in AOM/DSS-induced colitis-associated carcinogenesis mice via modulating inflammation and intestinal microbiota. // Nutrients. 2022. Т. 14. № 4.
273. Derynck R., Turley S.J., Akhurst R.J. TGFβ biology in cancer progression and immunotherapy. // Nat. Rev. Clin. Oncol. 2021. Т. 18. № 1. С. 9–34.
274. De Robertis M. и др. The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. // J. Carcinog. 2011. Т. 10. С. 9.
275. Dhanasekaran R. и др. The MYC oncogene - the grand orchestrator of cancer growth and immune evasion. // Nat. Rev. Clin. Oncol. 2022. Т. 19. № 1. С. 23–36.
276. Diakos C.I. и др. Cancer-related inflammation and treatment effectiveness. // Lancet Oncol. 2014. Т. 15. № 11. С. e493-503.
277. Diatroptova M.A. и др. Reparative and inflammatory changes in wounds in animals with different resistance to hypoxia // Žurnal anatomii i gistopatologii. 2023. Т. 12. № 3. С. 26–32.
278. Digestive System Tumours WHO Classification of Tumours, 5th Edition WHO Press-e., 2019. 635 с.
279. Dolan R.D. и др. The role of the systemic inflammatory response in predicting outcomes in patients with operable cancer: Systematic review and meta-analysis. // Sci. Rep. 2017. Т. 7. № 1. С. 16717.
280. Dolan R.D., McMillan D.C. The prevalence of cancer associated systemic inflammation: Implications of prognostic studies using the Glasgow Prognostic Score. // Crit. Rev. Oncol. Hematol. 2020. Т. 150. С. 102962.
281. Domènech M. и др. Hypoxia: the cornerstone of glioblastoma. // Int. J. Mol. Sci. 2021. Т. 22. № 22.
282. Dong N. и др. M2 macrophages mediate sorafenib resistance by secreting HGF in a feed-forward manner in hepatocellular carcinoma. // Br. J. Cancer. 2019. Т. 121. № 1. С. 22–33.
283. Dongre A., Weinberg R.A. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2019. Т. 20. № 2. С. 69–84.
284. Du J. и др. Irisin pretreatment ameliorates intestinal ischemia/reperfusion injury in mice through activation of the Nrf2 pathway. // Int. Immunopharmacol. 2019. Т. 73. С. 225–235.
285. Dubal P.M. и др. Laryngeal chondrosarcoma: a population-based analysis. // Laryngoscope. 2014. Т. 124. № 8. С. 1877–1881.
286. Dudley A.C., Griffioen A.W. Pathological angiogenesis: mechanisms and therapeutic strategies. // Angiogenesis. 2023. Т. 26. № 3. С. 313–347.
287. Dunn G.P. и др. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. // Nat. Immunol. 2002. Т. 3. № 11. С. 991–998.
288. Dunne J.R. и др. Preoperative anemia in colon cancer: assessment of risk factors. // Am. Surg. 2002. Т. 68. № 6. С. 582–587.
289. Dutta S. и др. Targets of immune escape mechanisms in cancer: basis for development and evolution of cancer immune checkpoint inhibitors. // Biology (Basel). 2023. Т. 12. № 2.
290. Dvorak H.F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. // N. Engl. J. Med. 1986. Т. 315. № 26. С. 1650–1659.
291. Dvornikova K.A., Platonova O.N., Bystrova E.Y. Hypoxia and intestinal inflammation: common molecular mechanisms and signaling pathways. // Int. J. Mol. Sci. 2023. Т. 24. № 3.
292. Dzal Y.A., Milsom W.K. Effects of hypoxia on the respiratory and metabolic responses to progressive cooling in newborn rodents that range in heterothermic expression. // Exp. Physiol. 2021. Т. 106. № 4. С. 1005–1023.

293. Dzhalilova D.Sh. и др. Expression of *Hif-1α*, *Nf-κb*, and *Vegf* genes in the liver and blood serum levels of HIF-1α, erythropoietin, VEGF, TGF-β, 8-isoprostane, and corticosterone in Wistar rats with high and low resistance to hypoxia. // Bull. Exp. Biol. Med. 2018. Т. 165. № 6. С. 781–785.
294. Dzhalilova D.Sh. и др. Dependence of the severity of the systemic inflammatory response on resistance to hypoxia in male Wistar rats. // J. Inflamm. Res. 2019a. Т. 12. С. 73–86.
295. Dzhalilova D.Sh. и др. Morphological characteristics of the thymus and spleen and the subpopulation composition of lymphocytes in peripheral blood during systemic inflammatory response in male rats with different resistance to hypoxia. // Int. J. Inflam. 2019b. Т. 2019. С. 7584685.
296. Dzhalilova D.Sh., Makarova O.V. Differences in tolerance to hypoxia: physiological, biochemical, and molecular-biological characteristics. // Biomedicines. 2020. Т. 8. № 10.
297. Dzhalilova D.Sh. и др. Age-related differences in hypoxia-associated genes and cytokine profile in male Wistar rats. // Heliyon. 2021. Т. 7. № 9. С. e08085.
298. 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.
299. Dzhalilova D.Sh. и др. Age-specific features of the levels of reference proteins actin, tubulin, and GAPDH in different organs of male Wistar rats // Bull. Exp. Biol. Med. 2022. Т. 173. № 4. С. 481–485.
300. 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.
301. Dzhalilova D.Sh. и др. Morphological and molecular-biological features of glioblastoma progression in tolerant and susceptible to hypoxia Wistar rats // Sci. Rep. 2023a. № 13. С. 12694.
302. Dzhalilova D.Sh. и др. Morphological and molecular biological features of the systemic inflammatory response in old Wistar rats with high and low resistance to hypoxia // Bull. Exp. Biol. Med. 2023б. Т. 175. № 5. С. 704–710.
303. Dzhalilova D.Sh. и др. Molecular and phenotypic distinctions of macrophages in tolerant and susceptible to hypoxia rats. // PeerJ. 2023в. Т. 11. С. e16052.
304. Dzhalilova D.Sh. и др. Murine models of colorectal cancer: the azoxymethane (AOM)/dextran sulfate sodium (DSS) model of colitis-associated cancer. // PeerJ. 2023г. Т. 11. С. e16159.
305. Dzhalilova D.Sh. и др. 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)/Meditsinskaya Immunologiya. 2023д. Т. 25. №3. С. 551–556.
306. Dzhalilova D.Sh., Silina M.V., Tsvetkov I.S., Kosyreva 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 // Int. J. Mol. Sci. 2024a. Т. 25. С. 7801.
307. Dzhalilova D.Sh. и др. Comparative molecular and biological characteristic of the systemic inflammatory response in adult and old male Wistar rats with different resistance to hypoxia // Cell Technologies in Biology and Medicine. 2024б. № 4. С. 680–686.
308. 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 // Cell Technologies in Biology and Medicine. 2024в. № 1. С. 162–168.
309. Dzhalilova D.Sh., Maiak M.A., Kosyreva 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 // Cell Technologies in Biology and Medicine. 2024г. № 3. С. 169–175.
310. Dzhalilova D.Sh., Kosyreva 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 // Bull. Exp. Biol. Med. 2024д. Т. 177. № 4. С. 418–422.
311. Dzhalilova D.Sh., Kosyreva A.M., Silina M.V., Mayak M.A., Tsvetkov I.S., Makarova O.V. Production of IL-1β and IL-10 by blood cells of rats before and one month after sublethal hypoxic exposure in a decompression chamber // Bull. Exp. Biol. Med. 2025a. Т. 178. № 5. С. 670–674.

312. 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. 2025б. № 13. С. e19024.
313. Eades L., Drozd M., Cubbon R.M. Hypoxia signalling in the regulation of innate immune training. // Biochem. Soc. Trans. 2022. Т. 50. № 1. С. 413–422.
314. Ehirchiou D. и др. The integrin CD11b inhibits MSU-induced NLRP3 inflammasome activation in macrophages and protects mice against MSU-induced joint inflammation. // Arthritis Res. Ther. 2024. Т. 26. № 1. С. 119.
315. Eisermann K. и др. Androgen up-regulates vascular endothelial growth factor expression in prostate cancer cells via an Sp1 binding site. // Mol. Cancer. 2013. Т. 12. С. 7.
316. El Awad B. и др. Hypoxia and interleukin-1beta stimulate vascular endothelial growth factor production in human proximal tubular cells. // Kidney Int. 2000. Т. 58. № 1. С. 43–50.
317. Elsherif Y., Alexakis C., Mendall M. Determinants of weight loss prior to diagnosis in inflammatory bowel disease: a retrospective observational study. // Gastroenterol. Res. Pract. 2014. Т. 2014. С. 762191.
318. Eltzschig H.K., Carmeliet P. Hypoxia and inflammation. // N. Engl. J. Med. 2011. Т. 364. № 7. С. 656–665.
319. Elvert G. и др. Cooperative interaction of hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) and Ets-1 in the transcriptional activation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1). // J. Biol. Chem. 2003. Т. 278. № 9. С. 7520–7530.
320. Emerling B.M. и др. Mitochondrial reactive oxygen species activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for hypoxia signaling. // Mol. Cell. Biol. 2005. Т. 25. № 12. С. 4853–4862.
321. Eming S.A., Krieg T., Davidson J.M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. // J. Invest. Dermatol. 2007. Т. 127. № 3. С. 514–525.
322. Endoscopic Classification Review Group. Update on the paris classification of superficial neoplastic lesions in the digestive tract. // Endoscopy. 2005. Т. 37. № 6. С. 570–578.
323. Engel B.J. и др. MUC1 stimulates EGFR expression and function in endometrial cancer. // Oncotarget. 2016. Т. 7. № 22. С. 32796–32809.
324. Ehrlich P. Ueber den jetzigen stand der Karzinomforschung. // Ned Tijdschr Geneeskd. 1909. Т. 5. С. 273-290.
325. Esgalhado A.J. и др. CD45RA, cd8β, and ifnγ are potential immune biomarkers of human cognitive function. // Front. Immunol. 2020. Т. 11. С. 592656.
326. Eichoff U. Concerning to laboratory animals for MRI and MR spectroscopy. // Медицинская визуализация. 2003. № 3. С. 117–124.
327. Facer P. и др. Chromogranin: a newly recognized marker for endocrine cells of the human gastrointestinal tract. // Gastroenterology. 1985. Т. 89. № 6. С. 1366–1373.
328. Fallah J., Rini B.I. HIF inhibitors: status of current clinical development. // Curr. Oncol. Rep. 2019. Т. 21. № 1. С. 6.
329. Fanning S.L. и др. The immunological impact of genetic drift in the B10.BR congenic inbred mouse strain. // J. Immunol. 2009. Т. 183. № 7. С. 4261–4272.
330. Farshbafnadi M. и др. Aging & COVID-19 susceptibility, disease severity, and clinical outcomes: The role of entangled risk factors. // Exp. Gerontol. 2021. Т. 154. С. 111507.
331. Fedorova O. и др. The Role of PTEN in Epithelial-Mesenchymal Transition. // Cancers (Basel). 2022. Т. 14. № 15.
332. Flamme I., Krieg M., Plate K.H. Up-regulation of vascular endothelial growth factor in stromal cells of hemangioblastomas is correlated with up-regulation of the transcription factor HRF/HIF-2alpha. // Am. J. Pathol. 1998. Т. 153. № 1. С. 25–29.
333. Flórez-Vargas O. и др. Bias in the reporting of sex and age in biomedical research on mouse models. // eLife. 2016. Т. 5.
334. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. // N. Engl. J. Med. 1971. Т. 285. № 21. С. 1182–1186.

335. Fonseca-Camarillo G., Yamamoto-Furusho J.K. Immunoregulatory pathways involved in inflammatory bowel disease. // Inflamm. Bowel Dis. 2015. Т. 21. № 9. С. 2188–2193.
336. Frenkel L., Bryson Y.J. Ontogeny of phytohemagglutinin-induced gamma interferon by leukocytes of healthy infants and children: evidence for decreased production in infants younger than 2 months of age. // J. Pediatr. 1987. Т. 111. № 1. С. 97–100.
337. Freund J. и др. Association between exploratory activity and social individuality in genetically identical mice living in the same enriched environment. // Neuroscience. 2015. Т. 309. С. 140–152.
338. Fridman I.A. и др. Morphological characteristic of melanoma B16 progression in C57BL/6 mice with high and low resistance to hypoxia. // Bull. Exp. Biol. Med. 2020. Т. 168. № 3. С. 390–394.
339. Friedman J.E., Haddad G.G. Major differences in Ca2+i response to anoxia between neonatal and adult rat CA1 neurons: role of Ca2+o and Na+o. // J. Neurosci. 1993. Т. 13. № 1. С. 63–72.
340. Frijhoff J. и др. Clinical relevance of biomarkers of oxidative stress. // Antioxid. Redox Signal. 2015. Т. 23. № 14. С. 1144–1170.
341. Fritsch S.D. и др. Metabolic support by macrophages sustains colonic epithelial homeostasis. // Cell Metab. 2023. Т. 35. № 11. С. 1931-1943.e8.
342. Fritzenwanger M. и др. Impact of short-term systemic hypoxia on phagocytosis, cytokine production, and transcription factor activation in peripheral blood cells. // Mediators Inflamm. 2011. Т. 2011. С. 429501.
343. Fung I. и др. P052 Mucosal IgG-like naive B-cell expansion and maturation contribute to ulcerative colitis pathogenesis. // Journal of Crohn’s and Colitis. 2024. Т. 18. С. i318–i318.
344. Funnell W.R., Maysinger D. Three-dimensional reconstruction of cell nuclei, internalized quantum dots and sites of lipid peroxidation. // J. Nanobiotechnology. 2006. Т. 10. № 4. С. 1-19.
345. Furlan D. и др. Up-regulation of the hypoxia-inducible factor-1 transcriptional pathway in colorectal carcinomas. // Hum. Pathol. 2008. Т. 39. № 10. С. 1483–1494.
346. Fu Z. и др. Tumour hypoxia-mediated immunosuppression: mechanisms and therapeutic approaches to improve cancer immunotherapy. // Cells. 2021. Т. 10. № 5.
347. Gabay C., Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. // N. Engl. J. Med. 1999. Т. 340. № 6. С. 448–454.
348. Gabrusiewicz K. и др. Characteristics of the alternative phenotype of microglia/macrophages and its modulation in experimental gliomas. // PLoS ONE. 2011. Т. 6. № 8. С. e23902.
349. Galimi F. и др. Hepatocyte growth factor is a regulator of monocyte-macrophage function. // J. Immunol. 2001. Т. 166. № 2. С. 1241–1247.
350. Galkin F. и др. Roles of hypoxia-inducible factor-prolyl hydroxylases in aging and disease. // Ageing Res. Rev. 2024. Т. 102. С. 102551.
351. Galon J., Lanzi A. Immunoscore and its introduction in clinical practice. // Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. 2020. Т. 64. № 2. С. 152–161.
352. Galván-Peña S., O’Neill L.A.J. Metabolic reprograming in macrophage polarization. // Front. Immunol. 2014. Т. 5. С. 420.
353. Găman M.-A. и др. Evaluation of oxidative stress levels in obesity and diabetes by the free oxygen radical test and free oxygen radical defence assays and correlations with anthropometric and laboratory parameters. // World J. Diabetes. 2020. Т. 11. № 5. С. 193–201.
354. Gao Q. и др. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. // J. Clin. Oncol. 2007. Т. 25. № 18. С. 2586–2593.
355. García-Del Río A. и др. Factor-inhibiting HIF (FIH) promotes lung cancer progression. // JCI Insight. 2023. Т. 8. № 20.
356. Garcia-Sanz M., Simón-Marín R., Hilario E. Morphological characterization of Lewis lung carcinoma (3LL). A light and electron microscopic study. // Tumori. 1989. Т. 75. № 1. С. 23–27.
357. Gargalionis A.N., Papavassiliou K.A., Papavassiliou A.G. Targeting STAT3 signaling pathway in colorectal cancer. // Biomedicines. 2021. Т. 9. № 8.
358. Garrido D.I., Garrido S.M. Cancer risk associated with living at high altitude in Ecuadorian population from 2005 to 2014. // Clujul Med. 2018. Т. 91. № 2. С. 188–196.

359. Gasparoni A. и др. Age-related changes in intracellular TH1/TH2 cytokine production, immunoproliferative T lymphocyte response and natural killer cell activity in newborns, children and adults. // Biol. Neonate. 2003. Т. 84. № 4. С. 297–303.
360. Gelperina S. и др. Drug delivery to the brain using surfactant-coated poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: influence of the formulation parameters. // Eur. J. Pharm. Biopharm. 2010. Т. 74. № 2. С. 157–163.
361. Geraghty T. и др. Positive allosteric modulation of cd11b as a novel therapeutic strategy against lung cancer. // Front. Oncol. 2020. Т. 10. С. 748.
362. Gerald D. и др. JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress. // Cell. 2004. Т. 118. № 6. С. 781–794.
363. Gerhard G.M. и др. Tumor-infiltrating dendritic cell states are conserved across solid human cancers. // J. Exp. Med. 2021. Т. 218. № 1.
364. Ghosh D., Kumar R., Pal K. Individual variation in response to simulated hypoxic stress of rats // Indian Journal of Experimental Biology. 2012. Т. 50. С. 744–748.
365. Ghosh P. и др. A G{alpha}i-GIV molecular complex binds epidermal growth factor receptor and determines whether cells migrate or proliferate. // Mol. Biol. Cell. 2010. Т. 21. № 13. С. 2338–2354.
366. Giatromanolaki A. и др. Relation of hypoxia inducible factor 1 alpha and 2 alpha in operable non-small cell lung cancer to angiogenic/molecular profile of tumours and survival. // Br. J. Cancer. 2001. Т. 85. № 6. С. 881–890.
367. Gilkes D.M., Semenza G.L., Wirtz D. Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis. // Nat. Rev. Cancer. 2014. Т. 14. № 6. С. 430–439.
368. Giuffrida P., Corazza G.R., Di Sabatino A. Old and new lymphocyte players in inflammatory bowel disease. // Dig. Dis. Sci. 2018. Т. 63. № 2. С. 277–288.
369. Gladek I. и др. HIF1A gene polymorphisms and human diseases: Graphical review of 97 association studies. // Genes Chromosomes Cancer. 2017. Т. 56. № 6. С. 439–452.
370. Glazachev O.S. и др. Indicators of individual hypoxia resistance — a way to optimize hypoxic training for children // Ross. vestn. perinatol. pediatr. 2020. Т. 65. № 4. С. 78–84.
371. Glazachev O.S. и др. Safety and efficacy of intermittent hypoxia conditioning as a new rehabilitation/secondary prevention strategy for patients with cardiovascular diseases: a systematic review and meta-analysis. // Curr. Cardiol. Rev. 2021. Т. 17. № 6. С. e051121193317.
372. Golde S. и др. Decreased iNOS synthesis mediates dexamethasone-induced protection of neurons from inflammatory injury *in vitro*. // Eur. J. Neurosci. 2003. Т. 18. № 9. С. 2527–2537.
373. González-Silva L., Quevedo L., Varela I. Tumor functional heterogeneity unraveled by scRNA-seq technologies. // Trends Cancer. 2020. Т. 6. № 1. С. 13–19.
374. Gorr T.A. и др. Hypoxia tolerance in animals: biology and application. // Physiol. Biochem. Zool. 2010. Т. 83. № 5. С. 733–752.
375. Gossage L. и др. Expression of key hypoxia sensing prolyl-hydroxylases PHD1, -2 and -3 in pancreaticobiliary cancer. // Histopathology. 2010. Т. 56. № 7. С. 908–920.
376. Graham L.V., Khakoo S.I., Blunt M.D. NK Cells in the lymph nodes and their role in anti-tumour immunity. // Biomedicines. 2024. Т. 12. № 8.
377. Greten F.R., Grivennikov S.I. Inflammation and cancer: triggers, mechanisms, and consequences. // Immunity. 2019. Т. 51. № 1. С. 27–41.
378. Greten F.R. и др. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. // Cell. 2004. Т. 118. № 3. С. 285–296.
379. Grieshaber M.K. и др. Physiological and metabolic responses to hypoxia in invertebrates. // Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 1994. Т. 125. С. 43–147.
380. Grimes D.R. и др. A method for estimating the oxygen consumption rate in multicellular tumour spheroids. // J. R. Soc. Interface. 2014. Т. 11. № 92. С. 20131124.
381. Grimes D.R. и др. Evidence for hypoxia increasing the tempo of evolution in glioblastoma. // Br. J. Cancer. 2020. Т. 123. № 10. С. 1562–1569.
382. Grivennikov S.I., Cominelli F. Colitis-associated and sporadic colon cancers: different diseases, different mutations? // Gastroenterology. 2016. Т. 150. № 4. С. 808–810.

383. Grivennikov S.I., Greten F.R., Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. // Cell. 2010. Т. 140. № 6. С. 883–899.
384. Grivennikov S. и др. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. // Cancer Cell. 2009. Т. 15. № 2. С. 103–113.
385. Grondin J.A. и др. Mucins in intestinal mucosal defense and inflammation: learning from clinical and experimental studies. // Front. Immunol. 2020. Т. 11. С. 2054.
386. Güç E., Pollard J.W. Redefining macrophage and neutrophil biology in the metastatic cascade. // Immunity. 2021. Т. 54. № 5. С. 885–902.
387. Guertin D.A., Sabatini D.M. Defining the role of mTOR in cancer. // Cancer Cell. 2007. Т. 12. № 1. С. 9–22.
388. Guidi L. и др. FOXP3+ T regulatory cell modifications in inflammatory bowel disease patients treated with anti-TNFα agents. // Biomed Res. Int. 2013. Т. 2013. С. 286368.
389. Guner A., Kim H.-I. Biomarkers for evaluating the inflammation status in patients with cancer. // J. Gastric Cancer. 2019. Т. 19. № 3. С. 254–277.
390. Guo H. и др. Potential plasma biomarkers at low altitude for prediction of acute mountain sickness. // Front. Immunol. 2023. Т. 14. С. 1237465.
391. Guo H. и др. IL-2, IL-17A and TNF-α hold potential as biomarkers for predicting acute mountain sickness prior to ascent. // Cytokine. 2024. Т. 181. С. 156694.
392. Guzy R.D. и др. Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. // Cell Metab. 2005. Т. 1. № 6. С. 401–408.
393. Gzell C. и др. Proliferation index predicts survival after second craniotomy within 6 months of adjuvant radiotherapy for high-grade glioma. // Clin. Oncol. 2016. Т. 28. № 3. С. 215–222.
394. Haase V.H. Hypoxia-inducible factor-prolyl hydroxylase inhibitors in the treatment of anemia of chronic kidney disease. // Kidney Int. Suppl. (2011). 2021. Т. 11. № 1. С. 8–25.
395. Hajishengallis G., Li X., Chavakis T. Immunometabolic control of hematopoiesis. // Mol. Aspects Med. 2021. Т. 77. С. 100923.
396. Hall J.A. и др. Essential role for retinoic acid in the promotion of CD4(+) T cell effector responses via retinoic acid receptor alpha. // Immunity. 2011. Т. 34. № 3. С. 435–447.
397. Hambardzumyan D., Gutmann D.H., Kettenmann H. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. // Nat. Neurosci. 2016. Т. 19. № 1. С. 20–27.
398. Han C.Z. и др. Macrophages redirect phagocytosis by non-professional phagocytes and influence inflammation. // Nature. 2016. Т. 539. № 7630. С. 570–574.
399. Han L. и др. A predictive role of C-reactive protein in colorectal cancer risk: an updated meta-analysis from 780,985 participants and 11,289 cancer cases. // Int. J. Colorectal Dis. 2023. Т. 38. № 1. С. 121.
400. Hanahan D., Weinberg R.A. The hallmarks of cancer. // Cell. 2000. Т. 100. № 1. С. 57–70.
401. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. // Cell. 2011. Т. 144. № 5. С. 646–674.
402. Hanahan D. Hallmarks of cancer: new dimensions. // Cancer Discov. 2022. Т. 12. № 1. С. 31–46.
403. Hancock R.E.W. и др. Deciphering sepsis: transforming diagnosis and treatment through systems immunology // Front. Sci. 2025. Т. 2.
404. Hapke R.Y., Haake S.M. Hypoxia-induced epithelial to mesenchymal transition in cancer. // Cancer Lett. 2020. Т. 487. С. 10–20.
405. Hara M. и др. High serum levels of interleukin-6 in patients with advanced or metastatic colorectal cancer: the effect on the outcome and the response to chemotherapy plus bevacizumab. // Surg. Today. 2017. Т. 47. № 4. С. 483–489.
406. Harris A.L. Hypoxia – a key regulatory factor in tumour growth. // Nat. Rev. Cancer. 2002. Т. 2. № 1. С. 38–47.
407. Hart J. Land elevation and cancer mortality in U.S. Cities and counties using median elevations derived from geographic information systems. // Dose Response. 2013. Т. 11. № 1.

408. Hartmann G. и др. High altitude increases circulating interleukin-6, interleukin-1 receptor antagonist and C-reactive protein. // Cytokine. 2000. Т. 12. № 3. С. 246–252.
409. Hato L. и др. Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. // Cancers (Basel). 2024. Т. 16. № 5.
410. Hatton I.A. и др. The human cell count and size distribution. // Proc Natl Acad Sci USA. 2023. Т. 120. № 39. С. e2303077120.
411. Hayashi Y. и др. Pathobiological pseudohypoxia as a putative mechanism underlying myelodysplastic syndromes. // Cancer Discov. 2018. Т. 8. № 11. С. 1438–1457.
412. He Q., Sun C., Pan Y. Whole-exome sequencing reveals Lewis lung carcinoma is a hypermutated Kras/Nras-mutant cancer with extensive regional mutation clusters in its genome. // Sci. Rep. 2024. Т. 14. № 1. С. 100.
413. Heikkilä M. и др. Roles of the human hypoxia-inducible factor (HIF)-3α variants in the hypoxia response. // Cell. Mol. Life Sci. 2011. Т. 68. № 23. С. 3885–3901.
414. Hekmatara T. и др. Efficient systemic therapy of rat glioblastoma by nanoparticle-bound doxorubicin is due to antiangiogenic effects. // Clin. Neuropathol. 2009. Т. 28. № 3. С. 153–164.
415. Hellstrom I. и др. Cellular and humoral immunity to different types of human neoplasms. // Nature. 1968. Т. 220. № 5174. С. 1352–1354.
416. Hellstrom K.E., Hellstrom I. From the Hellstrom paradox toward cancer cure. // Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. 2019. Т. 164. С. 1–24.
417. Hellwig-Bürgel T. и др. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. // Blood. 1999. Т. 94. № 5. С. 1561–1567.
418. Helmlinger G. и др. Interstitial pH and pO2 gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. // Nat. Med. 1997. Т. 3. № 2. С. 177–182.
419. Hemminki K. и др. Tumor location and patient characteristics of colon and rectal adenocarcinomas in relation to survival and TNM classes. // BMC Cancer. 2010. Т. 10. С. 688.
420. Herman K.E., Tuttle K.L. Overview of secondary immunodeficiency. // Allergy Asthma Proc. 2024. Т. 45. № 5. С. 347–354.
421. Hernansanz-Agustín P. и др. Acute hypoxia produces a superoxide burst in cells. // Free Radic. Biol. Med. 2014. Т. 71. С. 146–156.
422. Hervieu A., Kermorgant S. The role of PI3K in met driven cancer: A recap. // Front. Mol. Biosci. 2018. Т. 5. С. 86.
423. Hibino S. и др. Inflammation-induced tumorigenesis and metastasis. // Int. J. Mol. Sci. 2021. Т. 22. № 11.
424. Hirota K. Involvement of hypoxia-inducible factors in the dysregulation of oxygen homeostasis in sepsis. // Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets. 2015. Т. 15. № 1. С. 29–40.
425. Hirota K. HIF-α Prolyl hydroxylase inhibitors and their implications for biomedicine: a comprehensive review. // Biomedicines. 2021. Т. 9. № 5.
426. Hochachka P.W., Mommsen T.P. Protons and anaerobiosis. // Science. 1983. Т. 219. № 4591. С. 1391–1397.
427. Höckel M., Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. // J. Natl. Cancer Inst. 2001. Т. 93. № 4. С. 266–276.
428. Höckel M. и др. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. // Cancer Res. 1996. Т. 56. № 19. С. 4509–4515.
429. Hoesel B., Schmid J.A. The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer. // Mol. Cancer. 2013. Т. 12. С. 86.
430. Hofer N. и др. An update on the use of C-reactive protein in early-onset neonatal sepsis: current insights and new tasks. // Neonatology. 2012. Т. 102. № 1. С. 25–36.
431. Hompland T., Fjeldbo C.S., Lyng H. Tumor hypoxia as a barrier in cancer therapy: why levels matter. // Cancers (Basel). 2021. Т. 13. № 3.
432. Honigman B. и др. Acute mountain sickness in a general tourist population at moderate altitudes. // Ann. Intern. Med. 1993. Т. 118. № 8. С. 587–592.

433. Hou F. и др. Hypoxia, hypoxia-inducible factors and inflammatory bowel diseases. // Gastroenterol. Rep. (Oxf). 2024. Т. 12. С. goae030.
434. Hou F.F. и др. Macrophage polarization in sepsis: Emerging role and clinical application prospect. // Int. Immunopharmacol. 2025. Т. 144. С. 113715.
435. Huang C.-Y. и др. Hypoxia tolerance determine differential gelsenicine-induced neurotoxicity between pig and mouse. // BMC Med. 2025. Т. 23. № 1. С. 156.
436. Huang W. и др. Hypoxia enhances the migration and invasion of human glioblastoma U87 cells through PI3K/Akt/mTOR/HIF-1α pathway. // Neuroreport. 2018. Т. 29. № 18. С. 1578–1585.
437. Hunyor I., Cook K.M. Models of intermittent hypoxia and obstructive sleep apnea: molecular pathways and their contribution to cancer. // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2018. Т. 315. № 4. С. R669–R687.
438. Hwang I. и др. Tumor-associated macrophage, angiogenesis and lymphangiogenesis markers predict prognosis of non-small cell lung cancer patients. // J. Transl. Med. 2020. Т. 18. № 1. С. 443.
439. Ikarashi M. и др. Distinct development and functions of resident and recruited liver Kupffer cells/macrophages. // J. Leukoc. Biol. 2013. Т. 94. № 6. С. 1325–1336.
440. Ikeda H. и др. Immune evasion through mitochondrial transfer in the tumour microenvironment. // Nature. 2025.
441. Il'yasova D. и др. Correlation between two markers of inflammation, serum C-reactive protein and interleukin 6, and indices of oxidative stress in patients with high risk of cardiovascular disease. // Biomarkers. 2008. Т. 13. № 1. С. 41–51.
442. Imhann F. и др. Interplay of host genetics and gut microbiota underlying the onset and clinical presentation of inflammatory bowel disease. // Gut. 2018. Т. 67. № 1. С. 108–119.
443. Ioannou M. и др. HIF-1α in colorectal carcinoma: review of the literature. // J BUON. 2015. Т. 20. № 3. С. 680–689.
444. Islam F. и др. Identification of novel mutations and functional impacts of EPAS1 in colorectal cancer. // Cancer Med. 2021. Т. 10. № 16. С. 5557–5573.
445. Islam M.T. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. // Neurol. Res. 2017. Т. 39. № 1. С. 73–82.
446. Ivan M. и др. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing. // Science. 2001. Т. 292. № 5516. С. 464–468.
447. Jaakkola P. и др. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. // Science. 2001. Т. 292. № 5516. С. 468–472.
448. Jääskeläinen M.M. и др. High numbers of CD163+ tumor-associated macrophages predict poor prognosis in HER2+ breast cancer. // Cancers (Basel). 2024. Т. 16. № 3.
449. Jaatinen T., Laine J. Isolation of mononuclear cells from human cord blood by Ficoll-Paque density gradient. // Curr. Protoc. Stem Cell Biol. 2007. Т. Chapter 2.
450. Jaffe N., Bruland O.S., Bielack S. Pediatric and adolescent osteosarcoma. // Boston, MA. Springer US. 2010.
451. Jager N.A. и др. Distribution of matrix metalloproteinases in human atherosclerotic carotid plaques and their production by smooth muscle cells and macrophage subsets. // Mol. Imaging Biol. 2016. Т. 18. № 2. С. 283–291.
452. Jaillon S. и др. Neutrophil diversity and plasticity in tumour progression and therapy. // Nat. Rev. Cancer. 2020. Т. 20. № 9. С. 485–503.
453. Jain K. и др. Upregulation of cytoprotective defense mechanisms and hypoxia-responsive proteins imparts tolerance to acute hypobaric hypoxia. // High Alt. Med. Biol. 2013. Т. 14. № 1. С. 65–77.
454. Jaiswal V. и др. Association between heart failure and the incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis. // Eur. Heart J. Open. 2023. Т. 3. № 5. С. oead073.
455. Jalalvand M. и др. Blood regulatory T cells in inflammatory bowel disease, a systematic review, and meta-analysis. // Int. Immunopharmacol. 2023. Т. 117. С. 109824.
456. Janaszak-Jasiecka A. и др. miR-429 regulates the transition between Hypoxia-Inducible Factor (HIF)1A and HIF3A expression in human endothelial cells. // Sci. Rep. 2016. Т. 6. С. 22775.

457. Janeway C.A., Medzhitov R. Innate immune recognition. // Annu. Rev. Immunol. 2002. Т. 20. С. 197–216.
458. Janker F. и др. Preclinical, non-genetic models of lung adenocarcinoma: a comparative survey. // Oncotarget. 2018. Т. 9. № 55. С. 30527–30538.
459. Janssen K.-P. и др. APC and oncogenic KRAS are synergistic in enhancing Wnt signaling in intestinal tumor formation and progression. // Gastroenterology. 2006. Т. 131. № 4. С. 1096–1109.
460. Jantsch J. и др. Toll-like receptor activation and hypoxia use distinct signaling pathways to stabilize hypoxia-inducible factor 1α (HIF1A) and result in differential HIF1A-dependent gene expression. // J. Leukoc. Biol. 2011. Т. 90. № 3. С. 551–562.
461. Jaskiewicz M. и др. Hypoxia-inducible factor (HIF)-3a2 serves as an endothelial cell fate executor during chronic hypoxia. // EXCLI J. 2022. Т. 21. С. 454–469.
462. Jen J. и др. Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions. // Cancer Res. 1994. Т. 54. № 21. С. 5523–5526.
463. Jess T., Rungoe C., Peyrin-Biroulet L. Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies. // Clin. Gastroenterol. Hepatol. 2012. Т. 10. № 6. С. 639–645.
464. Jia H. и др. Identification of claudin-2, -6, -11 and -14 as prognostic markers in human breast carcinoma. // Int. J. Clin. Exp. Pathol. 2019. Т. 12. № 6. С. 2195–2204.
465. Jiang T. и др. Tumor neoantigens: from basic research to clinical applications. // J. Hematol. Oncol. 2019. Т. 12. № 1. С. 93.
466. Jin K. и др. Poor clinical outcomes and immunoevasive contexture in CXCL13+CD8+ T cells enriched gastric cancer patients. // Oncoimmunology. 2021. Т. 10. № 1. С. 1915560.
467. Jin S. и др. Akkermansia muciniphila ameliorates chronic stress-induced colorectal tumor growth by releasing outer membrane vesicles. // Gut Microbes. 2025. Т. 17. № 1. С. 2555618.
468. Johannes C.M., Musser M.L. Anorexia and the cancer patient. // Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 2019. Т. 49. № 5. С. 837–854.
469. Johannessen A.L., Torp S.H. The clinical value of Ki-67/MIB-1 labeling index in human astrocytomas. // Pathol. Oncol. Res. 2006. Т. 12. № 3. С. 143–147.
470. Jolly M.K. и др. EMT and MET: necessary or permissive for metastasis? // Mol. Oncol. 2017. Т. 11. № 7. С. 755–769.
471. Jonasch E. и др. Phase I LITESPARK-001 study of belzutifan for advanced solid tumors: Extended 41-month follow-up in the clear cell renal cell carcinoma cohort. // Eur. J. Cancer. 2024. Т. 196. С. 113434.
472. Joyce J.A., Pollard J.W. Microenvironmental regulation of metastasis. // Nat. Rev. Cancer. 2009. Т. 9. № 4. С. 239–252.
473. Ju S. и др. Oxidative stress and cancer therapy: controlling cancer cells using reactive oxygen species. // Int. J. Mol. Sci. 2024. Т. 25. № 22.
474. Julian C.G. и др. Acute mountain sickness, inflammation, and permeability: new insights from a blood biomarker study // J. Appl. Physiol. 2011. Т. 111. № 2. С. 392–399.
475. Jumaniyazova E. и др. Immune cells in head-and-neck tumor microenvironments. // J. Pers. Med. 2022. Т. 12. № 9.
476. Jumaniyazova E. и др. Immune cells in the tumor microenvironment of soft tissue sarcomas. // Cancers (Basel). 2023. Т. 15. № 24.
477. Jun J.C. и др. Hypoxia-Inducible Factors and Cancer. // Curr. Sleep Med. Rep. 2017. Т. 3. № 1. С. 1–10.
478. Jun K.-H. и др. Expression of claudin-7 and loss of claudin-18 correlate with poor prognosis in gastric cancer. // Int. J. Surg. 2014. Т. 12. № 2. С. 156–162.
479. Jung A. и др. The invasion front of human colorectal adenocarcinomas shows co-localization of nuclear beta-catenin, cyclin D1, and p16INK4A and is a region of low proliferation. // Am. J. Pathol. 2001. Т. 159. № 5. С. 1613–1617.
480. Kabel A.M. и др. The immunomodulatory effects of topiramate on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats: The role of the inflammatory cascade, vascular endothelial growth factor,

AKT/mTOR/MAP kinase signaling and the apoptotic markers. // Int. Immunopharmacol. 2021. Т. 98. С. 107830.
481. Kabuto M. и др. Prediagnostic serum selenium and zinc levels and subsequent risk of lung and stomach cancer in Japan. // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 1994. Т. 3. № 6. С. 465–469.
482. Kalafati L. и др. The role of neutrophils in trained immunity. // Immunol. Rev. 2023. Т. 314. № 1. С. 142–157.
483. Kammerer T. и др. Changes of hemodynamic and cerebral oxygenation after exercise in normobaric and hypobaric hypoxia: associations with acute mountain sickness. // Ann. Occup. Environ. Med. 2018. Т. 30. С. 66.
484. Kammerer T. и др. Hypoxic-inflammatory responses under acute hypoxia: *In Vitro* experiments and prospective observational expedition trial. // Int. J. Mol. Sci. 2020. Т. 21. № 3.
485. Kang M.J. и др. The effect of age and calorie restriction on HIF-1-responsive genes in aged liver. // Biogerontology. 2005. Т. 6. № 1. С. 27–37.
486. Kang S.-S. и др. Staphylococcal LTA antagonizes the B cell-mitogenic potential of LPS. // Sci. Rep. 2018. Т. 8. № 1. С. 1496.
487. Kang Y. и др. Regulation of VEGF-A expression and VEGF-A-targeted therapy in malignant tumors. // J. Cancer Res. Clin. Oncol. 2024. Т. 150. № 5. С. 221.
488. Kanterman J., Sade-Feldman M., Baniyash M. New insights into chronic inflammation-induced immunosuppression. // Semin. Cancer Biol. 2012. Т. 22. № 4. С. 307–318.
489. Kantola T. и др. Stage-dependent alterations of the serum cytokine pattern in colorectal carcinoma. // Br. J. Cancer. 2012. Т. 107. № 10. С. 1729–1736.
490. Karhausen J. и др. Epithelial hypoxia-inducible factor-1 is protective in murine experimental colitis. // J. Clin. Invest. 2004. Т. 114. № 8. С. 1098–1106.
491. Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. // Nature. 2006. Т. 441. № 7092. С. 431–436.
492. Karin M., Clevers H. Reparative inflammation takes charge of tissue regeneration. // Nature. 2016. Т. 529. № 7586. С. 307–315.
493. Karin M., Greten F.R. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. // Nat. Rev. Immunol. 2005. Т. 5. № 10. С. 749–759.
494. Katsandegwaza B., Horsnell W., Smith K. Inflammatory bowel disease: a review of pre-clinical murine models of human disease. // Int. J. Mol. Sci. 2022. Т. 23. № 16.
495. Kaur B. и др. A simplified protocol to induce hypoxia in a standard incubator: A focus on retinal cells. // Exp. Eye Res. 2023. Т. 236. С. 109653.
496. Kawanami D. и др. Kruppel-like factor 2 inhibits hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function in the endothelium. // J. Biol. Chem. 2009. Т. 284. № 31. С. 20522–20530.
497. Keeley T.P., Mann G.E. Defining physiological normoxia for improved translation of cell physiology to animal models and humans. // Physiol. Rev. 2019. Т. 99. № 1. С. 161–234.
498. Keith B., Simon M.C. Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. // Cell. 2007. Т. 129. № 3. С. 465–472.
499. Keller D.S. и др. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: review of the evidence. // Tech. Coloproctol. 2019. Т. 23. № 1. С. 3–13.
500. Kentsis A. Why do young people get cancer? // Pediatr. Blood Cancer. 2020. Т. 67. № 7. С. e28335.
501. Key T.J. и др. Diet, nutrition, and cancer risk: what do we know and what is the way forward? // BMJ. 2020. Т. 368. С. m511.
502. Khakina E. и др. Hypoxia-activated dissociation of heteroleptic cobalt(III) complexes with functionalized 2,2’-bipyridines and a model anticancer drug esculetin. // Dalton Trans. 2025.
503. Khan S.U. и др. Reprogramming tumor-associated macrophages as a unique approach to target tumor immunotherapy. // Front. Immunol. 2023. Т. 14. С. 1166487.
504. Khodapasand E. и др. Is Bax/Bcl-2 ratio considered as a prognostic marker with age and tumor location in colorectal cancer? // Iran. Biomed. J. 2015. Т. 19. № 2. С. 69–75.

505. Khong T.L. и др. Identification of the angiogenic gene signature induced by EGF and hypoxia in colorectal cancer. // BMC Cancer. 2013. Т. 13. С. 518.
506. Kierans S.J., Taylor C.T. Regulation of glycolysis by the hypoxia-inducible factor (HIF): implications for cellular physiology. // J Physiol (Lond). 2021. Т. 599. № 1. С. 23–37.
507. Kim J. и др. Transcriptomes of the tumor-adjacent normal tissues are more informative than tumors in predicting recurrence in colorectal cancer patients. // J. Transl. Med. 2023. Т. 21. № 1. С. 209.
508. Kim J.J. и др. Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD. // J. Vis. Exp. 2012. № 60.
509. Kim J.S. и др. Systemic inflammation response index correlates with survival and predicts oncological outcome of resected pancreatic cancer following neoadjuvant chemotherapy. // Pancreatology. 2022. Т. 22. № 7. С. 987–993.
510. Kim S.W., Kim I.K., Lee S.H. Role of hyperoxic treatment in cancer. // Exp Biol Med (Maywood). 2020. Т. 245. № 10. С. 851–860.
511. Kim Y.J. Pyruvate promotes tumor angiogenesis through HIF-1-dependent PAI-1 expression // Int. J. Oncol. 2011. Т. 38. № 2.
512. Kim Y.-I. и др. Local stabilization of hypoxia-inducible factor-1α controls intestinal inflammation via enhanced gut barrier function and immune regulation. // Front. Immunol. 2020. Т. 11. С. 609689.
513. Kimura Y., Sumiyoshi M., Taniguchi M. Geniposide prevents tumor growth by inhibiting colonic interleukin-1β and monocyte chemoattractant protein-1 via down-regulated expression of cyclooxygenase-2 and thymocyte selection-associated high mobility box proteins TOX/TOX2 in azoxymethane/dextran sulfate sodium-treated mice. // Int. Immunopharmacol. 2023. Т. 118. С. 110077.
514. Kindrick J.D., Mole D.R. Hypoxic regulation of gene transcription and chromatin: cause and effect. // Int. J. Mol. Sci. 2020. Т. 21. № 21.
515. Kiraly O. и др. Inflammation-induced cell proliferation potentiates DNA damage-induced mutations in vivo. // PLoS Genet. 2015. Т. 11. № 2. С. e1004901.
516. Kirova Y.I., Germanova E.L., Lukyanova L.D. Phenotypic features of the dynamics of HIF-1α levels in rat neocortex in different hypoxia regimens. // Bull. Exp. Biol. Med. 2013. Т. 154. № 6. С. 718–722.
517. Kitamura T., Qian B.-Z., Pollard J.W. Immune cell promotion of metastasis. // Nat. Rev. Immunol. 2015. Т. 15. № 2. С. 73–86.
518. Klausen T. и др. Hypoxemia increases serum interleukin-6 in humans. // Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol. 1997. Т. 76. № 5. С. 480–482.
519. Klemm F. и др. Interrogation of the microenvironmental landscape in brain tumors reveals disease-specific alterations of immune cells. // Cell. 2020. Т. 181. № 7. С. 1643-1660.e17.
520. Knechtel G. и др. Single nucleotide polymorphisms in the hypoxia-inducible factor-1 gene and colorectal cancer risk. // Mol. Carcinog. 2010. Т. 49. № 9. С. 805–809.
521. Kobliakov V.A. The mechanisms of regulation of aerobic glycolysis (warburg effect) by oncoproteins in carcinogenesis. // Biochemistry Mosc. 2019. Т. 84. № 10. С. 1117–1128.
522. Koca D. и др. Peritumoral tissue (PTT): increasing need for naming convention. // Br. J. Cancer. 2024. Т. 131. № 7. С. 1111–1115.
523. Kocarnik J.M. и др. Long-term weight loss after colorectal cancer diagnosis is associated with lower survival: The Colon Cancer Family Registry. // Cancer. 2017. Т. 123. № 23. С. 4701–4708.
524. Koebel C.M. и др. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. // Nature. 2007. Т. 450. № 7171. С. 903–907.
525. Kole A., Maloy K.J. Control of intestinal inflammation by interleukin-10. // Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2014. Т. 380. С. 19–38.
526. Kolenchukova O.A., Sarmatova N.I., Moshev A.V. Phagocytic activity of blood monocytes in response to methicillin-resistant strains of Staphylococcus aureus // Russian Journal of Infection and Immunity. 2020. Т. 10. № 3. С. 551–557.
527. Kolios G. Animal models of inflammatory bowel disease: how useful are they really? // Curr. Opin. Gastroenterol. 2016. Т. 32. № 4. С. 251–257.

528. Kondylis V. и др. The interplay of IKK, NF-κB and RIPK1 signaling in the regulation of cell death, tissue homeostasis and inflammation. // Immunol. Rev. 2017. Т. 277. № 1. С. 113–127.
529. Koong A.C. и др. Pancreatic tumors show high levels of hypoxia. // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2000. Т. 48. № 4. С. 919–922.
530. Korbecki J. и др. Chronic and cycling hypoxia: drivers of cancer chronic inflammation through HIF-1 and NF-κB activation: a review of the molecular mechanisms. // Int. J. Mol. Sci. 2021. Т. 22. № 19.
531. Koshiji M. и др. HIF-1alpha induces genetic instability by transcriptionally downregulating MutSalpha expression. // Mol. Cell. 2005. Т. 17. № 6. С. 793–803.
532. Kosyreva A.M. и др. Age-specific features of hypoxia tolerance and intensity of lipopolysaccharide-induced systemic inflammatory response in Wistar rats. // Bull. Exp. Biol. Med. 2019. Т. 166. № 5. С. 699–703.
533. Kosyreva A.M. и др. Sex differences of inflammatory and immune response in pups of Wistar rats with SIRS. // Sci. Rep. 2020. Т. 10. № 1. С. 15884.
534. Kosyreva A.M. и др. Alzheimer's disease and inflammaging. // Brain Sci. 2022. Т. 12. № 9.
535. Kosyreva A.M. и др. *Ex vivo* production of IL-1β and IL-10 by activated blood cells of Wistar rats with different resistance to hypoxia after systemic inflammatory response syndrome // Bull. Exp. Biol. Med. 2023. № 3. С. 290-296.
536. Koyama Y. и др. A new therapy against ulcerative colitis via the intestine and brain using the Si-based agent. // Sci. Rep. 2022. Т. 12. № 1. С. 9634.
537. Koyasu S. и др. Regulatory mechanisms of hypoxia-inducible factor 1 activity: Two decades of knowledge. // Cancer Sci. 2018. Т. 109. № 3. С. 560–571.
538. Kozera B., Rapacz M. Reference genes in real-time PCR. // J. Appl. Genet. 2013. Т. 54. № 4. С. 391–406.
539. Krieg M. и др. Up-regulation of hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha under normoxic conditions in renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor gene loss of function. // Oncogene. 2000. Т. 19. № 48. С. 5435–5443.
540. Kufe D.W. MUC1-C oncoprotein as a target in breast cancer: activation of signaling pathways and therapeutic approaches. // Oncogene. 2013. Т. 32. № 9. С. 1073–1081.
541. Kugimiya T. и др. Effects of drug-induced reduction in oxyhemoglobin affinity on survival time of mice in severe hypoxic conditions. // Tohoku J. Exp. Med. 1984. Т. 144. № 3. С. 315–320.
542. Kumari R., Sunil D., Ningthoujam R.S. Hypoxia-responsive nanoparticle based drug delivery systems in cancer therapy: An up-to-date review. // J. Control. Release. 2020. Т. 319. С. 135–156.
543. Kumar S. и др. High altitude head and neck paragangliomas: a first Sub-Himalayan experience. // OTO Open. 2024. Т. 8. № 1. С. e112.
544. Kuraishy A., Karin M., Grivennikov S.I. Tumor promotion via injury- and death-induced inflammation. // Immunity. 2011. Т. 35. № 4. С. 467–477.
545. Kurhaluk N., Tkaczenko H. Recent issues in the development and application of targeted therapies with respect to individual animal variability // Animals. 2025. Т. 15. № 3. С. 444.
546. Kurhaluk N. The Effectiveness of L-arginine in clinical conditions associated with hypoxia. // Int. J. Mol. Sci. 2023. Т. 24. № 9.
547. Kurkowiak M. и др. The effects of RNA editing in cancer tissue at different stages in carcinogenesis. // RNA Biol. 2021. Т. 18. № 11. С. 1524–1539.
548. Laconi E., Marongiu F., DeGregori J. Cancer as a disease of old age: changing mutational and microenvironmental landscapes. // Br. J. Cancer. 2020. Т. 122. № 7. С. 943–952.
549. Ladoire S., Martin F., Ghiringhelli F. Prognostic role of FOXP3+ regulatory T cells infiltrating human carcinomas: the paradox of colorectal cancer. // Cancer Immunol. Immunother. 2011. Т. 60. № 7. С. 909–918.
550. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. // Nature. 1970. Т. 227. № 5259. С. 680–685.
551. Lagou M.K., Karagiannis G.S. Obesity-induced thymic involution and cancer risk. // Semin. Cancer Biol. 2023. Т. 93. С. 3–19.

552. Lai H.-H. и др. HIF-1α promotes autophagic proteolysis of Dicer and enhances tumor metastasis. // J. Clin. Invest. 2018. Т. 128. № 2. С. 625–643.
553. Lai Y.-S. и др. Autocrine VEGF signalling on M2 macrophages regulates PD-L1 expression for immunomodulation of T cells. // J. Cell. Mol. Med. 2019. Т. 23. № 2. С. 1257–1267.
554. Lakatos P.-L., Lakatos L. Risk for colorectal cancer in ulcerative colitis: changes, causes and management strategies. // World J. Gastroenterol. 2008. Т. 14. № 25. С. 3937–3947.
555. Lam J.H. и др. CD30+OX40+ Treg is associated with improved overall survival in colorectal cancer. // Cancer Immunol. Immunother. 2021. Т. 70. № 8. С. 2353–2365.
556. Lambert A.W., Pattabiraman D.R., Weinberg R.A. Emerging biological principles of metastasis. // Cell. 2017. Т. 168. № 4. С. 670–691.
557. Lan T., Chen L., Wei X. Inflammatory cytokines in cancer: comprehensive understanding and clinical progress in gene therapy. // Cells. 2021. Т. 10. № 1. С. 100.
558. Lando D. и др. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. // Genes Dev. 2002. Т. 16. № 12. С. 1466–1471.
559. Larson J., Park T.J. Extreme hypoxia tolerance of naked mole-rat brain. // Neuroreport. 2009. Т. 20. № 18. С. 1634–1637.
560. Lartigau E. и др. Intratumoral oxygen tension in metastatic melanoma. // Melanoma Res. 1997. Т. 7. № 5. С. 400–406.
561. Lasry A., Zinger A., Ben-Neriah Y. Inflammatory networks underlying colorectal cancer. // Nat. Immunol. 2016. Т. 17. № 3. С. 230–240.
562. Laughner E. и др. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. // Mol. Cell. Biol. 2001. Т. 21. № 12. С. 3995–4004.
563. Laumont C.M. и др. Tumour-infiltrating B cells: immunological mechanisms, clinical impact and therapeutic opportunities. // Nat. Rev. Cancer. 2022. Т. 22. № 7. С. 414–430.
564. Le Berre C., Honap S., Peyrin-Biroulet L. Ulcerative colitis. // Lancet. 2023. Т. 402. № 10401. С. 571–584.
565. Leach R.M., Treacher D.F. Oxygen transport-2. Tissue hypoxia. // BMJ. 1998. Т. 317. № 7169. С. 1370–1373.
566. Ledoux A.C., Perkins N.D. NF-κB and the cell cycle. // Biochem. Soc. Trans. 2014. Т. 42. № 1. С. 76–81.
567. Lee C.-H. и др. Interleukin-1 beta transactivates epidermal growth factor receptor via the CXCL1-CXCR2 axis in oral cancer. // Oncotarget. 2015. Т. 6. № 36. С. 38866–38880.
568. Lee C.Z.W., Ginhoux F. Biology of resident tissue macrophages. // Development. 2022. Т. 149. № 8.
569. Lee H.S., Kim W.J. The Role of Matrix Metalloproteinase in Inflammation with a Focus on Infectious Diseases. // Int. J. Mol. Sci. 2022. Т. 23. № 18.
570. Lee M.K.S. и др. Glycolysis is required for LPS-induced activation and adhesion of human CD14+CD16- monocytes. // Front. Immunol. 2019. Т. 10. С. 2054.
571. Lee S.-H., Golinska M., Griffiths J.R. HIF-1-independent mechanisms regulating metabolic adaptation in hypoxic cancer cells. // Cells. 2021. Т. 10. № 9.
572. Lee S.-H., Lee H., Park R. Systemic immune modulation induced by ephedrine in obese-diabetes (db/db) mice. // Curr. Issues Mol. Biol. 2023. Т. 45. № 12. С. 10097–10108.
573. Leentjens J. и др. Trained innate immunity as a novel mechanism linking infection and the development of atherosclerosis. // Circ. Res. 2018. Т. 122. № 5. С. 664–669.
574. Lérias J.R. и др. Trained immunity for personalized cancer immunotherapy: current knowledge and future opportunities. // Front. Microbiol. 2019. Т. 10. С. 2924.
575. Leun A.M. van der, Thommen D.S., Schumacher T.N. CD8+ T cell states in human cancer: insights from single-cell analysis. // Nat. Rev. Cancer. 2020. Т. 20. № 4. С. 218–232.
576. Levine A.J., Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. // Nat. Rev. Cancer. 2009. Т. 9. № 10. С. 749–758.

577. Li C.-W. и др. Epithelial-mesenchymal transition induced by TNF-α requires NF-κB-mediated transcriptional upregulation of Twist1. // Cancer Res. 2012. Т. 72. № 5. С. 1290–1300.
578. Li C. и др. Mouse models for application in colorectal cancer: understanding the pathogenesis and relevance to the human condition. // Biomedicines. 2022. Т. 10. № 7.
579. Li D. и др. Association between HIF1A P582S and A588T polymorphisms and the risk of urinary cancers: a meta-analysis. // PLoS ONE. 2013. Т. 8. № 5. С. e63445.
580. Li H.-N. и др. HIF-1α rs11549465 C>T polymorphism contributes to increased cancer susceptibility: Evidence from 49 studies. // J. Cancer. 2019. Т. 10. № 24. С. 5955–5963.
581. Li H. и др. Underlying mechanisms and drug intervention strategies for the tumour microenvironment. // J. Exp. Clin. Cancer Res. 2021. Т. 40. № 1. С. 97.
582. Li J.F. и др. The prognostic value of peritumoral regulatory T cells and its correlation with intratumoral cyclooxygenase-2 expression in clear cell renal cell carcinoma. // BJU Int. 2009. Т. 103. № 3. С. 399–405.
583. Li L.T. и др. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review). // Mol. Med. Report. 2015. Т. 11. № 3. С. 1566–1572.
584. Li Q., Barres B.A. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. // Nat. Rev. Immunol. 2018. Т. 18. № 4. С. 225–242.
585. Li Q., Lan P. Activation of immune signals during organ transplantation. // Signal Transduct. Target. Ther. 2023. Т. 8. № 1. С. 110.
586. Li Q.-Y. и др. Roxadustat: Do we know all the answers? // Biomol. Biomed. 2023a. Т. 23. № 3. С. 354–363.
587. Li S.-Y. и др. Anti-Tumor Strategies by Harnessing the Phagocytosis of Macrophages. // Cancers (Basel). 2023б. Т. 15. № 10.
588. Li W., Graeber M.B. The molecular profile of microglia under the influence of glioma. // Neuro Oncol. 2012. Т. 14. № 8. С. 958–978.
589. Li X. и др. High altitude hypoxia and oxidative stress: The new hope brought by free radical scavengers. // Life Sci. 2024. Т. 336. С. 122319.
590. Li Y. и др. Hypoxia-induced CCR7 expression via HIF-1α and HIF-2α correlates with migration and invasion in lung cancer cells // Cancer Biol. Ther. 2009. Т. 8. № 4. С. 322–330.
591. Li Y. и др. MiR-150 regulates human keratinocyte proliferation in hypoxic conditions through targeting HIF-1α and VEGFA: Implications for psoriasis treatment. // PLoS ONE. 2017. Т. 12. № 4. С. e0175459.
592. Li Y. и др. Prognostic evaluation of colorectal cancer using three new comprehensive indexes related to infection, anemia and coagulation derived from peripheral blood. // J. Cancer. 2020a. Т. 11. С. 3834–3845.
593. Li Y., Zhao L., Li X.-F. Targeting hypoxia: hypoxia-activated prodrugs in cancer therapy. // Front. Oncol. 2021. Т. 11. С. 700407.
594. Li Y. и др. Methods to match high-intensity interval exercise intensity in hypoxia and normoxia - A pilot study. // J. Exerc. Sci. Fit. 2022. Т. 20. № 1. С. 70–76.
595. Li Y. и др. Potential anti-tumor effects of regulatory T cells in the tumor microenvironment: a review. // J. Transl. Med. 2024. Т. 22. № 1. С. 293.
596. Li Z. и др. Inhibiting the NF-κB pathway enhances the antitumor effect of cabazitaxel by downregulating Bcl-2 in pancreatic cancer. // Int. J. Oncol. 2020б. Т. 57. № 1. С. 161–170.
597. Liebl M.C., Hofmann T.G. The role of p53 signaling in colorectal cancer. // Cancers (Basel). 2021. Т. 13. № 9.
598. Lin B. и др. Tumor-infiltrating lymphocytes: Warriors fight against tumors powerfully. // Biomed. Pharmacother. 2020. Т. 132. С. 110873.
599. Lin K.-H. и др. Astaxanthin, a carotenoid, stimulates immune responses by enhancing IFN-γ and IL-2 secretion in primary cultured lymphocytes *in vitro* and *ex vivo*. // Int. J. Mol. Sci. 2015. Т. 17. № 1.
600. Lingappan K. NF-κB in oxidative stress. // Curr. Opin. Toxicol. 2018. Т. 7. С. 81–86.

601. Lippitz B.E. Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. // Lancet Oncol. 2013. Т. 14. № 6. C. e218-28.
602. Liu C.H. и др. Imaging inflammation and its resolution in health and disease: current status, clinical needs, challenges, and opportunities. // FASEB J. 2019. Т. 33. № 12. C. 13085–13097.
603. Liu H. и др. Suppression of the NF-κB signaling pathway in colon cancer cells by the natural compound Riccardin D from Dumortierahirsute. // Mol. Med. Report. 2018. Т. 17. № 4. C. 5837–5843.
604. Liu J. и др. New insights into M1/M2 macrophages: key modulators in cancer progression. // Cancer Cell Int. 2021a. Т. 21. № 1. C. 389.
605. Liu J. и др. Hypoxic preconditioning rejuvenates mesenchymal stem cells and enhances neuroprotection following intracerebral hemorrhage via the miR-326-mediated autophagy. // Stem Cell Res. Ther. 2021б. Т. 12. № 1. C. 413.
606. Liu Q. и др. Association between Ki67 expression and therapeutic outcome in colon cancer. // Oncol. Lett. 2023. Т. 25. № 6. C. 272.
607. Liu S. и др. Isocitrate dehydrogenase (IDH) status prediction in histopathology images of gliomas using deep learning. // Sci. Rep. 2020. Т. 10. № 1. C. 7733.
608. Liu T. и др. NF-κB signaling in inflammation. // Signal Transduct. Target. Ther. 2017. Т. 2. C. 17023.
609. Liu Y., Beyer A., Aebersold R. On the dependency of cellular protein levels on mRNA abundance. // Cell. 2016. Т. 165. № 3. C. 535–550.
610. Liu Y.V. и др. RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1alpha and is required for O(2)-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1alpha. // Mol. Cell. 2007. Т. 25. № 2. C. 207–217.
611. Liu Z.-L. и др. Angiogenic signaling pathways and anti-angiogenic therapy for cancer. // Signal Transduct. Target. Ther. 2023. Т. 8. № 1. C. 198.
612. Liu Z.-W. и др. Duality of interactions between TGF-β and TNF-α during tumor formation. // Front. Immunol. 2021в. Т. 12. C. 810286.
613. Loberg R.D. и др. The lethal phenotype of cancer: the molecular basis of death due to malignancy. // CA Cancer J. Clin. 2007. Т. 57. № 4. C. 225–241.
614. Loboda A., Jozkowicz A., Dulak J. HIF-1 and HIF-2 transcription factors--similar but not identical. // Mol. Cells. 2010. Т. 29. № 5. C. 435–442.
615. Locati M., Curtale G., Mantovani A. Diversity, mechanisms, and significance of macrophage plasticity. // Annu. Rev. Pathol. 2020. Т. 15. C. 123–147.
616. Lokhonina A. и др. Activated macrophages of monocytic origin predominantly express proinflammatory cytokine genes, whereas Kupffer cells predominantly express anti-inflammatory cytokine genes. // Biomed Res. Int. 2019. Т. 2019. C. 3912142.
617. Lopez-Castejon G., Brough D. Understanding the mechanism of IL-1β secretion. // Cytokine Growth Factor Rev. 2011. Т. 22. № 4. C. 189–195.
618. Lu H. и др. Plasma cytokine profiling to predict susceptibility to acute mountain sickness. // Eur. Cytokine Netw. 2016. Т. 27. № 4. C. 90–96.
619. Lu H. и др. Plasma proteomic study of acute mountain sickness susceptible and resistant individuals. // Sci. Rep. 2018. Т. 8. № 1. C. 1265.
620. Lu J. и др. Hypoxia-inducible factor-1α and erythropoietin expression in the hippocampus of neonatal rats following hypoxia-ischemia. // J. Nanosci. Nanotechnol. 2014. Т. 14. № 8. C. 5614–5619.
621. Lu S.-C. и др. The essential role of Oct-2 in LPS-induced expression of iNOS in RAW 264.7 macrophages and its regulation by trichostatin A. // Am J Physiol, Cell Physiol. 2009. Т. 296. № 5. C. C1133-9.
622. Luchian I. и др. The role of Matrix Metalloproteinases (MMP-8, MMP-9, MMP-13) in periodontal and peri-implant pathological processes. // Int. J. Mol. Sci. 2022. Т. 23. № 3.
623. Lukyanova L.D., Kirova Y.I. Mitochondria-controlled signaling mechanisms of brain protection in hypoxia. // Front. Neurosci. 2015. Т. 9. C. 320.
624. Luo Z. и др. Hypoxia signaling in human health and diseases: implications and prospects for therapeutics. // Signal Transduct. Target. Ther. 2022. Т. 7. № 1. C. 218.

625. Lv X. и др. The role of hypoxia-inducible factors in tumor angiogenesis and cell metabolism. // Genes Dis. 2017. Т. 4. № 1. С. 19–24.
626. Lyons T.W., Reinhard C.T., Planavsky N.J. The rise of oxygen in Earth's early ocean and atmosphere. // Nature. 2014. Т. 506. № 7488. С. 307–315.
627. Lyzhko N.A. Molecular-genetic mechanisms of initiation, promotion and progression of tumors // Rossijskij bioterapevtičeskij žurnal. 2017. Т. 16. № 4. С. 7–17.
628. Ma Q. и др. MUC1 regulates AKT signaling pathway by upregulating EGFR expression in ovarian cancer cells. // Pathol. Res. Pract. 2021. Т. 224. С. 153509.
629. Ma R.-Y., Black A., Qian B.-Z. Macrophage diversity in cancer revisited in the era of single-cell omics. // Trends Immunol. 2022a. Т. 43. № 7. С. 546–563.
630. Ma X. и др. Hypoxia-inducible factor 2α (HIF-2α) promotes colon cancer growth by potentiating Yes-associated protein 1 (YAP1) activity. // J. Biol. Chem. 2017. Т. 292. № 41. С. 17046–17056.
631. Ma Z. и др. Targeting hypoxia-inducible factor-1, for cancer treatment: Recent advances in developing small-molecule inhibitors from natural compounds. // Semin. Cancer Biol. 2022б. Т. 80. С. 379–390.
632. Macciò A. и др. The role of inflammation, iron, and nutritional status in cancer-related anemia: results of a large, prospective, observational study. // Haematologica. 2015. Т. 100. № 1. С. 124–132.
633. Madan A., Varma S., Cohen H.J. Developmental stage-specific expression of the alpha and beta subunits of the HIF-1 protein in the mouse and human fetus. // Mol. Genet. Metab. 2002. Т. 75. № 3. С. 244–249.
634. Mähler M. и др. Differential susceptibility of inbred mouse strains to dextran sulfate sodium-induced colitis. // Am. J. Physiol. 1998. Т. 274. № 3. С. G544-51.
635. Makarova O.V. и др. Morphological and functional changes in the immune system of BALB/c and C57BL/6 mice in chronic bacterial gram-negative endotoxicosis. // Arkhiv patologii. 2012. Т. 74. № 3. С. 43–48.
636. Maleev D. Defining a highly skilled ski-racer's body individual resistance to acute hypoxia // Bulletin of the South Ural State University. Series: Education, health, physical culture. 2015. Т. 15. № 4. С. 19–23.
637. Mallet R.T. и др. Molecular mechanisms of high-altitude acclimatization. // Int. J. Mol. Sci. 2023. Т. 24. № 2.
638. Malyla V. и др. Recent advances in experimental animal models of lung cancer. // Future Med. Chem. 2020. Т. 12. № 7. С. 567–570.
639. Mantovani A., Allavena P., Sica A. Tumour-associated macrophages as a prototypic type II polarised phagocyte population: role in tumour progression. // Eur. J. Cancer. 2004a. Т. 40. № 11. С. 1660–1667.
640. Mantovani A. и др. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. // Trends Immunol. 2004. Т. 25. № 12. С. 677–686.
641. Mantovani A. и др. Cancer-related inflammation. // Nature. 2008. Т. 454. № 7203. С. 436–444.
642. Mantovani A. и др. Cancer-promoting tumor-associated macrophages: new vistas and open questions. // Eur. J. Immunol. 2011. Т. 41. № 9. С. 2522–2525.
643. Mantovani A. и др. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. // Nat. Rev. Clin. Oncol. 2017. Т. 14. № 7. С. 399–416.
644. Mantovani G. и др. Cancer-related anorexia/cachexia syndrome and oxidative stress: an innovative approach beyond current treatment. // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2004б. Т. 13. № 10. С. 1651–1659.
645. Manuelli V. и др. Regulation of redox signaling in HIF-1-dependent tumor angiogenesis. // FEBS J. 2022. Т. 289. № 18. С. 5413–5425.
646. Mao K. и др. Nitric oxide suppresses NLRP3 inflammasome activation and protects against LPS-induced septic shock. // Cell Res. 2013. Т. 23. № 2. С. 201–212.
647. Marcos R., Monteiro R.A., Rocha E. The use of design-based stereology to evaluate volumes and numbers in the liver: a review with practical guidelines. // Journal of Anatomy. 2012. Т. 4. № 220. С. 303–317.

648. Marincola Smith P. и др. Colon epithelial cell TGFβ signaling modulates the expression of tight junction proteins and barrier function in mice. // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2021. Т. 320. № 6. С. G936–G957.
649. Martel C. de и др. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. // Lancet Glob. Health. 2020. Т. 8. № 2. С. e180–e190.
650. Martínez-Gregorio H. и др. Early detection of colorectal cancer somatic mutations using cfDNA liquid biopsies in a murine carcinogenesis model. // J. Cancer. 2022. Т. 13. № 13. С. 3404–3414.
651. Martins F. и др. Hypoxia and macrophages act in concert towards a beneficial outcome in colon cancer. // Cancers (Basel). 2020. Т. 12. № 4.
652. Martins G.R. и др. Proinflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines Mediated by NF-κB Factor as Prognostic Markers in Mammary Tumors. // Mediators Inflamm. 2016. Т. 2016. С. 9512743.
653. Mathieu J. и др. HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells. // Cancer Res. 2011. Т. 71. № 13. С. 4640–4652.
654. Mathur S., Chen S., Rejniak K.A. Exploring chronic and transient tumor hypoxia for predicting the efficacy of hypoxia-activated pro-drugs. // NPJ Syst. Biol. Appl. 2024. Т. 10. № 1. С. 1.
655. Mazumdar J. и др. HIF-2alpha deletion promotes Kras-driven lung tumor development. // Proc Natl Acad Sci USA. 2010. Т. 107. № 32. С. 14182–14187.
656. Maul J. и др. Peripheral and intestinal regulatory CD4+ CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease. // Gastroenterology. 2005. Т. 128. № 7. С. 1868–1878.
657. Mayr F.B., Yende S., Angus D.C. Epidemiology of severe sepsis. // Virulence. 2014. Т. 5. № 1. С. 4–11.
658. Mazeda I. и др. VEGF expression in colorectal cancer metastatic lymph nodes: clinicopathological correlation and prognostic significance. // Gastrointest. Disord. 2020. Т. 2. № 3. С. 267–280.
659. McAllister S.S., Weinberg R.A. The tumour-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis. // Nat. Cell Biol. 2014. Т. 16. № 8. С. 717–727.
660. McCoach C.E., Bivona T.G. The evolving understanding of immunoediting and the clinical impact of immune escape. // J. Thorac. Dis. 2018. Т. 10. № 3. С. 1248–1252.
661. McGettrick A.F., O'Neill L.A.J. The role of HIF in immunity and inflammation. // Cell Metab. 2020. Т. 32. № 4. С. 524–536.
662. McKeown S.R. Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours-implications for treatment response. // Br. J. Radiol. 2014. Т. 87. № 1035. С. 20130676.
663. McLean M.H. и др. The inflammatory microenvironment in colorectal neoplasia. // PLoS ONE. 2011. Т. 6. № 1. С. e15366.
664. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. // Nature. 2008. Т. 454. № 7203. С. 428–435.
665. Meguro R. и др. Perfusion-Perls and -Turnbull methods supplemented by DAB intensification for nonheme iron histochemistry: demonstration of the superior sensitivity of the methods in the liver, spleen, and stomach of the rat. // Histochem. Cell Biol. 2003. Т. 120. № 1. С. 73–82.
666. Melgar S., Karlsson A., Michaëlsson E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2005. Т. 288. № 6. С. G1328-38.
667. Merga Y., Campbell B.J., Rhodes J.M. Mucosal barrier, bacteria and inflammatory bowel disease: possibilities for therapy. // Dig. Dis. 2014. Т. 32. № 4. С. 475–483.
668. Millán I. и др. Oxidative stress in the newborn period: useful biomarkers in the clinical setting. // Antioxidants (Basel). 2018. Т. 7. № 12.
669. Millet G.P., Burtscher M., Burtscher J. Is hypoxic/altitude training an important topic in the field of hypoxia? // J. Sci. Sport Exercise. 2022. Т. 4. № 4. С. 293–305.
670. Milne A.N. и др. Nature meets nurture: molecular genetics of gastric cancer. // Hum. Genet. 2009. Т. 126. № 5. С. 615–628.
671. Milosevic M. и др. The human tumor microenvironment: invasive (needle) measurement of oxygen and interstitial fluid pressure // Semin. Radiat. Oncol. 2004. Т. 14. № 3. С. 249–258.

672. Mironova G.D. и др. Functioning of the mitochondrial ATP-dependent potassium channel in rats varying in their resistance to hypoxia. Involvement of the channel in the process of animal's adaptation to hypoxia. // J. Bioenerg. Biomembr. 2010. Т. 42. № 6. С. 473–481.
673. Mironova G.D. и др. Effect of hypoxia on mitochondrial enzymes and ultrastructure in the brain cortex of rats with different tolerance to oxygen shortage. // J. Bioenerg. Biomembr. 2019. Т. 51. № 5. С. 329–340.
674. Mittal M. и др. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. // Antioxid. Redox Signal. 2014. Т. 20. № 7. С. 1126–1167.
675. Mo Z. и др. Hypoxic characteristic in the immunosuppressive microenvironment of hepatocellular carcinoma. // Front. Immunol. 2021. Т. 12. С. 611058.
676. Moldogazieva N.T., Mokhosoev I.M., Terentiev A.A. Metabolic Heterogeneity of Cancer Cells: An Interplay between HIF-1, GLUTs, and AMPK. // Cancers (Basel). 2020. Т. 12. № 4.
677. Mommert S. и др. Histamine up-regulates oncostatin M expression in human M1 macrophages. // Br. J. Pharmacol. 2020. Т. 177. № 3. С. 600–613.
678. Montégut L., López-Otín C., Kroemer G. Aging and cancer. // Mol. Cancer. 2024. Т. 23. № 1. С. 106.
679. Montgomery S.T. и др. Hypoxia and sterile inflammation in cystic fibrosis airways: mechanisms and potential therapies. // Eur. Respir. J. 2017. Т. 49. № 1.
680. Moore L.G. Measuring high-altitude adaptation. // J. Appl. Physiol. 2017. Т. 123. № 5. С. 1371–1385.
681. Moreno-Celis U., García-Gasca T., Mejía C. Apoptosis-Induced Compensatory Proliferation in Cancer // Metastasis / C.M. Sergi. Brisbane (AU): Exon Publications. 2022.
682. Mori D.N. и др. Inflammatory triggers of acute rejection of organ allografts. // Immunol. Rev. 2014. Т. 258. № 1. С. 132–144.
683. Mörner M.E.M. и др. Preoperative anaemia and perioperative red blood cell transfusion as prognostic factors for recurrence and mortality in colorectal cancer-a Swedish cohort study. // Int. J. Colorectal Dis. 2017. Т. 32. № 2. С. 223–232.
684. Mouse Genome Sequencing Consortium и др. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. // Nature. 2002. Т. 420. № 6915. С. 520–562.
685. Movafagh A. и др. The significance application of indigenous phytohemagglutinin (PHA) mitogen on metaphase and cell culture procedure. // Iran. J. Pharm. Res. 2011. Т. 10. № 4. С. 895–903.
686. Mrakic-Sposta S. и др. OxInflammation at high altitudes: a proof of concept from the Himalayas. // Antioxidants (Basel). 2022. Т. 11. № 2.
687. Muinao T., Deka Boruah H.P., Pal M. Diagnostic and prognostic biomarkers in ovarian cancer and the potential roles of cancer stem cells - an updated review. // Exp. Cell Res. 2018. Т. 362. № 1. С. 1–10.
688. Mukhopadhyay S. и др. Differential colitis susceptibility of Th1- and Th2-biased mice: A multi-omics approach. // PLoS ONE. 2022. Т. 17. № 3. С. e0264400.
689. Müller S. и др. Whole blood stimulation as a tool for studying the human immune system. // Eur. J. Immunol. 2024. Т. 54. № 2. С. e2350519.
690. Munhoz R.R., Postow M.A. Recent advances in understanding antitumor immunity. // F1000Res. 2016. Т. 5. С. 2545.
691. Munn L.L. Cancer and inflammation. // Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med. 2017. Т. 9. № 2.
692. Murata M. и др. Role of nitrative and oxidative DNA damage in inflammation-related carcinogenesis. // J. Biomed. Biotechnol. 2012. Т. 2012. С. 623019.
693. Murata M. Inflammation and cancer. // Environ. Health Prev. Med. 2018. Т. 23. № 1. С. 50.
694. Murphy D.M., Mills K.H.G., Basdeo S.A. The effects of trained innate immunity on T cell responses; clinical implications and knowledge gaps for future research. // Front. Immunol. 2021. Т. 12. С. 706583.
695. Murray P.J. и др. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. // Immunity. 2014. Т. 41. № 1. С. 14–20.

696. Musher D.M., Abers M.S., Corrales-Medina V.F. Acute infection and myocardial infarction. // N. Engl. J. Med. 2019. Т. 380. № 2. С. 171–176.
697. Nagao-Kitamoto H., Kitamoto S., Kamada N. Inflammatory bowel disease and carcinogenesis. // Cancer Metastasis Rev. 2022. Т. 41. № 2. С. 301–316.
698. Nakamura T., Mizuno S. The discovery of hepatocyte growth factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine. // Proc. Jpn Acad. Ser. B, Phys. Biol. Sci. 2010. Т. 86. № 6. С. 588–610.
699. Nakanishi Y. и др. IFN-γ-dependent epigenetic regulation instructs colitogenic monocyte/macrophage lineage differentiation in vivo. // Mucosal Immunol. 2018. Т. 11. № 3. С. 871–880.
700. Nankabirwa V. и др. Child survival and BCG vaccination: a community based prospective cohort study in Uganda. // BMC Public Health. 2015. Т. 15. С. 175.
701. Narrandes S., Xu W. Gene expression detection assay for cancer clinical use. // J. Cancer. 2018. Т. 9. № 13. С. 2249–2265.
702. Nascimento-Gonçalves E. и др. Animal models of colorectal cancer: from spontaneous to genetically engineered models and their applications. // Veterinary Sciences. 2021. Т. 8. № 4.
703. Natalucci V. и др. Cancer related anemia: an integrated multitarget approach and lifestyle interventions. // Nutrients. 2021. Т. 13. № 2.
704. Natoli G., Ostuni R. Adaptation and memory in immune responses. // Nat. Immunol. 2019. Т. 20. № 7. С. 783–792.
705. Navarrete-Opazo A., Mitchell G.S. Therapeutic potential of intermittent hypoxia: a matter of dose. // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2014. Т. 307. № 10. С. R1181-97.
706. Ndubuizu O.I., Chavez J.C., LaManna J.C. Increased prolyl 4-hydroxylase expression and differential regulation of hypoxia-inducible factors in the aged rat brain. // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2009. Т. 297. № 1. С. R158-65.
707. Nebbia M., Yassin N.A., Spinelli A. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease. // Clin. Colon Rectal Surg. 2020. Т. 33. № 5. С. 305–317.
708. Nejsum L.N., Andersen Å.B. Infection and the role in cancer development. // APMIS. 2020. Т. 128. № 2. С. 71.
709. Nemanqani D.M. и др. Expression of epidermal growth factor receptor in colorectal adenocarcinoma and its correlation with clinicopathological factors. // J. Coll. Physicians Surg. Pak. 2018. Т. 28. № 7. С. 527–531.
710. Nenci A. и др. Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. // Nature. 2007. Т. 446. № 7135. С. 557–561.
711. Netea M.G., Quintin J., van der Meer J.W. Trained immunity: a memory for innate host defense. // Cell Host Microbe. 2011. Т. 9. № 5. С. 355–361.
712. Netea M.G. и др. Innate and adaptive immune memory: an evolutionary continuum in the host's response to pathogens. // Cell Host Microbe. 2019. Т. 25. № 1. С. 13–26.
713. Netea M.G. и др. Defining trained immunity and its role in health and disease. // Nat. Rev. Immunol. 2020. Т. 20. № 6. С. 375–388.
714. Ng P.C. и др. Diagnosis of late onset neonatal sepsis with cytokines, adhesion molecule, and C-reactive protein in preterm very low birthweight infants. // Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed. 1997. Т. 77. № 3. С. F221-7.
715. Ng T.H.S. и др. Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. // Front. Immunol. 2013. Т. 4. С. 129.
716. Nguyen D.X., Bos P.D., Massagué J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. // Nat. Rev. Cancer. 2009. Т. 9. № 4. С. 274–284.
717. Niedbala W. и др. Regulation of type 17 helper T-cell function by nitric oxide during inflammation. // Proc Natl Acad Sci USA. 2011. Т. 108. № 22. С. 9220–9225.
718. Nisar A. и др. The role of hypoxia in longevity // Aging Dis. 2025.
719. Nishikoba N. и др. HGF-MET signaling shifts M1 macrophages toward an M2-like phenotype through PI3K-mediated induction of arginase-1 expression. // Front. Immunol. 2020. Т. 11. С. 2135.

720. Nishimura T. и др. Individual variations and sex differences in hemodynamics and percutaneous arterial oxygen saturation (SpO2) in Tibetan highlanders of Tsarang in the Mustang district of Nepal. // J. Physiol. Anthropol. 2022. Т. 41. № 1. С. 9.
721. Nishiyama K. и др. Mouse CD11b+Kupffer cells recruited from bone marrow accelerate liver regeneration after partial hepatectomy. // PLoS ONE. 2015. Т. 10. № 9. С. e0136774.
722. Nissinen L., Kähäri V.-M. Matrix metalloproteinases in inflammation. // Biochim. Biophys. Acta. 2014. Т. 1840. № 8. С. 2571–2580.
723. Nojima T. и др. In-vitro derived germinal centre B cells differentially generate memory B or plasma cells in vivo. // Nat. Commun. 2011. Т. 2. С. 465.
724. Nonis S.G. и др. Structural and biochemical analyses of concanavalin A circular permutation by jack bean asparaginyl endopeptidase. // Plant Cell. 2021. Т. 33. № 8. С. 2794–2811.
725. Nora I. и др. The accuracy of neutrophil to lymphocyte ratio and platelet to lymphocyte ratio as a marker for gastrointestinal malignancies. // J. Gastrointest. Oncol. 2018. Т. 9. № 5. С. 972–978.
726. Nordsmark M., Overgaard M., Overgaard J. Pretreatment oxygenation predicts radiation response in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. // Radiother. Oncol. 1996. Т. 41. № 1. С. 31–39.
727. Nordsmark M. и др. The relationship between tumor oxygenation and cell proliferation in human soft tissue sarcomas // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 1996. Т. 35. № 4. С. 701–708.
728. Nøst T.H. и др. Systemic inflammation markers and cancer incidence in the UK Biobank. // Eur. J. Epidemiol. 2021. Т. 36. № 8. С. 841–848.
729. Okayasu I. и др. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. // Gastroenterology. 1990. Т. 98. № 3. С. 694–702.
730. Oh J. и др. Endoplasmic reticulum stress controls M2 macrophage differentiation and foam cell formation. // J. Biol. Chem. 2012. Т. 287. № 15. С. 11629–11641.
731. Oh S.A., Li M.O. TGF-β: guardian of T cell function. // J. Immunol. 2013. Т. 191. № 8. С. 3973–3979.
732. Oh S.Y. и др. A randomized phase II study to assess the effectiveness of fluid therapy or intensive nutritional support on survival in patients with advanced cancer who cannot be nourished via enteral route. // J. Palliat. Med. 2014. Т. 17. № 11. С. 1266–1270.
733. Olguín J.E. и др. Early and partial reduction in CD4+Foxp3+ regulatory T cells during colitis-associated colon cancer induces CD4+ and CD8+ T cell activation inhibiting tumorigenesis. // J. Cancer. 2018. Т. 9. № 2. С. 239–249.
734. Olingy C.E., Dinh H.Q., Hedrick C.C. Monocyte heterogeneity and functions in cancer. // J. Leukoc. Biol. 2019. Т. 106. № 2. С. 309–322.
735. Oliveira-Costa J.P. и др. Differential expression of HIF-1α in CD44+CD24-/low breast ductal carcinomas. // Diagn. Pathol. 2011. Т. 6. С. 73.
736. Ortiz-Prado E. и др. Partial pressure of oxygen in the human body: a general review. // Am. J. Blood Res. 2019. Т. 9. № 1. С. 1–14.
737. Ortmann B.M., Taylor C.T., Rocha S. Hypoxia research, where to now? // Trends Biochem. Sci. 2024. Т. 49. № 7. С. 573–582.
738. Ostapowicz J. и др. Understanding hypoxia-driven tumorigenesis: the interplay of HIF1A, DNA methylation, and prolyl hydroxylases in head and neck squamous cell carcinoma. // Int. J. Mol. Sci. 2024. Т. 25. № 12.
739. Pabla B., Bissonnette M., Konda V.J. Colon cancer and the epidermal growth factor receptor: Current treatment paradigms, the importance of diet, and the role of chemoprevention. // World J. Clin. Oncol. 2015. Т. 6. № 5. С. 133–141.
740. Pace N., Consolazio W.V., Lozner E.L. The effect of transfusions of red blood cells on the hypoxia tolerance of normal men. // Science. 1945. Т. 102. № 2658. С. 589–591.
741. Pacheco-Barcia V. и др. A systemic inflammation response index (SIRI) correlates with survival and predicts oncological outcome for mFOLFIRINOX therapy in metastatic pancreatic cancer. // Pancreatology. 2020. Т. 20. № 2. С. 254–264.

742. Padhy G. и др. Abundance of plasma antioxidant proteins confers tolerance to acute hypobaric hypoxia exposure. // High Alt. Med. Biol. 2013. Т. 14. № 3. С. 289–297.
743. Paek A.L. и др. Cell-to-cell variation in p53 dynamics leads to fractional killing. // Cell. 2016. Т. 165. № 3. С. 631–642.
744. Page L.K. и др. Influence of hypoxia on the epithelial-pathogen interactions in the lung: implications for respiratory disease. // Front. Immunol. 2021. Т. 12. С. 653969.
745. Pal S., Datta K., Mukhopadhyay D. Central role of p53 on regulation of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) expression in mammary carcinoma. // Cancer Res. 2001. Т. 61. № 18. С. 6952–6957.
746. Palmieri B., Sblendorio V. Oxidative stress tests: overview on reliability and use. Part I. // Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 2007. Т. 11. № 5. С. 309–342.
747. Pamenter M.E. и др. Cross-Species Insights Into Genomic Adaptations to Hypoxia. // Front. Genet. 2020. Т. 11. С. 743.
748. Pan D., Jia D. Application of single-cell multi-omics in dissecting cancer cell plasticity and tumor heterogeneity. // Front. Mol. Biosci. 2021. Т. 8. С. 757024.
749. Papoutsopoulou S. и др. Interleukin-10 deficiency impacts on TNF-Induced NFκB regulated responses in vivo. // Biology (Basel). 2022. Т. 11. № 10.
750. Park H.Y. и др. Chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer incidence in never smokers: a cohort study. // Thorax. 2020. Т. 75. № 6. С. 506–509.
751. Park M.H., Hong J.T. Roles of NF-κB in cancer and inflammatory diseases and their therapeutic approaches. // Cells. 2016. Т. 5. № 2.
752. Park T.J. и др. Fructose-driven glycolysis supports anoxia resistance in the naked mole-rat. // Science. 2017. Т. 356. № 6335. С. 307–311.
753. Parks S.K., Chiche J., Pouysségur J. Disrupting proton dynamics and energy metabolism for cancer therapy. // Nat. Rev. Cancer. 2013. Т. 13. № 9. С. 611–623.
754. Pascal R.R. Dysplasia and early carcinoma in inflammatory bowel disease and colorectal adenomas. // Hum. Pathol. 1994. Т. 25. № 11. С. 1160–1171.
755. Patel S.A., Simon M.C. Biology of hypoxia-inducible factor-2alpha in development and disease. // Cell Death Differ. 2008. Т. 15. № 4. С. 628–634.
756. Paterson D.I. и др. Incident cardiovascular disease among adults with cancer: a population-based cohort study. // JACC CardioOncol. 2022. Т. 4. № 1. С. 85–94.
757. Patot M.C.T. van, Gassmann M. Hypoxia: adapting to high altitude by mutating EPAS-1, the gene encoding HIF-2α. // High Alt. Med. Biol. 2011. Т. 12. № 2. С. 157–167.
758. Pavlatou M.G. и др. FORT and FORD: two simple and rapid assays in the evaluation of oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus. // Metab. Clin. Exp. 2009. Т. 58. № 11. С. 1657–1662.
759. Pavlik L.L. и др. Specific features of immediate ultrastructural changes in brain cortex mitochondria of rats with different tolerance to hypoxia under various modes of hypoxic exposures. // Bull. Exp. Biol. Med. 2018. Т. 164. № 3. С. 376–381.
760. Payen V.L. и др. Metabolic changes associated with tumor metastasis, part 1: tumor pH, glycolysis and the pentose phosphate pathway. // Cell. Mol. Life Sci. 2016. Т. 73. № 7. С. 1333–1348.
761. Pęczek P. и др. Cancer-associated inflammation: pathophysiology and clinical significance. // J. Cancer Res. Clin. Oncol. 2023. Т. 149. № 6. С. 2657–2672.
762. Pedros C. и др. Disrupted regulatory T cell homeostasis in inflammatory bowel diseases. // World J. Gastroenterol. 2016. Т. 22. № 3. С. 974–995.
763. Perera F.P. Environment and cancer: who are susceptible? // Science. 1997. Т. 278. № 5340. С. 1068–1073.
764. Pérez-Bucio C., Behere A., Landegren N. Mechanisms of autoimmune-mediated paraneoplastic syndromes: immune tolerance and disease pathogenesis. // Front. Immunol. 2025. Т. 16. С. 1608934.
765. Perkins N.D. The diverse and complex roles of NF-κB subunits in cancer. // Nat. Rev. Cancer. 2012. Т. 12. № 2. С. 121–132.
766. Perrone G. и др. Intratumoural FOXP3-positive regulatory T cells are associated with adverse prognosis in radically resected gastric cancer. // Eur. J. Cancer. 2008. Т. 44. № 13. С. 1875–1882.

767. Perše M., Cerar A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. // J. Biomed. Biotechnol. 2012. Т. 2012. С. 718617.
768. Persson A., Englund E. Different assessments of immunohistochemically stained Ki-67 and hTERT in glioblastoma multiforme yield variable results: a study with reference to survival prognosis. // Clin. Neuropathol. 2008. Т. 27. № 4. С. 224–233.
769. Pétervári E. и др. Age-dependence of alpha-MSH-induced anorexia. // Neuropeptides. 2010. Т. 44. № 4. С. 315–322.
770. Petrova V. и др. The hypoxic tumour microenvironment. // Oncogenesis. 2018. Т. 7. № 1. С. 10.
771. Peyssonnaux C. и др. HIF-1alpha expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. // J. Clin. Invest. 2005. Т. 115. № 7. С. 1806–1815.
772. Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. // Nucleic Acids Res. 2001. Т. 29. № 9. С. e45.
773. Pham K., Parikh K., Heinrich E.C. Hypoxia and inflammation: insights from high-altitude physiology. // Front. Physiol. 2021. Т. 12. С. 676782.
774. Philip M., Schietinger A. CD8+ T cell differentiation and dysfunction in cancer. // Nat. Rev. Immunol. 2022. Т. 22. № 4. С. 209–223.
775. Pierallini A. и др. Radiological assessment of necrosis in glioblastoma: variability and prognostic value. // Neuroradiology. 1998. Т. 40. № 3. С. 150–153.
776. Pikarsky E. и др. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. // Nature. 2004. Т. 431. № 7007. С. 461–466.
777. Pinzón Martín S., Seeberger P.H., Varón Silva D. Mucins and pathogenic mucin-like molecules are immunomodulators during infection and targets for diagnostics and vaccines. // Front. Chem. 2019. Т. 7. С. 710.
778. Piyush T. и др. Interaction of galectin-3 with MUC1 on cell surface promotes EGFR dimerization and activation in human epithelial cancer cells. // Cell Death Differ. 2017. Т. 24. № 11. С. 1937–1947.
779. Plotnikov E.Y., Zorov D.B. Pros and cons of use of mitochondria-targeted antioxidants. // Antioxidants (Basel). 2019. Т. 8. № 8.
780. Plotnikov E.Y. и др. Mechanisms of nephroprotective effect of mitochondria-targeted antioxidants under rhabdomyolysis and ischemia/reperfusion. // Biochim. Biophys. Acta. 2011. Т. 1812. № 1. С. 77–86.
781. Plummer M. и др. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. // Lancet Glob. Health. 2016. Т. 4. № 9. С. e609-16.
782. Poltavets A.S. и др. Macrophage modification strategies for efficient cell therapy. // Cells. 2020. Т. 9. № 6.
783. Polyak K., Weinberg R.A. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. // Nat. Rev. Cancer. 2009. Т. 9. № 4. С. 265–273.
784. Pomatto L.C.D., Davies K.J.A. Adaptive homeostasis and the free radical theory of ageing. // Free Radic. Biol. Med. 2018. Т. 124. С. 420–430.
785. Pösel C. и др. Density gradient centrifugation compromises bone marrow mononuclear cell yield. // PLoS ONE. 2012. Т. 7. № 12. С. e50293.
786. Post T.E. и др. Human hypoxia models in aerospace medicine: Potential applications for human pharmacological research. // Br. J. Clin. Pharmacol. 2024.
787. Portaluppi F., Smolensky M.H., Touitou Y. Ethics and methods for biological rhythm research on animals and human beings. // Chronobiol. Int. 2010. Т. 27. № 9–10. С. 1911–1929.
788. Postovalova E.A. и др. Morphology of the thymus and the specific features of its cellular composition in experimental acute and chronic ulcerative colitis. // Arkh. Patol. 2019. Т. 81. № 5. С. 53–63.
789. 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. e0101.

790. Pou K.M. и др. Visceral and subcutaneous adipose tissue volumes are cross-sectionally related to markers of inflammation and oxidative stress: the Framingham Heart Study. // Circulation. 2007. Т. 116. № 11. С. 1234–1241.
791. Prescott J.A., Mitchell J.P., Cook S.J. Inhibitory feedback control of NF-κB signalling in health and disease. // Biochem. J. 2021. Т. 478. № 13. С. 2619–2664.
792. Principi M. и др. Ulcerative colitis: from inflammation to cancer. Do estrogen receptors have a role? // World J. Gastroenterol. 2014. Т. 20. № 33. С. 11496–11504.
793. Prokhnevska N. и др. CD8+ T cell activation in cancer comprises an initial activation phase in lymph nodes followed by effector differentiation within the tumor. // Immunity. 2023. Т. 56. № 1. С. 107- 124.e5.
794. Pryczynicz A. и др. Bax protein may influence the invasion of colorectal cancer. // World J. Gastroenterol. 2014. Т. 20. № 5. С. 1305–1310.
795. Qannita R.A. и др. Targeting Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1) in cancer: emerging therapeutic strategies and pathway regulation. // Pharmaceuticals (Basel). 2024. Т. 17. № 2.
796. Qasim B.J., Ali H.H., Hussein A.G. Immunohistochemical expression of PCNA and CD34 in colorectal adenomas and carcinomas using specified automated cellular image analysis system: a clinicopathologic study. // Saudi J. Gastroenterol. 2012. Т. 18. № 4. С. 268–276.
797. Qi H. и др. Extrafollicular activation of lymph node B cells by antigen-bearing dendritic cells. // Science. 2006. Т. 312. № 5780. С. 1672–1676.
798. Qi P. и др. Effects of hypoxemia by acute high-altitude exposure on human intestinal flora and metabolism. // Microorganisms. 2023. Т. 11. № 9.
799. Qian B.-Z., Pollard J.W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. // Cell. 2010. Т. 141. № 1. С. 39–51.
800. Qu F. и др. The role of macrophage polarization in ulcerative colitis and its treatment. // Microb. Pathog. 2025. Т. 199. С. 107227.
801. Rani S. и др. Regulation of transactivation at C-TAD domain of HIF-1α by Factor-Inhibiting HIF-1α (FIH-1): a potential target for therapeutic intervention in cancer. // Oxid. Med. Cell. Longev. 2022. Т. 2022. С. 2407223.
802. Ranneh Y. и др. Crosstalk between reactive oxygen species and pro-inflammatory markers in developing various chronic diseases: a review // Appl. Biol. Chem. 2017. Т. 60. № 3. С. 327–338.
803. Rasheed S. и др. Hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha are expressed in most rectal cancers but only hypoxia-inducible factor-1alpha is associated with prognosis. // Br. J. Cancer. 2009. Т. 100. № 10. С. 1666–1673.
804. Rastogi S. и др. NF-κB mediated regulation of tumor cell proliferation in hypoxic microenvironment. // Front. Pharmacol. 2023. Т. 14. С. 1108915.
805. Ratcliffe P. и др. Update on hypoxia-inducible factors and hydroxylases in oxygen regulatory pathways: from physiology to therapeutics. // Hypoxia (Auckl). 2017. Т. 5. С. 11–20.
806. Ravindranath M.H., El Hilali F., Filippone E.J. The impact of inflammation on the immune responses to transplantation: tolerance or rejection? // Front. Immunol. 2021. Т. 12. С. 667834.
807. Raymond J., Segrè D. The effect of oxygen on biochemical networks and the evolution of complex life. // Science. 2006. Т. 311. № 5768. С. 1764–1767.
808. Raza S. и др. Analysis of the transcriptional networks underpinning the activation of murine macrophages by inflammatory mediators. // J. Leukoc. Biol. 2014. Т. 96. № 2. С. 167–183.
809. Raza S.M. и др. Necrosis and glioblastoma: a friend or a foe? A review and a hypothesis. // Neurosurgery. 2002. Т. 51. № 1. С. 2–12.
810. Reghefaoui M. и др. The role of serological markers in the prediction of disease course and response to therapy in inflammatory bowel disease. // Cureus. 2023. Т. 15. № 11. С. e48442.
811. Reichard A., Asosingh K. Best practices for preparing a single cell suspension from solid tissues for flow cytometry. // Cytometry A. 2019. Т. 95. № 2. С. 219–226.
812. Reifenberger G. и др. Molecular characterization of long-term survivors of glioblastoma using genome- and transcriptome-wide profiling. // Int. J. Cancer. 2014. Т. 135. № 8. С. 1822–1831.

813. Reinartz S. и др. Mixed-polarization phenotype of ascites-associated macrophages in human ovarian carcinoma: correlation of CD163 expression, cytokine levels and early relapse. // Int. J. Cancer. 2014. Т. 134. № 1. С. 32–42.
814. Ren G. и др. Selection and validation of reference genes for qPCR analysis of differentiation and maturation of THP-1 cells into M1 macrophage-like cells. // Immunol. Cell Biol. 2022. Т. 100. № 10. С. 822–829.
815. Ren J. и др. FAT10 mediates the effect of TNF-α in inducing chromosomal instability. // J. Cell Sci. 2011. Т. 124. № 21. С. 3665–3675.
816. Rey S., Semenza G.L. Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling. // Cardiovasc. Res. 2010. Т. 86. № 2. С. 236–242.
817. Riazy M., Chen J.H., Steinbrecher U.P. VEGF secretion by macrophages is stimulated by lipid and protein components of OxLDL via PI3-kinase and PKCzeta activation and is independent of OxLDL uptake. // Atherosclerosis. 2009. Т. 204. № 1. С. 47–54.
818. Ribatti D. The concept of immune surveillance against tumors. The first theories. // Oncotarget. 2017. Т. 8. № 4. С. 7175–7180.
819. Richalet J.-P., Hermand E., Lhuissier F.J. Cardiovascular physiology and pathophysiology at high altitude. // Nat. Rev. Cardiol. 2024. Т. 21. № 2. С. 75–88.
820. Richalet J.-P. The invention of hypoxia. // J. Appl. Physiol. 2021. Т. 130. № 5. С. 1573–1582.
821. Riffle S., Hegde R.S. Modeling tumor cell adaptations to hypoxia in multicellular tumor spheroids. // J. Exp. Clin. Cancer Res. 2017. Т. 36. № 1. С. 102.
822. Rinderknecht H. и др. The art of inducing hypoxia. // Oxygen. 2021. Т. 1. № 1. С. 46–61.
823. Rius J. и др. NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. // Nature. 2008. Т. 453. № 7196. С. 807–811.
824. Rivas S. и др. MET signaling pathways, resistance mechanisms, and opportunities for target therapies. // Int. J. Mol. Sci. 2022. Т. 23. № 22.
825. Robinson A. и др. Mucosal protection by hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibition. // Gastroenterology. 2008. Т. 134. № 1. С. 145–155.
826. Robinson N.B. и др. The current state of animal models in research: A review. // Int. J. Surg. 2019. Т. 72. С. 9–13.
827. Robles A.I. и др. Whole-Exome Sequencing Analyses of Inflammatory Bowel Disease-Associated Colorectal Cancers. // Gastroenterology. 2016. Т. 150. № 4. С. 931–943.
828. Rocha S. Gene regulation under low oxygen: holding your breath for transcription. // Trends Biochem. Sci. 2007. Т. 32. № 8. С. 389–397.
829. Roderburg C. и др. Heart failure is associated with an increased incidence of cancer diagnoses. // ESC Heart Fail. 2021. Т. 8. № 5. С. 3628–3633.
830. Rodrigues N.R. и др. p53 mutations in colorectal cancer. // Proc Natl Acad Sci USA. 1990. Т. 87. № 19. С. 7555–7559.
831. Rodriguez D. и др. Hypoxia pathway proteins and their impact on the blood vasculature. // Int. J. Mol. Sci. 2021. Т. 22. № 17.
832. Roerden M., Spranger S. Cancer immune evasion, immunoediting and intratumour heterogeneity. // Nat. Rev. Immunol. 2025.
833. Roma-Lavisse C. и др. M1 and M2 macrophage proteolytic and angiogenic profile analysis in atherosclerotic patients reveals a distinctive profile in type 2 diabetes. // Diab. Vasc. Dis. Res. 2015. Т. 12. № 4. С. 279–289.
834. Rossaint J., Zarbock A. Tissue-specific neutrophil recruitment into the lung, liver, and kidney. // J. Innate Immun. 2013. Т. 5. № 4. С. 348–357.
835. Roth G.S. и др. Pathological characterization of male Wistar rats from the gerontology research center. // J. Gerontol. 1993. Т. 48. № 6. С. B213-30.
836. Roxburgh C.S.D., McMillan D.C. Cancer and systemic inflammation: treat the tumour and treat the host. // Br. J. Cancer. 2014. Т. 110. № 6. С. 1409–1412.

837. Roy A. и др. Impact of interleukin-6 activation and arthritis on Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) activation in sensory neurons and the spinal cord. // Int. J. Mol. Sci. 2024. Т. 25. № 13.
838. Rozenblatt-Rosen O. и др. The Human Tumor Atlas Network: charting tumor transitions across space and time at single-cell resolution. // Cell. 2020. Т. 181. № 2. С. 236–249.
839. Sadowska A. и др. Expression of apoptotic proteins in human colorectal cancer and metastatic lymph nodes. // Pathol. Res. Pract. 2014. Т. 210. № 9. С. 576–581.
840. Sajjad H. и др. Cancer models in preclinical research: A chronicle review of advancement in effective cancer research. // Anim. Models Exp. Med. 2021. Т. 4. № 2. С. 87–103.
841. Saleh R., Elkord E. FoxP3+ T regulatory cells in cancer: Prognostic biomarkers and therapeutic targets. // Cancer Lett. 2020. Т. 490. С. 174–185.
842. Salemme V. и др. The crosstalk between tumor cells and the immune microenvironment in breast cancer: implications for immunotherapy. // Front. Oncol. 2021. Т. 11. С. 610303.
843. Salman S. и др. HIF inhibitor 32-134D eradicates murine hepatocellular carcinoma in combination with anti-PD1 therapy. // J. Clin. Invest. 2022. Т. 132. № 9.
844. Salmaninejad A. и др. Tumor-associated macrophages: role in cancer development and therapeutic implications. // Cell Oncol (Dordr). 2019. Т. 42. № 5. С. 591–608.
845. Salmeen A., Barford D. Functions and mechanisms of redox regulation of cysteine-based phosphatases. // Antioxid. Redox Signal. 2005. Т. 7. № 5–6. С. 560–577.
846. Salminen A., Kaarniranta K., Kauppinen A. Hypoxia-inducible histone lysine demethylases: impact on the aging process and age-related diseases. // Aging Dis. 2016. Т. 7. № 2. С. 180–200.
847. Salvatore L. и др. PTEN in colorectal cancer: shedding light on its role as predictor and target. // Cancers (Basel). 2019. Т. 11. № 11.
848. Santoiemma P.P., Powell D.J. Tumor infiltrating lymphocytes in ovarian cancer. // Cancer Biol. Ther. 2015. Т. 16. № 6. С. 807–820.
849. Saraiva M., O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. // Nat. Rev. Immunol. 2010. Т. 10. № 3. С. 170–181.
850. Sarnaik A.A. и др. Tumor-infiltrating lymphocytes: A new hope. // Cancer Cell. 2024. Т. 42. № 8. С. 1315–1318.
851. Saruta M. и др. Characterization of FOXP3+CD4+ regulatory T cells in Crohn's disease. // Clin. Immunol. 2007. Т. 125. № 3. С. 281–290.
852. Sasaki S. и др. Thymic involution correlates with severe ulcerative colitis induced by oral administration of dextran sulphate sodium in C57BL/6 mice but not in BALB/c mice. // Inflammation. 2008. Т. 31. № 5. С. 319–328.
853. Saugy J.J. и др. Comparison of "Live High-Train Low" in normobaric versus hypobaric hypoxia. // PLoS ONE. 2014. Т. 9. № 12. С. e114418.
854. Scandella E. и др. Dendritic cell-independent B cell activation during acute virus infection: a role for early CCR7-driven B-T helper cell collaboration. // J. Immunol. 2007. Т. 178. № 3. С. 1468–1476.
855. Schetter A.J. и др. Association of inflammation-related and microRNA gene expression with cancer-specific mortality of colon adenocarcinoma. // Clin. Cancer Res. 2009. Т. 15. № 18. С. 5878–5887.
856. Schito L., Rey-Keim S. Hypoxia signaling and metastatic progression. // Semin. Cancer Biol. 2023. Т. 97. С. 42–49.
857. Schito L., Semenza G.L. Hypoxia-Inducible Factors: master regulators of cancer progression. // Trends Cancer. 2016. Т. 2. № 12. С. 758–770.
858. Schmid M.C. и др. Integrin CD11b activation drives anti-tumor innate immunity. // Nat. Commun. 2018. Т. 9. № 1. С. 5379.
859. Schmilovitz-Weiss H. и др. Tissue expression of squamous cellular carcinoma antigen and Ki67 in hepatocellular carcinoma-correlation with prognosis: a historical prospective study. // Diagn. Pathol. 2011. Т. 6. С. 121.

860. Schmitt M., Greten F.R. The inflammatory pathogenesis of colorectal cancer. // Nat. Rev. Immunol. 2021. Т. 21. № 10. С. 653–667.
861. Schmitz K.J. и др. Combined analysis of hypoxia-inducible factor 1 alpha and metallothionein indicates an aggressive subtype of colorectal carcinoma. // Int. J. Colorectal Dis. 2009. Т. 24. № 11. С. 1287–1296.
862. Schödel J. и др. High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq. // Blood. 2011. Т. 117. № 23. С. e207-17.
863. Schönenberger M.J., Kovacs W.J. Hypoxia signaling pathways: modulators of oxygen-related organelles. // Front. Cell Dev. Biol. 2015. Т. 3. С. 42.
864. Schreiber K. и др. Impact of TCR diversity on the development of transplanted or chemically induced tumors. // Cancer Immunol. Res. 2020. Т. 8. № 2. С. 192–202.
865. Semenza G.L., Wang G.L. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. // Mol. Cell. Biol. 1992. Т. 12. № 12. С. 5447–5454.
866. Semenza G.L. и др. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. // J. Biol. Chem. 1996. Т. 271. № 51. С. 32529–32537.
867. Semenza G.L. Tumor metabolism: cancer cells give and take lactate. // J. Clin. Invest. 2008. Т. 118. № 12. С. 3835–3837.
868. Semenza G.L. Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1. // Semin. Cancer Biol. 2009. Т. 19. № 1. С. 12–16.
869. Semenza G.L. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. // Oncogene. 2010. Т. 29. № 5. С. 625–634.
870. Semenza G.L. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. // J. Clin. Invest. 2013. Т. 123. № 9. С. 3664–3671.
871. Semenza G.L. Pharmacologic Targeting of Hypoxia-Inducible Factors. // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2019. Т. 59. С. 379–403.
872. Semenza G.L. Breakthrough science: hypoxia-inducible factors, oxygen sensing, and disorders of hematopoiesis. // Blood. 2022. Т. 139. № 16. С. 2441–2449.
873. Semenza G.L. Regulation of Erythropoiesis by the Hypoxia-Inducible Factor Pathway: Effects of Genetic and Pharmacological Perturbations. // Annu. Rev. Med. 2023а. Т. 74. С. 307–319.
874. Semenza G.L. Targeting intratumoral hypoxia to enhance anti-tumor immunity. // Semin. Cancer Biol. 2023б. Т. 96. С. 5–10.
875. Semenza G.L. Clinical investigation of hypoxia-inducible factors: getting there. // J. Clin. Invest. 2024. Т. 134. № 3.
876. Senosain M.-F. и др. HLA-DR cancer cells expression correlates with T cell infiltration and is enriched in lung adenocarcinoma with indolent behavior. // Sci. Rep. 2021. Т. 11. № 1. С. 14424.
877. Senovilla L. и др. Trial watch: Prognostic and predictive value of the immune infiltrate in cancer. // Oncoimmunology. 2012. Т. 1. № 8. С. 1323–1343.
878. Sentyabreva A. и др. Morphological and molecular biological characteristics of experimental rat glioblastoma tissue strains induced by different carcinogenic chemicals. // Biomedicines. 2024. Т. 12. № 4.
879. Sen Banerjee S. и др. HIF-prolyl hydroxylases and cardiovascular diseases. // Toxicol. Mech. Methods. 2012. Т. 22. № 5. С. 347–358.
880. Sen R., Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. // Cell. 1986. Т. 46. № 5. С. 705–716.
881. Serebrovskaya T.V., Xi L. Intermittent hypoxia training as non-pharmacologic therapy for cardiovascular diseases: Practical analysis on methods and equipment. // Exp Biol Med (Maywood). 2016. Т. 241. № 15. С. 1708–1723.
882. Serebrovskaya T.V. Intermittent hypoxia research in the former Soviet Union and the commonwealth of independent States: history and review of the concept and selected applications. // High Alt. Med. Biol. 2002. Т. 3. № 2. С. 205–221.

883. Serebrovska Z.O. и др. Response of circulating inflammatory markers to intermittent hypoxia-hyperoxia training in healthy elderly people and patients with mild cognitive impairment. // Life (Basel). 2022. Т. 12. № 3.
884. Serocki M. и др. miRNAs regulate the HIF switch during hypoxia: a novel therapeutic target. // Angiogenesis. 2018. Т. 21. № 2. С. 183–202.
885. Shah S.C., Itzkowitz S.H. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: mechanisms and management. // Gastroenterology. 2022. Т. 162. № 3. С. 715- 730.e3.
886. Shah Y.M. и др. Intestinal hypoxia-inducible transcription factors are essential for iron absorption following iron deficiency. // Cell Metab. 2009. Т. 9. № 2. С. 152–164.
887. Shalapour S., Karin M. Immunity, inflammation, and cancer: an eternal fight between good and evil. // J. Clin. Invest. 2015. Т. 125. № 9. С. 3347–3355.
888. Shamis S.A.K., McMillan D.C., Edwards J. The relationship between hypoxia-inducible factor 1α (HIF-1α) and patient survival in breast cancer: Systematic review and meta-analysis. // Crit. Rev. Oncol. Hematol. 2021. Т. 159. С. 103231.
889. Shamsdin S.A. и др. Evaluation of VEGF, FGF and PDGF and Serum Levels of Inflammatory Cytokines in Patients with Glioma and Meningioma in Southern Iran. // Asian Pac. J. Cancer Prev. 2019. Т. 20. № 10. С. 2883–2890.
890. Sharma A., Sinha S., Shrivastava N. Therapeutic targeting Hypoxia-Inducible Factor (HIF-1) in cancer: cutting Gordian Knot of cancer cell metabolism. // Front. Genet. 2022. Т. 13. С. 849040.
891. Sharma H., Moroni L. Recent advancements in regenerative approaches for thymus rejuvenation. // Adv Sci (Weinh). 2021. Т. 8. № 14. С. 2100543.
892. Sharpe M.A. и др. Hijacking sexual immuno-privilege in GBM-an immuno-evasion strategy. // Int. J. Mol. Sci. 2021. Т. 22. № 20.
893. Shenoy A.K. и др. Transition from colitis to cancer: high Wnt activity sustains the tumor-initiating potential of colon cancer stem cell precursors. // Cancer Res. 2012. Т. 72. № 19. С. 5091–5100.
894. Shen C. и др. Genetic and functional studies implicate HIF1α as a 14q kidney cancer suppressor gene. // Cancer Discov. 2011. Т. 1. № 3. С. 222–235.
895. Sheng Y.H. и др. The MUC13 cell-surface mucin protects against intestinal inflammation by inhibiting epithelial cell apoptosis. // Gut. 2011. Т. 60. № 12. С. 1661–1670.
896. Shi X. и др. TGF-β signaling in the tumor metabolic microenvironment and targeted therapies. // J. Hematol. Oncol. 2022. Т. 15. № 1. С. 135.
897. Shi X. и др. Emerging nanomedicines for macrophage-mediated cancer therapy. // Biomaterials. 2025. Т. 316. С. 123028.
898. Shi Y. и др. Changes of immunocytic phenotypes and functions from human colorectal adenomatous stage to cancerous stage: Update. // Immunobiology. 2015. Т. 220. № 10. С. 1186–1196.
899. Shimoda L.A., Semenza G.L. HIF and the lung: role of hypoxia-inducible factors in pulmonary development and disease. // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2011. Т. 183. № 2. С. 152–156.
900. Shinawi T. и др. DNA methylation profiles of long- and short-term glioblastoma survivors. // Epigenetics. 2013. Т. 8. № 2. С. 149–156.
901. Si J. и др. Hypoxia-induced activation of HIF-1alpha/IL-1beta axis in microglia promotes glioma progression via NF-κB-mediated upregulation of heparanase expression. // Biol. Direct. 2024. Т. 19. № 1. С. 45.
902. Sica A. и др. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. // Eur. J. Cancer. 2006. Т. 42. № 6. С. 717–727.
903. Siegel R.L., Giaquinto A.N., Jemal A. Cancer statistics, 2024. // CA Cancer J. Clin. 2024. Т. 74. № 1. С. 12–49.
904. Sierra J.R., Tsao M.-S. c-MET as a potential therapeutic target and biomarker in cancer. // Ther. Adv. Med. Oncol. 2011. Т. 3. № 1 Suppl. С. S21-35.
905. Silina M.V., Dzhalilova D.S., Makarova O.V. Role of micrornas in regulation of cellular response to hypoxia. // Biochemistry Mosc. 2023. Т. 88. № 6. С. 741–757.

906. Simeonov K.P., Himmelstein D.S. Lung cancer incidence decreases with elevation: evidence for oxygen as an inhaled carcinogen. // PeerJ. 2015. Т. 3. С. e705.
907. Simonart T., Van Vooren J.-P. Interleukin-1 beta increases the BCL-2/BAX ratio in Kaposi's sarcoma cells. // Cytokine. 2002. Т. 19. № 6. С. 259–266.
908. Simonson T.S. Altitude adaptation: A glimpse through various lenses. // High Alt. Med. Biol. 2015. Т. 16. № 2. С. 125–137.
909. Simsek T. и др. The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. // Cell Stem Cell. 2010. Т. 7. № 3. С. 380–390.
910. Singer D. Neonatal tolerance to hypoxia: a comparative-physiological approach. // Comp Biochem Physiol, Part A Mol Integr Physiol. 1999. Т. 123. № 3. С. 221–234.
911. Singhal R., Shah Y.M. Oxygen battle in the gut: Hypoxia and hypoxia-inducible factors in metabolic and inflammatory responses in the intestine. // J. Biol. Chem. 2020. Т. 295. № 30. С. 10493–10505.
912. Singhal R. и др. HIF-2α activation potentiates oxidative cell death in colorectal cancers by increasing cellular iron. // J. Clin. Invest. 2021. Т. 131. № 12. С. e143691.
913. Sinha S. и др. Different adaptation patterns of antioxidant system in natives and sojourners at high altitude. // Respir. Physiol. Neurobiol. 2009. Т. 167. № 3. С. 255–260.
914. Sistigu A. и др. Deciphering the loop of epithelial-mesenchymal transition, inflammatory cytokines and cancer immunoediting. // Cytokine Growth Factor Rev. 2017. Т. 36. С. 67–77.
915. Sklavenitis-Pistofidis R., Getz G., Ghobrial I. Single-cell RNA sequencing: one step closer to the clinic. // Nat. Med. 2021. Т. 27. № 3. С. 375–376.
916. Skurikhin E.G. и др. Cell therapy with human reprogrammed CD8+ T-cells has antimetastatic effects on Lewis Lung Carcinoma in C57BL/6 mice. // Int. J. Mol. Sci. 2022. Т. 23. № 24.
917. Skurikhin E. и др. Effects of reprogrammed splenic CD8+ T-cells *in vitro* and in mice with spontaneous metastatic Lewis lung carcinoma. // BMC Cancer. 2024. Т. 24. № 1. С. 522.
918. Slaats J. и др. IL-1β/IL-6/CRP and IL-18/ferritin: Distinct Inflammatory Programs in Infections. // PLoS Pathog. 2016. Т. 12. № 12. С. e1005973.
919. Smids C. и др. Intestinal T cell profiling in inflammatory bowel disease: linking T cell subsets to disease activity and disease course. // J. Crohns Colitis. 2018. Т. 12. № 4. С. 465–475.
920. Smith A.J. и др. Somatic APC and K-ras codon 12 mutations in aberrant crypt foci from human colons. // Cancer Res. 1994. Т. 54. № 21. С. 5527–5530.
921. Smith G. и др. Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative genetic pathways to colorectal cancer. // Proc Natl Acad Sci USA. 2002. Т. 99. № 14. С. 9433–9438.
922. Sobti R.C., Ganguly N.K., Kumar R. Handbook of oncobiology: from basic to clinical sciences. // 2024.
923. Soerjomataram I., Bray F. Planning for tomorrow: global cancer incidence and the role of prevention 2020-2070. // Nat. Rev. Clin. Oncol. 2021. Т. 18. № 10. С. 663–672.
924. Sojka L. и др. MUC13-miRNA-4647 axis in colorectal cancer: Prospects to identifications of risk factors and clinical outcomes. // Oncol. Lett. 2023. Т. 25. № 2. С. 72.
925. Sokolova I.M., Sokolov E.P., Haider F. Mitochondrial mechanisms underlying tolerance to fluctuating oxygen conditions: lessons from hypoxia-tolerant organisms. // Integr. Comp. Biol. 2019. Т. 59. № 4. С. 938–952.
926. Song G. и др. Emerging nanotechnology and advanced materials for cancer radiation therapy. // Adv. Mater. 2017. Т. 29. № 32.
927. Song L., Lee C., Schindler C. Deletion of the murine scavenger receptor CD68. // J. Lipid Res. 2011. Т. 52. № 8. С. 1542–1550.
928. Song R. и др. P53 suppresses cell proliferation, metastasis, and angiogenesis of osteosarcoma through inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway. // Int. J. Surg. 2015. Т. 20. С. 80–87.
929. Song Y. и др. Disruption of the thymic microenvironment is associated with thymic involution of transitional cell cancer. // Urol. Int. 2014. Т. 92. № 1. С. 104–115.
930. Sonveaux P. и др. Targeting the lactate transporter MCT1 in endothelial cells inhibits lactate-induced HIF-1 activation and tumor angiogenesis. // PLoS ONE. 2012. Т. 7. № 3. С. e33418.

931. Soree P. и др. Raised HIF1α during normoxia in high altitude pulmonary edema susceptible non-mountaineers. // Sci. Rep. 2016. Т. 6. С. 26468.
932. Sorokin M. и др. Large-scale assessment of pros and cons of autopsy-derived or tumor-matched tissues as the norms for gene expression analysis in cancers. // Comput. Struct. Biotechnol. J. 2023. Т. 21. С. 3964–3986.
933. Souza E. и др. Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibitors: a paradigm shift for treatment of anemia in chronic kidney disease? // Expert Opin. Investig. Drugs. 2020. Т. 29. № 8. С. 831–844.
934. Souza H.S.P. de, Fiocchi C. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. // Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2016. Т. 13. № 1. С. 13–27.
935. Souza J.L.N. и др. Evaluation of reference genes for gene expression analysis by real-time quantitative PCR (qPCR) in different tissues from mice infected by Ascaris suum. // Microb. Pathog. 2024. Т. 189. С. 106567.
936. Șovrea A.S. и др. Multiple faces of the glioblastoma microenvironment. // Int. J. Mol. Sci. 2022. Т. 23. № 2.
937. Specht H. и др. Single-cell proteomic and transcriptomic analysis of macrophage heterogeneity using SCoPE2. // Genome Biol. 2021. Т. 22. № 1. С. 50.
938. Spiegelberg L. и др. Hypoxia-activated prodrugs and (lack of) clinical progress: The need for hypoxia-based biomarker patient selection in phase III clinical trials. // Clinical and Translational Radiation Oncology. 2019. Т. 15. С. 62–69.
939. Srivastava N. и др. Hypoxia: syndicating triple negative breast cancer against various therapeutic regimens. // Front. Oncol. 2023. Т. 13. С. 1199105.
940. Staudt L.M. Oncogenic activation of NF-kappaB. // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2010. Т. 2. № 6. С. a000109.
941. Stefani C. и др. Growth factors, pi3k/akt/mtor and MAPK signaling pathways in colorectal cancer pathogenesis: where are we now? // Int. J. Mol. Sci. 2021. Т. 22. № 19.
942. Steiniger S.C.J. и др. Chemotherapy of glioblastoma in rats using doxorubicin-loaded nanoparticles. // Int. J. Cancer. 2004. Т. 109. № 5. С. 759–767.
943. Stewart C.J.R., Crook M.L., Doherty D.A. Micro-anatomical variation in cellular proliferation in endometrial adenocarcinoma, and inverse correlation between Ki67 and cytokeratin 7 expression. // Histopathology. 2010. Т. 57. № 1. С. 46–54.
944. Stintzing S. и др. Understanding the role of primary tumour localisation in colorectal cancer treatment and outcomes. // Eur. J. Cancer. 2017. Т. 84. С. 69–80.
945. Stone M.L. и др. Hepatocytes coordinate immune evasion in cancer via release of serum amyloid A proteins. // Nat. Immunol. 2024. Т. 25. № 5. С. 755–763.
946. Stothers C.L. и др. Hypoxia-inducible factor-1α regulation of myeloid cells. // J. Mol. Med. 2018. Т. 96. № 12. С. 1293–1306.
947. Strizova Z. и др. M1/M2 macrophages and their overlaps - myth or reality? // Clin. Sci. 2023. Т. 137. № 15. С. 1067–1093.
948. Suarez-Carmona M. и др. EMT and inflammation: inseparable actors of cancer progression. // Mol. Oncol. 2017. Т. 11. № 7. С. 805–823.
949. Sun X., Kaufman P.D. Ki-67: more than a proliferation marker. // Chromosoma. 2018. Т. 127. № 2. С. 175–186.
950. Sundaram G.M., Quah S., Sampath P. Cancer: the dark side of wound healing. // FEBS J. 2018. Т. 285. № 24. С. 4516–4534.
951. Susta D., Dudnik E., Glazachev O.S. A programme based on repeated hypoxia-hyperoxia exposure and light exercise enhances performance in athletes with overtraining syndrome: a pilot study. // Clin. Physiol. Funct. Imaging. 2017. Т. 37. № 3. С. 276–281.
952. Suzuki A. и др. Acidic extracellular pH promotes epithelial mesenchymal transition in Lewis lung carcinoma model. // Cancer Cell Int. 2014. Т. 14. № 1. С. 129.
953. Suzuki R. и др. Strain differences in the susceptibility to azoxymethane and dextran sodium sulfate-induced colon carcinogenesis in mice. // Carcinogenesis. 2006. Т. 27. № 1. С. 162–169.

954. Suzuki R. и др. Smad2/3 linker phosphorylation is a possible marker of cancer stem cells and correlates with carcinogenesis in a mouse model of colitis-associated colorectal cancer. // J Crohns Colitis. 2015. Т. 9. № 7. С. 565–574.
955. Swann J.B., Smyth M.J. Immune surveillance of tumors. // J. Clin. Invest. 2007. Т. 117. № 5. С. 1137–1146.
956. Szlendak M. и др. Expression of cyclooxygenase-2 and mucin 1 in colorectal cancer. // Mol. Clin. Oncol. 2020. Т. 13. № 5. С. 52.
957. Tacchini L. и др. Hepatocyte growth factor signalling stimulates hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) activity in HepG2 hepatoma cells. // Carcinogenesis. 2001. Т. 22. № 9. С. 1363–1371.
958. Tafani M. и др. The interplay of reactive oxygen species, hypoxia, inflammation, and sirtuins in cancer initiation and progression. // Oxid. Med. Cell. Longev. 2016. Т. 2016. С. 3907147.
959. Takasaki C. и др. Expression of hypoxia-inducible factor-1α affects tumor proliferation and antiapoptosis in surgically resected lung cancer. // Mol. Clin. Oncol. 2016. Т. 5. № 2. С. 295–300.
960. Takeda N. и др. Endothelial PAS domain protein 1 gene promotes angiogenesis through the transactivation of both vascular endothelial growth factor and its receptor, Flt-1. // Circ. Res. 2004. Т. 95. № 2. С. 146–153.
961. Talks K.L. и др. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. // Am. J. Pathol. 2000. Т. 157. № 2. С. 411–421.
962. Talla U. и др. Prolonged exposure to hypoxia induces an autophagy-like cell survival program in human neutrophils. // J. Leukoc. Biol. 2019. Т. 106. № 6. С. 1367–1379.
963. Tambuwala M.M. и др. Targeted delivery of the hydroxylase inhibitor DMOG provides enhanced efficacy with reduced systemic exposure in a murine model of colitis. // J. Control. Release. 2015. Т. 217. С. 221–227.
964. Tan G. и др. HMGB1 released from GSDME-mediated pyroptotic epithelial cells participates in the tumorigenesis of colitis-associated colorectal cancer through the ERK1/2 pathway. // J. Hematol. Oncol. 2020. Т. 13. № 1. С. 149.
965. Tan Q. и др. Potential roles of IL-1 subfamily members in glycolysis in disease. // Cytokine Growth Factor Rev. 2018. Т. 44. С. 18–27.
966. Tanaka T. и др. A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. // Cancer Sci. 2003. Т. 94. № 11. С. 965–973.
967. Tang X.-G. и др. Age as a risk factor for acute mountain sickness upon rapid ascent to 3,700 m among young adult Chinese men. // Clin. Interv. Aging. 2014. Т. 9. С. 1287–1294.
968. Taniguchi K., Karin M. NF-κB, inflammation, immunity and cancer: coming of age. // Nat. Rev. Immunol. 2018. Т. 18. № 5. С. 309–324.
969. Tanimura Y. и др. Long-term model of colitis-associated colorectal cancer suggests tumor spread mechanism and nature of cancer stem cells. // Oncol. Lett. 2021. Т. 21. № 1. С. 7.
970. Tannahill G.M. и др. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1β through HIF-1α. // Nature. 2013. Т. 496. № 7444. С. 238–242.
971. Tateyama M. и др. CCR7+ myeloid dendritic cells together with CCR7+ T cells and CCR7+ macrophages invade CCL19+ nonnecrotic muscle fibers in inclusion body myositis. // J. Neurol. Sci. 2009. Т. 279. № 1–2. С. 47–52.
972. Taylor C.T., Scholz C.C. The effect of HIF on metabolism and immunity. // Nat. Rev. Nephrol. 2022. Т. 18. № 9. С. 573–587.
973. Teixeira D. и др. The metabolic and neuroinflammatory changes induced by consuming a cafeteria diet are age-dependent. // Nutr. Neurosci. 2017. С. 1–11.
974. Teng M.W.L. и др. From mice to humans: developments in cancer immunoediting. // J. Clin. Invest. 2015. Т. 125. № 9. С. 3338–3346.
975. Teufel L.U. и др. IL-1 family cytokines as drivers and inhibitors of trained immunity. // Cytokine. 2022. Т. 150. С. 155773.
976. The Paris endoscopic classification of superficial neoplastic lesions: esophagus, stomach, and colon: November 30 to December 1, 2002. // Gastrointest. Endosc. 2003. Т. 58. № 6 Suppl. С. S3-43.

977. Thiersch M., Swenson E.R. High altitude and cancer mortality. // High Alt. Med. Biol. 2018. T. 19. № 2. C. 116–123.
978. Thiersch M. и др. Reduced cancer mortality at high altitude: The role of glucose, lipids, iron and physical activity. // Exp. Cell Res. 2017. T. 356. № 2. C. 209–216.
979. Thomlinson R.H., Gray L.H. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. // Br. J. Cancer. 1955. T. 9. № 4. C. 539–549.
980. Tian R. и др. Adaptive Evolution of Energy Metabolism-Related Genes in Hypoxia-Tolerant Mammals. // Front. Genet. 2017. T. 8. C. 205.
981. Timon R. и др. Intermittent hypoxia as a therapeutic tool to improve health parameters in older adults. // Int. J. Environ. Res. Public Health. 2022. T. 19. № 9.
982. Tkaczenko H. и др. Elucidation of the role of L-arginine and Nω-Nitro-L-arginine in the treatment of rats with different levels of hypoxic tolerance and exposure to lead nitrate. // Cell. Physiol. Biochem. 2024. T. 58. № 4. C. 336–360.
983. Togashi Y., Shitara K., Nishikawa H. Regulatory T cells in cancer immunosuppression - implications for anticancer therapy. // Nat. Rev. Clin. Oncol. 2019. T. 16. № 6. C. 356–371.
984. Toledo R.A. и др. Hypoxia-Inducible Factor 2 Alpha (HIF2α) inhibitors: targeting genetically driven tumor hypoxia. // Endocr. Rev. 2023. T. 44. № 2. C. 312–322.
985. Tomasetti C., Vogelstein B. Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. // Science. 2015. T. 347. № 6217. C. 78–81.
986. Tomasin R., Martin A.C.B.M., Cominetti M.R. Metastasis and cachexia: alongside in clinics, but not so in animal models. // J. Cachexia Sarcopenia Muscle. 2019. T. 10. № 6. C. 1183–1194.
987. Torres J. и др. Gastric cancer incidence and mortality is associated with altitude in the mountainous regions of Pacific Latin America. // Cancer Causes Control. 2013. T. 24. № 2. C. 249–256.
988. Tosolini M. и др. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. // Cancer Res. 2011. T. 71. № 4. C. 1263–1271.
989. Toufektchan E., Toledo F. The guardian of the genome revisited: p53 downregulates genes required for telomere maintenance, DNA repair, and centromere structure. // Cancers (Basel). 2018. T. 10. № 5.
990. Tran T.A.T. и др. Whole blood assay as a model for in vitro evaluation of inflammasome activation and subsequent caspase-mediated interleukin-1 beta release. // PLoS ONE. 2019. T. 14. № 4. C. e0214999.
991. Tregub P., Kulikov V., Bespalov A. Tolerance to acute hypoxia maximally increases in case of joint effect of normobaric hypoxia and permissive hypercapnia in rats. // Pathophysiology. 2013. T. 20. № 3. C. 165–170.
992. Tregub P.P. и др. Relationship between hypoxia and hypercapnia tolerance and life expectancy. // Int. J. Mol. Sci. 2024a. T. 25. № 12.
993. Tregub P.P. и др. Molecular mechanisms of neuroprotection after the intermittent exposures of hypercapnic hypoxia. // Int. J. Mol. Sci. 2024б. T. 25. № 7.
994. Triner D., Shah Y.M. Hypoxia-inducible factors: a central link between inflammation and cancer. // J. Clin. Invest. 2016. T. 126. № 10. C. 3689–3698.
995. Trinh V.H. и др. Redox regulation of PTEN by reactive oxygen species: its role in physiological processes. // Antioxidants (Basel). 2024. T. 13. № 2.
996. Trivedi D.D., Dalai S.K., Bakshi S.R. The mystery of cancer resistance: A revelation within nature. // J. Mol. Evol. 2023. T. 91. № 2. C. 133–155.
997. Trivedi P.P., Jena G.B. Dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis leads to increased hematopoiesis and induces both local as well as systemic genotoxicity in mice. // Mutat. Res. 2012. T. 744. № 2. C. 172–183.
998. Troiano G. и др. Prognostic significance of CD68+ and CD163+ tumor associated macrophages in head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. // Oral Oncol. 2019. T. 93. C. 66–75.
999. Tsai Y.-P., Wu K.-J. Epigenetic regulation of hypoxia-responsive gene expression: focusing on chromatin and DNA modifications. // Int. J. Cancer. 2014. T. 134. № 2. C. 249–256.

1000. Tuano K.S., Seth N., Chinen J. Secondary immunodeficiencies: An overview. // Ann. Allergy Asthma Immunol. 2021. Т. 127. № 6. С. 617–626.
1001. Tuomisto A.E., Mäkinen M.J., Väyrynen J.P. Systemic inflammation in colorectal cancer: Underlying factors, effects, and prognostic significance. // World J. Gastroenterol. 2019. Т. 25. № 31. С. 4383–4404.
1002. Turizo-Smith A.D. и др. Inflammation and cancer: friend or foe? // Front. Pharmacol. 2024. Т. 15. С. 1385479.
1003. Uden P. van, Kenneth N.S., Rocha S. Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB. // Biochem. J. 2008. Т. 412. № 3. С. 477–484.
1004. Uden P. van и др. Evolutionary conserved regulation of HIF-1β by NF-κB. // PLoS Genet. 2011. Т. 7. № 1. С. e1001285.
1005. Ugel S. и др. Immune tolerance to tumor antigens occurs in a specialized environment of the spleen. // Cell Rep. 2012. Т. 2. № 3. С. 628–639.
1006. Ülger Y., Delik A. Paraneoplastic syndrome frequency and prognostic effect in hepatocellular carcinoma patients. // Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 2022. Т. 34. № 7. С. 769–773.
1007. Ullman T.A., Itzkowitz S.H. Intestinal inflammation and cancer. // Gastroenterology. 2011. Т. 140. № 6. С. 1807–1816.
1008. Ungefroren H. Autocrine TGF-β in cancer: review of the literature and caveats in experimental analysis. // Int. J. Mol. Sci. 2021. Т. 22. № 2.
1009. Urakov A. и др. Cardiology, respiratory failure, and tolerance of hypoxia in the context of COVID-19: a multidisciplinary perspective. // Rev. Cardiovasc. Med. 2022. Т. 23. № 1. С. 21.
1010. Urban J.L. и др. Mechanisms of syngeneic tumor rejection. Susceptibility of host-selected progressor variants to various immunological effector cells. // J. Exp. Med. 1982. Т. 155. № 2. С. 557–573.
1011. Uyar A. и др. The Protective Role of Urtica dioica Seed Extract Against Azoxymethane-Induced Colon Carcinogenesis in Rats. // Nutr. Cancer. 2022. Т. 74. № 1. С. 306–319.
1012. Valacchi G. и др. Oxinflammation: from subclinical condition to pathological biomarker. // Front. Physiol. 2018. Т. 9. С. 858.
1013. Van Der Kraak L., Gros P., Beauchemin N. Colitis-associated colon cancer: Is it in your genes? // World J. Gastroenterol. 2015. Т. 21. № 41. С. 11688–11699.
1014. Van Raemdonck K. и др. CCL21/CCR7 signaling in macrophages promotes joint inflammation and Th17-mediated osteoclast formation in rheumatoid arthritis. // Cell. Mol. Life Sci. 2020. Т. 77. № 7. С. 1387–1399.
1015. Varlotto J., Stevenson M.A. Anemia, tumor hypoxemia, and the cancer patient. // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2005. Т. 63. № 1. С. 25–36.
1016. Vaupel P., Flood A.B., Swartz H.M. Oxygenation status of malignant tumors vs. normal tissues: critical evaluation and updated data source based on direct measurements with pO2 microsensors. // Appl. Magn. Reson. 2021. Т. 52. № 10. С. 1451–1479.
1017. Vaupel P., Höckel M., Mayer A. Detection and characterization of tumor hypoxia using pO2 histography. // Antioxid. Redox Signal. 2007. Т. 9. № 8. С. 1221–1235.
1018. Vaupel P., Schmidberger H., Mayer A. The Warburg effect: essential part of metabolic reprogramming and central contributor to cancer progression. // Int. J. Radiat. Biol. 2019. Т. 95. № 7. С. 912–919.
1019. Vedunova M.V. и др. Antihypoxic and neuroprotective properties of bdnf and GDNF *in vitro* and *in vivo* under hypoxic conditions // CTM J. 2014. Т. 6. № 4. С. 38–45.
1020. Veglia F., Sanseviero E., Gabrilovich D.I. Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity. // Nat. Rev. Immunol. 2021. Т. 21. № 8. С. 485–498.
1021. Velázquez K.T. и др. Weight loss following diet-induced obesity does not alter colon tumorigenesis in the AOM mouse model. // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2016. Т. 311. № 4. С. G699–G712.
1022. Venkatachalam K. и др. Biochemical and molecular aspects of 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced colon carcinogenesis: a review. // Toxicol Res (Camb). 2020. Т. 9. № 1. С. 2–18.

1023. Verges S. и др. Hypoxic conditioning as a new therapeutic modality. // Front. Pediatr. 2015. Т. 3. С. 58.
1024. Verrecchia F. и др. Tumor necrosis factor-alpha inhibits transforming growth factor-beta /Smad signaling in human dermal fibroblasts via AP-1 activation. // J. Biol. Chem. 2000. Т. 275. № 39. С. 30226–30231.
1025. Villareal L.B. и др. Hypoxia-inducible factor 3α1 increases epithelial-to-mesenchymal transition and iron uptake to drive colorectal cancer liver metastasis. // Br. J. Cancer. 2024. Т. 130. № 12. С. 1904–1915.
1026. Vinson K.E. и др. The Notch pathway in colorectal cancer. // Int. J. Cancer. 2016. Т. 138. № 8. С. 1835–1842.
1027. Virchow R. Cellular pathology as based upon physiological and pathological histology. // London, 1858.
1028. Vishnyakova P. и др. Unravelling approaches to study macrophages: from classical to novel biophysical methodologies. // PeerJ. 2025. Т. 13. С. e19039.
1029. Visser K.E. de, Joyce J.A. The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth. // Cancer Cell. 2023. Т. 41. № 3. С. 374–403.
1030. Voelkl B. и др. Reproducibility of animal research in light of biological variation. // Nat. Rev. Neurosci. 2020. Т. 21. № 7. С. 384–393.
1031. Vries N.L. de и др. The immunogenicity of colorectal cancer in relation to tumor development and treatment. // Int. J. Mol. Sci. 2016. Т. 17. № 7.
1032. Wakasugi N. и др. Defective IFN-gamma production in the human neonate. II. Role of increased sensitivity to the suppressive effects of prostaglandin E. // J. Immunol. 1985. Т. 134. № 1. С. 172–176.
1033. Waldner M.J., Neurath M.F. Mechanisms of immune signaling in colitis-associated cancer. // CMGH Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology. 2015. Т. 1. № 1. С. 6–16.
1034. Waldum H. Dysfunction of von-Hippel Lindau factor causes reduced degradation of HIF leading to renal cancer. Hypoxia-inducible factor-prolyl hydroxylase enzyme inhibitors also lessen HIF destruction and could therefore increase renal cancer. // Front. Pharmacol. 2023. Т. 14. С. 1170796.
1035. Wan R. и др. The role of hypoxia inducible factor-1α in the increased MMP-2 and MMP-9 production by human monocytes exposed to nickel nanoparticles. // Nanotoxicology. 2011. Т. 5. № 4. С. 568–582.
1036. Wang C., Li Q., Ren J. Microbiota-immune interaction in the pathogenesis of gut-derived infection. // Front. Immunol. 2019. Т. 10. С. 1873.
1037. Wang C., Pan Z., Jin Y. F-53B induces hepatotoxic effects and slows self-healing in ulcerative colitis in mice. // Environ. Pollut. 2023a. Т. 317. С. 120819.
1038. Wang D.J. и др. NF-κB functions in tumor initiation by suppressing the surveillance of both innate and adaptive immune cells. // Cell Rep. 2014. Т. 9. № 1. С. 90–103.
1039. Wang G. и др. PI3K stimulates DNA synthesis and cell-cycle progression via its p55PIK regulatory subunit interaction with PCNA. // Mol. Cancer Ther. 2013. Т. 12. № 10. С. 2100–2109.
1040. Wang G. и др. Advances in the targeting of HIF-1α and future therapeutic strategies for glioblastoma multiforme (Review). // Oncol. Rep. 2017. Т. 37. № 2. С. 657–670.
1041. Wang G.-P., Xu C.-S. Reference gene selection for real-time RT-PCR in eight kinds of rat regenerating hepatic cells. // Mol. Biotechnol. 2010. Т. 46. № 1. С. 49–57.
1042. Wang J. и др. Novel tumor-associated macrophage populations and subpopulations by single cell RNA sequencing. // Front. Immunol. 2023б. Т. 14. С. 1264774.
1043. Wang J.-S., Liu H.-C. Systemic hypoxia enhances bactericidal activities of human polymorphonuclear leuocytes. // Clin. Sci. 2009. Т. 116. № 11. С. 805–817.
1044. Wang K. и др. Cldn-7 deficiency promotes experimental colitis and associated carcinogenesis by regulating intestinal epithelial integrity. // Oncoimmunology. 2021. Т. 10. № 1. С. 1923910.
1045. Wang K. и др. SENP1-KLF4 signalling regulates LPS-induced macrophage M1 polarization. // FEBS J. 2023в. Т. 290. № 1. С. 209–224.
1046. Wang L. и др. HB-EGF Activates the EGFR/HIF-1α pathway to induce proliferation of arsenic-transformed cells and tumor growth. // Front. Oncol. 2020a. Т. 10. С. 1019.

1047. Wang N. и др. Updated perspective of EPAS1 and the role in pulmonary hypertension. // Front. Cell Dev. Biol. 2023г. Т. 11. С. 1125723.
1048. Wang Q. и др. Role of tumor microenvironment in cancer progression and therapeutic strategy. // Cancer Med. 2023д. Т. 12. № 10. С. 11149–11165.
1049. Wang W. и др. Thymic function associated with cancer development, relapse, and antitumor immunity - a mini-review. // Front. Immunol. 2020б. Т. 11. С. 773.
1050. Wang Y. и др. EGFR-mediated HSP70 phosphorylation facilitates PCNA association with chromatin and DNA replication. // Nucleic Acids Res. 2024a. Т. 52. № 21. С. 13057–13072.
1051. Wang Y. и др. Pre-metastatic niche: formation, characteristics and therapeutic implication. // Signal Transduct. Target. Ther. 2024б. Т. 9. № 1. С. 236.
1052. Warburg O. The metabolism of carcinoma cells // J. Cancer Res. 1925. Т. 9. № 1. С. 148–163.
1053. Watanabe N. и др. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. // Nature. 2005. Т. 436. № 7054. С. 1181–1185.
1054. Watts D. и др. Hypoxia pathway proteins are master regulators of erythropoiesis. // Int. J. Mol. Sci. 2020. Т. 21. № 21.
1055. Watts E.R., Walmsley S.R. Inflammation and hypoxia: HIF and PHD isoform selectivity. // Trends Mol. Med. 2019. Т. 25. № 1. С. 33–46.
1056. Wei T.-T. и др. Metabolic targeting of HIF-1α potentiates the therapeutic efficacy of oxaliplatin in colorectal cancer. // Oncogene. 2020. Т. 39. № 2. С. 414–427.
1057. Weigmann B. и др. Isolation and subsequent analysis of murine lamina propria mononuclear cells from colonic tissue. // Nat. Protoc. 2007. Т. 2. № 10. С. 2307–2311.
1058. Weinberg C.R., Brown K.G., Hoel D.G. Altitude, radiation, and mortality from cancer and heart disease. // Radiat. Res. 1987. Т. 112. № 2. С. 381.
1059. Weinberg R.A. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. // Cancer Res. 1989. Т. 49. № 14. С. 3713–3721.
1060. Weiss L., Ward P.M. Lymphogenous and hematogenous metastasis of Lewis lung carcinoma in the mouse // Int. J. Cancer. 1987. Т. 40. № 4. С. 570–574.
1061. West N.R. и др. Emerging cytokine networks in colorectal cancer. // Nat. Rev. Immunol. 2015. Т. 15. № 10. С. 615–629.
1062. Wheaton W.W., Chandel N.S. Hypoxia. 2. Hypoxia regulates cellular metabolism. // Am J Physiol, Cell Physiol. 2011. Т. 300. № 3. С. C385-93.
1063. Wibowo A.A. и др. An increase in inflammatory cells related to the increase incidence of colitis and colorectal cancer // Bali Med. J. 2022. Т. 11. № 1. С. 499–502.
1064. Wicks E.E., Semenza G.L. Hypoxia-inducible factors: cancer progression and clinical translation. // J. Clin. Invest. 2022. Т. 132. № 11.
1065. Wiegering V. и др. Age-related changes in intracellular cytokine expression in healthy children. // Eur. Cytokine Netw. 2009. Т. 20. № 2. С. 75–80.
1066. Wiesener M.S. и др. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs. // FASEB J. 2003. Т. 17. № 2. С. 271–273.
1067. Wilson C.B. и др. Decreased production of interferon-gamma by human neonatal cells. Intrinsic and regulatory deficiencies. // J. Clin. Invest. 1986. Т. 77. № 3. С. 860–867.
1068. Wilson J.L., Burchell J., Grimshaw M.J. Endothelins induce CCR7 expression by breast tumor cells via endothelin receptor A and hypoxia-inducible factor-1. // Cancer Res. 2006. Т. 66. № 24. С. 11802–11807.
1069. Winter M. и др. Cytomorphological characterization of individual metastatic tumor cells from gastrointestinal cancer patient lymph nodes with imaging flow cytometry. // Gastrointest. Disord. 2019. Т. 1. № 4. С. 372–384.
1070. Wohlfart S. и др. Efficient chemotherapy of rat glioblastoma using doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles with different stabilizers. // PLoS ONE. 2011a. Т. 6. № 5. С. e19121.
1071. Womeldorff M., Gillespie D., Jensen R.L. Hypoxia-inducible factor-1 and associated upstream and downstream proteins in the pathophysiology and management of glioblastoma. // Neurosurg. Focus. 2014. Т. 37. № 6. С. E8.

1072. Wong C.C.-L. и др. Inhibitors of hypoxia-inducible factor 1 block breast cancer metastatic niche formation and lung metastasis. // J. Mol. Med. 2012. Т. 90. № 7. С. 803–815.
1073. Wong E. и др. Cut-point for Ki-67 proliferation index as a prognostic marker for glioblastoma. // Asia Pac. J. Clin. Oncol. 2019. Т. 15. № 1. С. 5–9.
1074. Wong J.Y.Y. и др. White blood cell count and risk of incident lung cancer in the UK biobank. // JNCI Cancer Spectr. 2020. Т. 4. № 2. С. pkz102.
1075. Wong K.-K., Engelman J.A., Cantley L.C. Targeting the PI3K signaling pathway in cancer. // Curr. Opin. Genet. Dev. 2010. Т. 20. № 1. С. 87–90.
1076. Woodland D.L., Kohlmeier J.E. Migration, maintenance and recall of memory T cells in peripheral tissues. // Nat. Rev. Immunol. 2009. Т. 9. № 3. С. 153–161.
1077. Wu C. и др. Spleen mediates a distinct hematopoietic progenitor response supporting tumor-promoting myelopoiesis. // J. Clin. Invest. 2018a. Т. 128. № 8. С. 3425–3438.
1078. Wu J. и др. Synergic effect of PD-1 blockade and endostar on the PI3K/AKT/mTOR-mediated autophagy and angiogenesis in Lewis lung carcinoma mouse model. // Biomed. Pharmacother. 2020. Т. 125. С. 109746.
1079. Wu T., Wu L. The role and clinical implications of the Retinoblastoma (RB)-E2F pathway in gastric cancer. // Front. Oncol. 2021. Т. 11. С. 655630.
1080. Wu X., Wang J., Wang Y. Multiple intracranial and extracranial metastases from postoperative glioblastoma: A case report and review of the literature // Interdisciplinary Neurosurgery. 2021. Т. 24. С. 101025.
1081. Wu D., Yotnda P. Induction and testing of hypoxia in cell culture. // J. Vis. Exp. 2011. № 54.
1082. Wu Y. и др. Association between acute mountain sickness (AMS) and age: a meta-analysis. // Mil. Med. Res. 2018б. Т. 5. № 1. С. 14.
1083. Xiao B. и др. HIF-1α contributes to hypoxia adaptation of the naked mole rat. // Oncotarget. 2017. Т. 8. № 66. С. 109941–109951.
1084. Xie W. и др. Perspective review of myeloid immune cell responses and poststroke immunosuppression. // Stroke. 2023. Т. 54. № 7. С. 1920–1929.
1085. Xie Y. и др. Inflammation in cancer: therapeutic opportunities from new insights. // Mol. Cancer. 2025. Т. 24. № 1. С. 51.
1086. Xiu J.B., Li L.L., Xu Q. Minocycline activates the nucleus of the solitary tract-associated network to alleviate lipopolysaccharide-induced neuroinflammation. // Chin. Med. Sci. J. 2022. Т. 31. № 37. С. 1–14.
1087. Xu H.-M. и др. Selection strategy of dextran sulfate sodium-induced acute or chronic colitis mouse models based on gut microbial profile. // BMC Microbiol. 2021. Т. 21. № 1. С. 279.
1088. Xu Q. и др. Effects of different hypoxia exposure on myeloid-derived suppressor cells in mice. // Exp. Mol. Pathol. 2024. Т. 140. С. 104932.
1089. Xu Y.-R., Wang A.-L., Li Y.-Q. Hypoxia-inducible factor 1-alpha is a driving mechanism linking chronic obstructive pulmonary disease to lung cancer. // Front. Oncol. 2022. Т. 12. С. 984525.
1090. Xue M. и др. Diagnosis of sepsis with inflammatory biomarkers, cytokines, endothelial functional markers from SIRS patients. // Medicine (Baltimore). 2022. Т. 101. № 7. С. e28681.
1091. Xue X. и др. Hypoxia-inducible factor-2α activation promotes colorectal cancer progression by dysregulating iron homeostasis. // Cancer Res. 2012. Т. 72. № 9. С. 2285–2293.
1092. Xue X. и др. HIF-3α1 promotes colorectal tumor cell growth by activation of JAK-STAT3 signaling. // Oncotarget. 2016. Т. 7. № 10. С. 11567–11579.
1093. Yaeger R. и др. Genomic Alterations Observed in Colitis-Associated Cancers Are Distinct From Those Found in Sporadic Colorectal Cancers and Vary by Type of Inflammatory Bowel Disease. // Gastroenterology. 2016. Т. 151. № 2. С. 278- 287.e6.
1094. Yahya E.B., Alqadhi A.M. Recent trends in cancer therapy: A review on the current state of gene delivery. // Life Sci. 2021. Т. 269. С. 119087.
1095. Yamada A. и др. Role of regulatory T cell in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. // World J. Gastroenterol. 2016. Т. 22. № 7. С. 2195–2205.

1096. Yamagiwa K., Ichikawa K. Über die künstliche Erzeugung von Papillom. // Verh Jap Path Ges. 1915. № 5. C. 142–148.
1097. Yamamoto-Furusho J.K., Gutierrez-Herrera F.D. Molecular mechanisms and clinical aspects of colitis-associated cancer in ulcerative colitis. // Cells. 2025. Т. 14. № 3. C. 162.
1098. Yan C. и др. CCR7 affects the tumor microenvironment by regulating the activation of naïve CD8+ T cells to promote the proliferation of oral squamous cell carcinoma. // Transl. Oncol. 2024. Т. 44. C. 101924.
1099. Yang C., Merlin D. Unveiling colitis: a journey through the dextran sodium sulfate-induced model. // Inflamm. Bowel Dis. 2024. Т. 30. № 5. C. 844–853.
1100. Yang D. и др. Role of Mir-155 in controlling HIF-1α level and promoting endothelial cell maturation. // Sci. Rep. 2016. Т. 6. C. 35316.
1101. Yang J., Weinberg R.A. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. // Dev. Cell. 2008. Т. 14. № 6. C. 818–829.
1102. Yang M.-H. и др. Direct regulation of TWIST by HIF-1alpha promotes metastasis. // Nat. Cell Biol. 2008. Т. 10. № 3. C. 295–305.
1103. Yang C.-C. и др. Lipopolysaccharide-induced matrix metalloproteinase-9 expression associated with cell migration in rat brain astrocytes. // Int. J. Mol. Sci. 2019. Т. 21. № 1.
1104. Yang F.-R. и др. Association between the systemic inflammation response index and mortality in cancer survivors based on NHANES 2001-2018. // Sci. Rep. 2025. Т. 15. № 1. C. 15151.
1105. Yao Q. и др. Expression profile of the proapoptotic protein Bax in the human brain. // Histochem. Cell Biol. 2023. Т. 159. № 2. C. 209–220.
1106. Yazdani B., Sirous H. Expression analysis of HIF-3α as a potent prognostic biomarker in various types of human cancers: a case of meta-analysis. // Res. Pharm. Sci. 2022. Т. 17. № 5. C. 508–526.
1107. Ye Y. и др. Characterization of Hypoxia-associated Molecular Features to Aid Hypoxia-Targeted Therapy. // Nat. Metab. 2019. Т. 1. № 4. C. 431–444.
1108. Yee P.P. и др. Neutrophil-induced ferroptosis promotes tumor necrosis in glioblastoma progression. // Nat. Commun. 2020. Т. 11. № 1. C. 5424.
1109. Yokoyama Y. и др. Demonstration of low-regulatory CD25High+CD4+ and high-pro-inflammatory CD28-CD4+ T-cell subsets in patients with ulcerative colitis: modified by selective granulocyte and monocyte adsorption apheresis. // Dig. Dis. Sci. 2007. Т. 52. № 10. C. 2725–2731.
1110. Yoshimura H. и др. Prognostic impact of hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha in colorectal cancer patients: correlation with tumor angiogenesis and cyclooxygenase-2 expression. // Clin. Cancer Res. 2004. Т. 10. № 24. C. 8554–8560.
1111. Yu J.J. и др. Time domains of hypoxia responses and -omics insights. // Front. Physiol. 2022. Т. 13. C. 885295.
1112. Yu Y. и др. The alteration of autophagy and apoptosis in the hippocampus of rats with natural aging-dependent cognitive deficits. // Behav. Brain Res. 2017. Т. 334. C. 155–162.
1113. Yuen G.J., Demissie E., Pillai S. B lymphocytes and cancer: a love-hate relationship. // Trends Cancer. 2016. Т. 2. № 12. C. 747–757.
1114. Yun S.-M., Kim S.-H., Kim E.-H. The molecular mechanism of Transforming Growth Factor-β signaling for intestinal fibrosis: a mini-review. // Front. Pharmacol. 2019. Т. 10. C. 162.
1115. Zarubina I.V. Modern view on pathogenesis of hypoxia and its pharmacological correction. // Rev. Clin. Pharmacol. Drug Ther. 2011. Т. 9. C. 31–48.
1116. Zenewicz L.A. Oxygen levels and immunological studies. // Front. Immunol. 2017. Т. 8. C. 324.
1117. Zeng M. и др. Hypoxia activates the K-ras proto-oncogene to stimulate angiogenesis and inhibit apoptosis in colon cancer cells. // PLoS ONE. 2010. Т. 5. № 6. C. e10966.
1118. Zeng Y., Fu B.M. Angiogenesis and microvascular permeability. // Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2025. Т. 15. № 1.
1119. Zhang H. и др. Overcoming cancer risk in inflammatory bowel disease: new insights into preventive strategies and pathogenesis mechanisms including interactions of immune cells, cancer signaling pathways, and gut microbiota. // Front. Immunol. 2023a. Т. 14. C. 1338918.

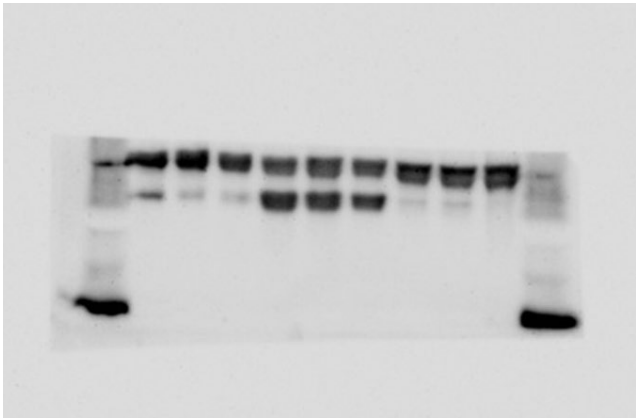
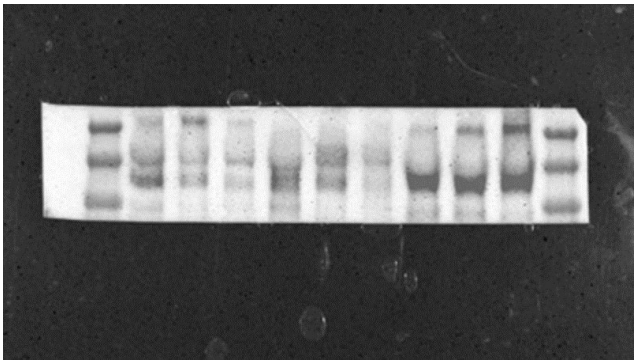
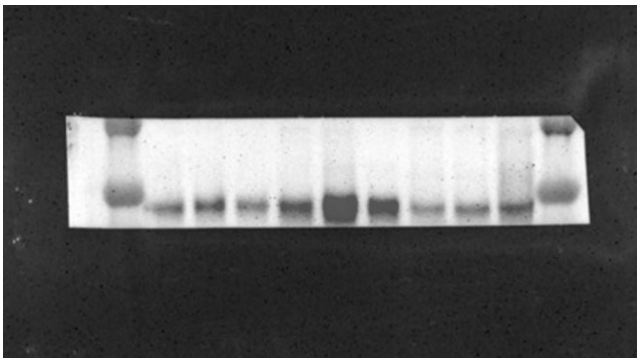
1120. Zhang J. и др. Germline mutations in predisposition genes in pediatric cancer. // N. Engl. J. Med. 2015. Т. 373. № 24. С. 2336–2346.
1121. Zhang J. и др. Hypoxia-inducible factor-1α/interleukin-1β signaling enhances hepatoma epithelial-mesenchymal transition through macrophages in a hypoxic-inflammatory microenvironment. // Hepatology. 2018. Т. 67. № 5. С. 1872–1889.
1122. Zhang J. и др. Role of CD68 in tumor immunity and prognosis prediction in pan-cancer. // Sci. Rep. 2022а. Т. 12. № 1. С. 7844.
1123. Zhang K. и др. Non-linear correlation between tumor size and survival outcomes for parathyroid carcinoma: a SEER population-based cohort study. // Front Endocrinol (Lausanne). 2022б. Т. 13. С. 882579.
1124. Zhang K. и др. Regulation of LPS-induced inflammatory responses in bovine mammary epithelial cells via TLR4-mediated NF-κB and MAPK signaling pathways by lactoferrin. // Life (Basel). 2025. Т. 15. № 1.
1125. Zhang L. и др. Characteristics of circulating adaptive immune cells in patients with colorectal cancer. // Sci. Rep. 2022в. Т. 12. № 1. С. 18166.
1126. Zhang P. и др. The Utilization of Formalin Fixed-Paraffin-Embedded specimens in high throughput genomic studies. // Int. J. Genomics. 2017. Т. 2017. С. 1926304.
1127. Zhang Q., Lenardo M.J., Baltimore D. 30 Years of NF-κB: a blossoming of relevance to human pathobiology. // Cell. 2017. Т. 168. № 1–2. С. 37–57.
1128. Zhang Q., Sioud M. Tumor-Associated Macrophage subsets: shaping polarization and targeting. // Int. J. Mol. Sci. 2023. Т. 24. № 8.
1129. Zhang Q. и др. Intermittent hypoxia conditioning: a potential multi-organ protective therapeutic strategy. // Int. J. Med. Sci. 2023б. Т. 20. № 12. С. 1551–1561.
1130. Zhang R., Zhao J., Zhao L. EPAS1/HIF-2α acts as an unanticipated tumor-suppressive role in papillary thyroid carcinoma. // Int. J. Gen. Med. 2023в. Т. 16. С. 2165–2174.
1131. Zhang S. и др. Tumor initiation and early tumorigenesis: molecular mechanisms and interventional targets. // Signal Transduct. Target. Ther. 2024a. Т. 9. № 1. С. 149.
1132. Zhang X. и др. The tumor microenvironment: signal transduction. // Biomolecules. 2024б. Т. 14. № 4.
1133. Zhang Y. и др. Notch1 regulates the growth of human colon cancers. // Cancer. 2010. Т. 116. № 22. С. 5207–5218.
1134. Zhang Y. и др. Redox regulation of tumor suppressor PTEN in cell signaling. // Redox Biol. 2020. Т. 34. С. 101553.
1135. Zhang Y. и др. Neurological applications of belzutifan in von Hippel-Lindau disease. // Neuro Oncol. 2023г. Т. 25. № 5. С. 827–838.
1136. Zhang Y. и др. Global variations in lung cancer incidence by histological subtype in 2020: a population-based study. // Lancet Oncol. 2023д. Т. 24. № 11. С. 1206–1218.
1137. Zhao H. и др. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. // Signal Transduct. Target. Ther. 2021. Т. 6. № 1. С. 263.
1138. Zhao J. и др. The role of hypoxia-inducible factor-2 in digestive system cancers. // Cell Death Dis. 2015. Т. 6. № 1. С. e1600.
1139. Zhao J. и др. Impact of high altitude on clinicopathological features and prognosis after R0 resection for gastric cancer: a population-based multicenter study. // J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. 2017. Т. 36. № 1. С. 1–14.
1140. Zhao S. и др. Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1alpha. // Science. 2009. Т. 324. № 5924. С. 261–265.
1141. Zhao Y. и др. Resveratrol ameliorates Lewis lung carcinoma-bearing mice development, decreases granulocytic myeloid-derived suppressor cell accumulation and impairs its suppressive ability. // Cancer Sci. 2018. Т. 109. № 9. С. 2677–2686.
1142. Zhao Y. и др. HIF-1α signaling: Essential roles in tumorigenesis and implications in targeted therapies. // Genes Dis. 2024. Т. 11. № 1. С. 234–251.

1143. Zheng L., Kelly C.J., Colgan S.P. Physiologic hypoxia and oxygen homeostasis in the healthy intestine. A review in the theme: cellular responses to hypoxia. // Am J Physiol, Cell Physiol. 2015. Т. 309. № 6. С. C350-60.
1144. Zheng L. и др. Pan-cancer single-cell landscape of tumor-infiltrating T cells. // Science. 2021. Т. 374. № 6574. С. abe6474.
1145. Zheng Q. и др. Cardiac and kidney adverse effects of HIF prolyl-hydroxylase inhibitors for anemia in patients with CKD not receiving dialysis: a systematic review and meta-analysis. // Am. J. Kidney Dis. 2023. Т. 81. № 4. С. 434- 445.e1.
1146. Zheng S.-S. и др. Prognostic significance of HIF-1α expression in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. // PLoS ONE. 2013. Т. 8. № 6. С. e65753.
1147. Zhong H. и др. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. // Cancer Res. 1999. Т. 59. № 22. С. 5830–5835.
1148. Zhong H. и др. Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. // Cancer Res. 2000. Т. 60. № 6. С. 1541–1545.
1149. Zhou F. и др. Association of hsp70-2 and hsp-hom gene polymorphisms with risk of acute high-altitude illness in a Chinese population. // Cell Stress Chaperones. 2005. Т. 10. № 4. С. 349–356.
1150. Zhou H. и др. The prognostic value of proliferating cell nuclear antigen expression in colorectal cancer: A meta-analysis. // Medicine (Baltimore). 2018. Т. 97. № 50. С. e13752.
1151. Zhou J. и др. PI3K/Akt is required for heat shock proteins to protect hypoxia-inducible factor 1alpha from pVHL-independent degradation. // J. Biol. Chem. 2004. Т. 279. № 14. С. 13506–13513.
1152. Zhou W.-H. и др. CC chemokine receptor 7 promotes macrophage recruitment and induces M2-polarization through CC chemokine ligand 19&21 in oral squamous cell carcinoma. // Discov. Oncol. 2022. Т. 13. № 1. С. 67.
1153. Zhou X., Liu X., Huang L. Macrophage-mediated tumor cell phagocytosis: opportunity for nanomedicine intervention. // Adv. Funct. Mater. 2021. Т. 31. № 5.
1154. Zhou X. и др. CYP2C8 suppress proliferation, migration, invasion and sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma via pi3k/akt/p27kip1 axis. // J. Hepatocell. Carcinoma. 2021. Т. 8. С. 1323–1338.
1155. Zhou Y. и др. Experimental mouse models for translational human cancer research. // Front. Immunol. 2023. Т. 14. С. 1095388.
1156. Zhu L., Lu Z., Zhao H. Antitumor mechanisms when pRb and p53 are genetically inactivated. // Oncogene. 2015. Т. 34. № 35. С. 4547–4557.
1157. Zhu M. и др. The systemic inflammation response index as an independent predictor of survival in breast cancer patients: A retrospective study. // Front. Mol. Biosci. 2022. Т. 9. С. 856064.
1158. Zlotnik A., Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. // Immunity. 2000. Т. 12. № 2. С. 121–127.
1159. Ziaee V. и др. Acute mountain sickness in Iranian trekkers around Mount Damavand (5671 m) in Iran. // Wilderness Environ. Med. 2003. Т. 14. № 4. С. 214–219.
1160. Zinatizadeh M.R. и др. The role and function of Ras-association domain family in cancer: a review. // Genes Dis. 2019. Т. 6. № 4. С. 378–384.
1161. Zolotova N.A., Akhrieva Kh.M., Zayratyants O.V. Epithelial barrier of the colon in health and patients with ulcerative colitis // Eksp. Klin. Gastroenterol. 2019. Т. 162. № 2. С. 4–13.
1162. Zong W.-X., Rabinowitz J.D., White E. Mitochondria and cancer. // Mol. Cell. 2016. Т. 61. № 5. С. 667–676.
1163. Zundel W. и др. Loss of *PTEN* facilitates HIF-1-mediated gene expression // Genes Dev. 2000. Т. 14. № 4. С. 391–396.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Взаимосвязь между устойчивостью к гипоксии, окислительным стрессом и продукцией провоспалительных и противовоспалительных цитокинов у новорожденных, препубертатных и половозрелых самцов крыс Вистар

Оригинальные мембраны Вестерн-блоттинга – определение содержания HIF-1α и PHD2 относительно GAPDH

GAPDH	HIF-1α
	
PHD2	
	

Приложение 2. Сравнительная характеристика устойчивости к гипоксии, уровней экспрессии *Hif1a*, *Vegf* и *Nfkb* в печени, содержания белка HIF-1α в сыворотке крови и числа нейтрофилов в легких у половозрелых и старых самцов крыс Вистар

Таблица 2.4

Последовательности использованных для ПЦР праймеров («Евроген», Россия)

Праймер	**Направление последовательности**	**Последовательность (5’ к 3’)**	**NCBI Ref Seq**	**Определяемый ген**
B2m	Прямая	CTCGCTCGGTGACCGTGAT	NM_012512.2	*Rattus norvegicus* beta-2 microglobulin (*B2m*), мРНК
	Обратная	GGACAGATCTGACATCTCGA		
Hif1a	Прямая	GAGCCTTAACCTATCTGTCA	NM_024359.2	*Rattus norvegicus* hypoxia inducible factor 1 subunit alpha (*Hif1a*), мРНК
	Обратная	CACAATCGTAACTGGTCAGC		
Nfκb	Прямая	GACGATCCTTTCGGAACTG	NM_001276711.2	*Rattus norvegicus* nuclear factor kappa B subunit 1 (*Nfkb1*), transcript variant 2, мРНК
	Обратная	GCATATGCCGTCCTCACAG		
Vegf	Прямая	GGATCAAACCTCACCAAAGC	NM_001317043.1	*Rattus norvegicus* vascular endothelial growth factor A (*Vegfa*), transcript variant 2, мРНК
	Обратная	GGTTAATCGGTCTTTCCGGT		

Приложение 3. Морфологическая характеристика язвенного и воспалительного процессов в ободочной кишке и морфофункциональные особенности иммунной системы при остром колите у ВУ и НУ самцов мышей С57Bl/6

Таблица 3.3.1

Показатели массы тела в разные сроки потребления 1,5%-го ДСН у ВУ (n=20) и НУ (n=12) мышей, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

Группы наблюдения	**Масса тела в разные сроки эксперимента, г**			**p<0,05**
	0-е сут (до начала эксперимента)	**3-и сут**	**7-е сут**	
ВУ (n=20)	26,0 (24,0-27,0)	26,0 (24,0-26,5)	20,5 (19,5-24,0)	**0,0001**$^{0-7}$ **0,0005**$^{3-7}$
НУ (n=12)	26,0 (25,0-27,0)	26,0 (23,5-26,0)	23,0 (21,0-24,0)	**0,001**$^{0-7}$ **0,03**$^{3-7}$
p (ВУ-НУ)	0,46	0,86	0,34	

Таблица 3.3.3

Относительная распространенность язв (% к длине ободочной кишки) в проксимальном, медиальном и дистальном отделах ободочной кишки при остром колите у ВУ (n=20) и НУ (n=12) мышей, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Отдел ободочной кишки	**Морфологическая характеристика язв**	**Группы наблюдения**		**p (ВУ-НУ)**
		ВУ (n=20)	**НУ (n=12)**	
Дистальный	С фибрином	0,0 (0,0-10,8)	0,0 (0,0-8,2)	0,99
	Без эпителизации	20,3 (12,4-58,2)	18,2 (7,5-39,2)	0,51
	С эпителизацией	28,9 (18,4-43,6)	29,2 (25,1-50,0)	0,54
	Все язвы	87,5 (59,8-99,6)	66,1 (44,3-93,4)	0,32
Медиальный	С фибрином	0,0 (0,0-0,0)	2,9 (0,0-9,9)	**0,002**
	Без эпителизации	7,3 (2,2-20,5)	11,1 (1,0-45,4)	0,44
	С эпителизацией	26,8 (6,7-41,8)	10,5 (6,2-12,0)	**0,04**
	Все язвы	33,4 (13,4-62,4)	24,2 (13,2-68,3)	0,98
Проксимальный	С фибрином	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	1,00
	Без эпителизации	0,0 (0,0-1,3)	2,3 (0,3-3,5)	**0,01**
	С эпителизацией	2,7 (0,0-5,7)	0,3 (0,0-3,7)	0,35
	Все язвы	2,5 (0,0-5,7)	3,1 (0,4-7,1)	0,65
Суммарно, в % отношении к длине мышечной пластинки всей кишки	С фибрином	0,4 (0,0-3,0)	2,2 (0,0-3,3)	0,59
	Без эпителизации	8,8 (6,3-15,4)	10,9 (4,8-18,1)	0,82
	С эпителизацией	14,8 (11,4-18,7)	11,2 (8,5-15,9)	0,20
	Все язвы	27,1 (20,3-31,0)	26,2 (16,1-30,9)	0,80

Таблица 3.3.4

Относительная распространенность язв (% к длине ободочной кишки) с фибрином в проксимальном, медиальном и дистальном отделах ободочной кишки при остром колите у ВУ (n=20) и НУ (n=12) мышей, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

Отдел ободочной кишки	**Группы наблюдения**		**p (ВУ-НУ)**
	ВУ (n=20)	**НУ (n=12)**	
Дистальный	0,0 (0,0-10,8)[1]	0,0 (0,0-8,2)[2]	0,99
Медиальный	0,0 (0,0-0,0)[3]	2,9 (0,0-9,9)[4]	**0,002**
Проксимальный	0,0 (0,0-0,0)[5]	0,0 (0,0-0,0)[6]	0,99
p	**0,004**[1-3]; **0,001**[1-5]; 0,99[3-5]	0,99[2-4]; 0,08[2-6]; **0,04**[4-6]	

Таблица 3.3.5

Относительная распространенность язв (% к длине ободочной кишки) без эпителизации в проксимальном, медиальном и дистальном отделах ободочной кишки при остром колите у ВУ (n=20) и НУ (n=12) мышей, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

Отдел ободочной кишки	**Группы наблюдения**		**p (ВУ-НУ)**
	ВУ (n=20)	**НУ (n=12)**	
Дистальный	20,3 (12,4-58,2)[1]	18,2 (7,5-39,2)[2]	0,51
Медиальный	7,3 (2,2-20,5)[3]	11,1 (1,0-45,4)[4]	0,44
Проксимальный	0,0 (0,0-1,3)[5]	2,3 (0,3-3,5)[6]	**0,01**
p	0,13[1-3]; **0,0001**[1-5]; **0,005**[3-5]	0,99[2-4]; **0,004**[2-6]; **0,04**[4-6]	

Таблица 3.3.6

Относительная распространенность язв (% к длине ободочной кишки) с эпителизацией в проксимальном, медиальном и дистальном отделах ободочной кишки при остром колите у ВУ (n=20) и НУ (n=12) мышей, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

Отдел ободочной кишки	**Группы наблюдения**		**p (ВУ-НУ)**
	ВУ (n=20)	**НУ (n=12)**	
Дистальный	28,9 (18,4-43,6)[1]	29,2 (25,1-50,0)[2]	0,54
Медиальный	26,8 (6,7-41,8)[3]	10,5 (6,2-12,0)[4]	**0,002**
Проксимальный	2,7 (0,0-5,7)[5]	0,3 (0,0-3,7)[6]	0,35
p	0,69[1-3]; **0,0001**[1-5]; **0,0002**[3-5]	**0,007**[2-4]; **0,0001**[2-6]; 0,11[4-6]	

Таблица 3.3.9

Морфометрическое исследование селезенки у ВУ и НУ мышей контрольных групп и с острым колитом, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Группы наблюдения / **Параметры**	**Контрольные**		**Острый колит**		**p**
	ВУ[1] (n=6)	**НУ[2] (n=6)**	**ВУ[3] (n=20)**	**НУ[4] (n=12)**	
Объемная доля белой пульпы, %	33,0 (28,9-41,5)	34,5 (27,1-40,9)	37,1 (35,8-39,9)	29,8 (23,0-34,4)	$0,99^{1-2}$; $0,32^{1-3}$ $0,34^{2-4}$; $\mathbf{0,004}^{3-4}$
Отношение белой пульпы к красной, усл. ед.	0,56 (0,44-0,77)	0,59 (0,43-0,76)	0,61 (0,59-0,70)	0,47 (0,32-0,55)	$0,96^{1-2}$; $0,65^{1-3}$ $0,10^{2-4}$; $\mathbf{0,004}^{3-4}$
Объемная доля лимфоидных узелков, %	87,9 (73,5-94,0)	88,7 (86,7-89,4)	93,1 (92,5-94,4)	88,6 (86,0-91,3)	$0,99^{1-2}$; $0,23^{1-3}$ $0,76^{2-4}$; $\mathbf{0,007}^{3-4}$
Объемная доля ПАЛМ-зон, %	12,3 (6,0-26,6)	11,3 (10,6-13,4)	6,9 (5,6-7,5)	11,4 (8,7-14,1)	$0,99^{1-2}$; $0,23^{1-3}$ $0,76^{2-4}$; $\mathbf{0,007}^{3-4}$
Объемная доля маргинальных зон лимфоидных узелков, %	45,8 (37,0-56,5)	30,7 (25,2-38,4)	23,6 (21,1-31,1)	30,5 (27,3-31,3)	$0,06^{1-2}$; $\mathbf{0,01}^{1-3}$ $0,99^{2-4}$; $0,16^{3-4}$
Объемная доля светлых центров лимфоидных узелков, %	11,1 (9,0-13,6)	21,3 (17,4-28,4)	32,7 (30,5-32,7)	29,4 (28,2-33,6)	$\mathbf{0,02}^{1-2}$; $\mathbf{0,006}^{1-3}$ $\mathbf{0,04}^{2-4}$; $0,97^{3-4}$

Таблица 3.3.10

Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у ВУ и НУ мышей контрольных групп и с острым колитом, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Группы наблюдения / **Параметры**		**Контрольные**		**Острый колит**		**p**
		ВУ[1] (n=6)	**НУ[2] (n=6)**	**ВУ[3] (n=20)**	**НУ[4] (n=12)**	
Лимфоциты	10^6/мл	10,3 (8,8-14,6)	16,0 (13,3-19,5)	10,5 (7,1-13,5)	10,5 (7,6-12,4)	$0,05^{1-2}$; $0,67^{1-3}$ $\mathbf{0,006}^{2-4}$; $0,87^{3-4}$
Т-лимфоциты (CD3+)	% от лимфоцитов	28,4 (25,5-32,5)	29,5 (28,0-31,4)	26,5 (24,4-29,9)	26,6 (22,8-29,4)	$0,54^{1-2}$; $0,29^{1-3}$ $0,13^{2-4}$; $0,99^{3-4}$
	10^6/мл	3,3 (2,2-4,2)	4,8 (3,7-6,0)	2,9 (1,9-3,8)	2,6 (2,1-3,5)	$0,13^{1-2}$; $0,49^{1-3}$ $\mathbf{0,004}^{2-4}$; $0,77^{3-4}$
Т-хелперы (CD3+CD4+)	% от лимфоцитов	15,5 (13,6-18,0)	16,1 (15,6-16,8)	13,4 (12,2-16,3)	14,7 (12,2-16,2)	$0,53^{1-2}$; $0,15^{1-3}$ $0,10^{2-4}$; $0,30^{3-4}$
	10^6/мл	1,8 (1,2-2,4)	2,5 (2,1-3,3)	1,4 (1,1-1,9)	1,3 (1,2-1,9)	$0,08^{1-2}$; $0,36^{1-3}$ $\mathbf{0,004}^{2-4}$; $0,98^{3-4}$

Таблица 3.3.10 (продолжение)

Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у ВУ и НУ мышей контрольных групп и с острым колитом, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Группы наблюдения / **Параметры**		**Контрольные**		**Острый колит**		**p**
		ВУ[1] (n=6)	**НУ[2] (n=6)**	**ВУ[3] (n=20)**	**НУ[4] (n=12)**	
Цитотоксические Т-лимфоциты (CD3+CD8+)	% от лимфоцитов	13,3 (10,8-14,7)	12,4 (11,4-14,1)	12,6 (11,4-13,3)	13,2 (11,0-15,6)	$0,70^{1-2}$; $0,50^{1-3}$ $0,72^{2-4}$; $0,38^{3-4}$
	10^6/мл	1,4 (1,0-1,8)	2,2 (1,5-2,6)	1,3 (0,8-1,9)	1,2 (1,0-1,9)	$0,08^{1-2}$; $0,74^{1-3}$ $\mathbf{0,03}^{2-4}$; $0,81^{3-4}$
В-лимфоциты (CD3-CD19+)	% от лимфоцитов	59,4 (55,9-63,9)	63,1 (59,1-64,6)	62,8 (57,7-65,2)	57,6 (51,0-60,9)	$0,33^{1-2}$; $0,57^{1-3}$ $\mathbf{0,01}^{2-4}$; $\mathbf{0,01}^{3-4}$
	10^6/мл	6,3 (5,2-8,5)	10,0 (8,5-11,8)	6,8 (3,9-8,7)	5,8 (4,3-7,2)	$\mathbf{0,03}^{1-2}$; $0,88^{1-3}$ $\mathbf{0,001}^{2-4}$; $0,50^{3-4}$
Регуляторные Т-лимфоциты (CD4+CD25+FOXP3+)	% от Т-хелперов	1,2 (0,5-3,2)	5,5 (1,2-6,1)	2,5 (1,5-3,4)	2,3 (1,1-3,5)	$0,35^{1-2}$; $0,19^{1-3}$ $0,23^{2-4}$; $0,64^{3-4}$
	10^6/мл	0,017 (0,009-0,049)	0,118 (0,031-0,160)	0,028 (0,019-0,047)	0,038 (0,014-0,044)	$\mathbf{0,03}^{1-2}$; $0,30^{1-3}$ $\mathbf{0,04}^{2-4}$; $0,99^{3-4}$

Приложение 4. Морфологическая характеристика язвенного и воспалительного процессов в ободочной кишке и морфофункциональные особенности иммунной системы при хроническом колите у ВУ и НУ самцов мышей С57Bl/6

Таблица 3.4.2

Показатели массы тела в разные сроки потребления 1%-го ДСН у ВУ и НУ мышей, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

Группы наблюдения	**Масса тела в разные сроки эксперимента, г**							**p<0,05**
	0-е сут (до начала эксперимента)	**5-е сут**	**12-е сут**	**14-е сут**	**22-е сут**	**27-е сут**	**60-е сут**	
ВУ (n=15)	25,2 (24,5-26,6)	25,1 (24,6-26,4)	25,0 (24,0-26,0)	25,0 (23,5-26,0)	25,0 (23,5-26,5)	24,0 (23,0-25,0)	28,0 (26,0-30,0)	**0,023**$^{12\text{-}60}$ **0,047**$^{14\text{-}60}$ **0,0002**$^{27\text{-}60}$
НУ (n=5)	24,4 (23,9-25,4)	24,7 (24,0-25,9)	24,0 (23,0-25,0)	20,0 (19,0-21,0)	24,0 (23,0-25,0)	22,0 (21,0-24,0)	29,0 (26,0-29,0)	**0,0023**$^{0\text{-}14}$ **0,0006**$^{5\text{-}14}$ **0,0275**$^{12\text{-}14}$ **0,0282**$^{14\text{-}22}$ **0,00002**$^{14\text{-}60}$ **0,0069**$^{27\text{-}60}$
p (ВУ-НУ)	0,27	0,26	0,32	**0,00003**	0,33	**0,04**	0,96	

Таблица 3.4.7

Относительная распространенность воспалительного инфильтрата (% к длине ободочной кишки) в проксимальном, медиальном и дистальном отделах ободочной кишки при хроническом колите у ВУ (n=15) и НУ (n=5) мышей, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

Отдел ободочной кишки	**Группы наблюдения**		**p**
	ВУ (n=15)	**НУ (n=5)**	
Дистальный	69,8 (62,9-83,5)^{1}	70,3 (58,5-75,6)^{2}	0,55
Медиальный	47,0 (41,9-65,3)^{3}	62,0 (46,7-66,4)^{4}	0,69
Проксимальный	5,4 (3,2-11,8)^{5}	14,7 (10,1-23,9)^{6}	**0,04**
p	0,69$^{1\text{-}3}$; **0,003**$^{1\text{-}5}$; 0,12$^{3\text{-}5}$	0,99$^{2\text{-}4}$; **0,007**$^{2\text{-}6}$; 0,07$^{4\text{-}6}$	
Суммарно, в % по отношению к длине мышечной пластинки всей кишки	33,7 (28,1-36,3)	38,2 (37,2-45,8)	0,12

Таблица 3.4.8

Морфометрические показатели объемной доли структурно-функциональных зон тимуса и относительного количества тимических телец у ВУ и НУ мышей контрольных групп и с хроническим колитом, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Группы наблюдения / **Параметры**		**Контрольные**		**Хронический колит**		**p**
		ВУ[1] (n=5)	**НУ[2] (n=6)**	**ВУ[3] (n=15)**	**НУ[4] (n=5)**	
Корковое вещество, %		70,1 (61,7-71,4)	63,3 (58,3-65,9)	67,8 (65,3-78,8)	73,7 (68,1-77,9)	$0,99^{1-3}$; $\mathbf{0,02}^{2-4}$ $0,19^{1-2}$; $0,48^{3-4}$
Мозговое вещество, %		30,0 (28,6-38,3)	36,7 (34,1-41,7)	32,2 (21,2-34,8)	26,3 (22,1-31,9)	$0,99^{1-3}$; $\mathbf{0,02}^{2-4}$ $0,19^{1-2}$; $0,48^{3-4}$
Отношение объемной плотности коркового вещества к мозговому, усл. ед.		2,8 (1,7-11,4)	2,1 (1,7-2,7)	3,1 (2,6-4,8)	4,2 (3,2-5,2)	$0,76^{1-3}$; $\mathbf{0,02}^{2-4}$ $0,56^{1-2}$; $0,35^{3-4}$
% от общего количества тимических телец	из 3-5 эпителиальных клеток	56,4 (51,4-62,8)	66,7 (64,4-72,9)	45,0 (33,9-52,1)	28,2 (23,6-36,7)	$0,07^{1-3}$; $\mathbf{0,03}^{2-4}$ $0,06^{1-2}$; $0,11^{3-4}$
	из 5 и более эпителиальных клеток	16,7 (14,9-21,8)	20,8 (16,7-26,7)	16,7 (11,1-30,3)	23,0 (22,7-31,5)	$0,99^{1-3}$; $0,60^{2-4}$ $0,31^{1-2}$; $0,44^{3-4}$
	с кератогиалином	16,6 (11,3-24,1)	8,7 (8,3-10,6)	33,3 (22,3-38,9)	28,6 (25,7-42,5)	$0,06^{1-3}$; $\mathbf{0,03}^{2-4}$ $0,06^{1-2}$; $0,90^{3-4}$
	в виде кистоподобных полостей	7,7 (1,8-14,6)	0,0 (0,0-4,2)	7,1 (2,5-19,6)	10,7 (2,1-24,7)	$0,95^{1-3}$; $0,14^{2-4}$ $0,14^{1-2}$; $0,61^{3-4}$

Таблица 3.4.9

Морфометрическое исследование селезенки у ВУ и НУ мышей контрольных групп и с хроническим колитом, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Группы наблюдения / Параметры	Контрольные		Хронический колит		p
	ВУ[1] (n=5)	**НУ[2] (n=6)**	**ВУ[3] (n=15)**	**НУ[4] (n=5)**	
Объемная доля белой пульпы, %	42,6 (33,9-51,5)	41,7 (40,9-47,1)	45,6 (33,7-46,8)	38,8 (37,8-42,2)	$0,89^{1-2}$; $0,69^{1-3}$ $0,20^{2-4}$; $0,34^{3-4}$
Отношение белой пульпы к красной, усл. ед.	0,8 (0,5-1,2)	0,8 (0,7-0,9)	0,9 (0,6-1,0)	0,7 (0,6-0,8)	$0,89^{1-2}$; $0,89^{1-3}$ $0,20^{2-4}$; $0,34^{3-4}$
Объемная доля лимфоидных узелков, %	13,0 (6,9-31,7)	21,7 (20,1-31,3)	16,4 (15,2-50,5)	24,1 (14,6-28,7)	$0,34^{1-2}$; $0,34^{1-3}$ $0,69^{2-4}$; $0,89^{3-4}$
Объемная доля ПАЛМ-зон, %	87,0 (65,0-93,1)	78,4 (68,7-79,8)	83,6 (49,6-84,8)	75,9 (71,3-85,4)	$0,34^{1-2}$; $0,34^{1-3}$ $0,69^{2-4}$; $0,89^{3-4}$
Объемная доля маргинальных зон лимфоидных узелков, %	38,2 (29,6-40,8)	32,2 (29,1-35,1)	38,0 (33,3-46,3)	32,3 (28,5-39,2)	$0,34^{1-2}$; $0,69^{1-3}$ $0,99^{2-4}$; $0,34^{3-4}$
Объемная доля светлых центров лимфоидных узелков, %	12,4 (7,7-17,8)	19,4 (16,8-26,9)	19,0 (16,3-21,4)	26,1 (25,3-30,1)	$0,11^{1-2}$; $0,11^{1-3}$ $0,20^{2-4}$; $\mathbf{0,03}^{3-4}$

Таблица 3.4.10

Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у ВУ и НУ мышей контрольных групп и с хроническим колитом, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Параметры \ **Группы наблюдения**		**Контрольные**		**Хронический колит**		**p**
		ВУ[1] (n=5)	**НУ[2] (n=6)**	**ВУ[3] (n=15)**	**НУ[4] (n=5)**	
Лимфоциты	10^6/мл	7,5 (5,6-9,7)	8,8 (7,0-11,2)	7,0 (5,6-9,5)	5,6 (5,4-7,7)	$0,5^{1-2}$; $0,8^{1-3}$ **$0,04^{2-4}$**; $0,4^{3-4}$
Т-лимфоциты (CD3+)	% от лимфоцитов	27,0 (25,1-29,9)	27,7 (27,0-32,1)	24,3 (22,4-25,6)	22,6 (19,2-26,2)	$0,41^{1-2}$; **$0,03^{1-3}$** **$0,04^{2-4}$**; $0,34^{3-4}$
	10^6/мл	1,9 (1,5-2,8)	2,6 (2,0-3,4)	1,7 (1,2-2,3)	1,3 (1,0-2,0)	$0,41^{1-2}$; $0,52^{1-3}$ **$0,04^{2-4}$**; $0,39^{3-4}$
Т-хелперы (CD3+CD4+)	% от лимфоцитов	16,8 (15,6-23,8)	14,9 (14,3-18,5)	12,3 (11,6-13,9)	10,5 (9,1-14,1)	$0,37^{1-2}$; **$0,007^{1-3}$** **$0,04^{2-4}$**; $0,17^{3-4}$
	10^6/мл	1,5 (1,0-1,7)	1,5 (1,1-1,9)	0,9 (0,7-1,2)	0,6 (0,5-1,1)	$0,99^{1-2}$; $0,06^{1-3}$ **$0,03^{2-4}$**; $0,17^{3-4}$
Цитотоксические Т-лимфоциты (CD3+CD8+)	% от лимфоцитов	12,0 (9,8-12,5)	12,7 (11,9-12,9)	11,4 (10,0-12,7)	9,8 (8,7-11,4)	$0,21^{1-2}$; $0,82^{1-3}$ **$0,03^{2-4}$**; $0,16^{3-4}$
	10^6/мл	0,8 (0,7-1,1)	1,0 (0,9-1,4)	0,8 (0,7-1,0)	0,7 (0,5-0,9)	$0,29^{1-2}$; $0,89^{1-3}$ **$0,04^{2-4}$**; $0,27^{3-4}$
В-лимфоциты (CD3-CD19+)	% от лимфоцитов	66,5 (64,4-69,8)	64,7 (60,8-66,3)	69,5 (66,6-70,5)	72,0 (66,7-76,9)	$0,29^{1-2}$; $0,46^{1-3}$ **$0,04^{2-4}$**; $0,09^{3-4}$
	10^6/мл	5,2 (3,6-6,5)	5,8 (4,4-7,0)	4,8 (3,7-5,6)	4,3 (4,1-5,1)	$0,73^{1-2}$; $0,66^{1-3}$ $0,22^{2-4}$; $0,80^{3-4}$
Регуляторные Т-лимфоциты (CD4+CD25+FOXP3+)	% от Т-хелперов	5,3 (3,1-9,0)	4,6 (3,2-5,8)	3,1 (2,1-4,5)	1,8 (0,9-1,8)	$0,90^{1-2}$; $0,09^{1-3}$ **$0,008^{2-4}$**; **$0,01^{3-4}$**
	10^6/мл	0,09 (0,04-0,09)	0,05 (0,04-0,1)	0,03 (0,02-0,04)	0,009 (0,007-0,01)	$0,73^{1-2}$; **$0,02^{1-3}$** **$0,008^{2-4}$**; **$0,003^{3-4}$**

Приложение 5. Морфологическая характеристика, молекулярно-биологические и иммунологические особенности колоректального рака у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6

Таблица 2.6

Последовательности использованных для ПЦР праймеров («Евроген», Россия)

Праймер	**Направление последовательности**	**Последовательность (5’ к 3’)**	**NCBI Ref Seq**	**Определяемый ген**
Референсный ген				
Gapdh	Прямая	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	NM_001289726.2	*Mus musculus* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*), transcript variant 1, мРНК
	Обратная	ACACATTGGGGGTAGGAACA		
Гены, регулирующие ответ на гипоксию				
Hif1a	Прямая	TGCTCTCACTCTGCTGGCTC	NM_001313919.2	*Mus musculus* hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (*Hif1a*), transcript variant 1, мРНК
	Обратная	TTTGGAGTTTCCGATGAAGG		
Epas1	Прямая	CCAAACACGGAGGATATGTG	NM_010137.3	*Mus musculus* endothelial PAS domain protein 1 (*Epas1*), мРНК
	Обратная	GTGTGGCTTGAACAGGGATT		
Hif3a	Прямая	CACAGCTCCCAATCTGCCAT	NM_001162950.1	*Mus musculus* hypoxia inducible factor 3, alpha subunit (*Hif3a*), transcript variant 1, мРНК
	Обратная	GCCTGAGGTTTAATCCTTGCTAC		
Vegf	Прямая	TGTACCTCCACCATGCCA	NM_009505.4	*Mus musculus* vascular endothelial growth factor A (*Vegfa*), transcript variant 2, мРНК
	Обратная	AATGCTTTCTCCGCTCTGAA		
Гены, регулирующие воспалительный ответ				
Nfkb	Прямая	TTTTCGACTACGCAGTGACG	NM_001410442.1	*Mus musculus* nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells 1, p105 (*Nfkb1*), transcript variant 2, мРНК
	Обратная	CCAAGTGCAGAGGTGTCTGA		

Таблица 2.6 (продолжение)

Последовательности использованных для ПЦР праймеров («Евроген», Россия)

Праймер	**Направление последовательности**	**Последовательность (5’ к 3’)**	**NCBI Ref Seq**	**Определяемый ген**
Il1b	Прямая	CCTGAACTCAACTGTGAAATGC	NM_008361.4	*Mus musculus* interleukin 1 beta (*Il1b*), мРНК
	Обратная	GAAAGACACAGGTAGCTGCCA		
Il6	Прямая	AGTTGCCTTCTTGGGACTGA	NM_031168.2	*Mus musculus* interleukin 6 (*Il6*), transcript variant 1, мРНК
	Обратная	CAAGTGCATCATCGTTGTTCA		
Tnfa	Прямая	CAGAGCCCCCAGTCTGTATC	NM_001278601.1	*Mus musculus* tumor necrosis factor (*Tnfa*), transcript variant 2, мРНК
	Обратная	CTCCCTTTGCAGAACTCAGG		
Il10	Прямая	GCCCAGAAATCAAGGAGCAT	NM_010548.2	*Mus musculus* interleukin 10 (*Il10*), мРНК
	Обратная	GCTCTGTCTAGGTCCTGGAGTC		
Tgfb	Прямая	CCGTGGCTTCTAGTGCTGA	NM_011577.2	*Mus musculus* transforming growth factor, beta 1 (*Tgfb1*), мРНК
	Обратная	GACTGGCGAGCCTTAGTTTG		
Гены, регулирующие клеточный цикл и апоптоз				
Trp53	Прямая	TTCTCCGAAGACTGGATGACTG	NM_011640.4	*Mus musculus* transformation related protein 53 (*Trp53*), transcript variant 1, мРНК
	Обратная	TCCATGCAGTGAGGTGATGG		
Pten	Прямая	GGACCAGAGACAAAAAGGGAGT	NM_008960.2	*Mus musculus* phosphatase and tensin homolog (*Pten*), мРНК
	Обратная	CCTTTAGCTGGCAGACCACA		
Egf	Прямая	GCTCCGTCCGTCTTATCAGG	NM_010113.4	*Mus musculus* epidermal growth factor (*Egf*), transcript variant 1, мРНК
	Обратная	TGAGAAGTTCGGGGTCAGGA		

Таблица 2.6 (продолжение)

Последовательности использованных для ПЦР праймеров («Евроген», Россия)

Праймер	**Направление последовательности**	**Последовательность (5’ к 3’)**	**NCBI Ref Seq**	**Определяемый ген**
Egfr	Прямая	CCATCTGGGCCAAAGATACCA	NM_207655.2	*Mus musculus* epidermal growth factor receptor (*Egfr*), transcript variant 1, мРНК
	Обратная	GACGTAGTCCAGGAGGCAAC		
Cmet	Прямая	CTCCCAGCCCCTCTGCTTTC	NM_008591.3	*Mus musculus* met proto-oncogene (*Met*), transcript variant 1, мРНК
	Обратная	ATGGGGGTTTCTGCCGTGAA		
Pcna	Прямая	CAAGTGGAGAGCTTGGCAATG	NM_011045.2	*Mus musculus* proliferating cell nuclear antigen (*Pcna*), мРНК
	Обратная	CCTCAGGACACGCTGGCAT		
Mki67	Прямая	AGGCGAAGTGGAGCTTCTGA	NM_001081117.2	*Mus musculus* antigen identified by monoclonal antibody Ki 67 (*Mki67*), мРНК
	Обратная	GCTGCTGCTTCTCCTTCACTG		
Bax	Прямая	GCTGATGGCAACTTCAACTG	NM_001411994.1	*Mus musculus* BCL2-associated X protein (*Bax*), transcript variant 2, мРНК
	Обратная	CCACCCTGGTCTTGGATC		
Bcl2	Прямая	CATGGACTGGAGAAGGGACT	NM_009741.5	*Mus musculus* B cell leukemia/lymphoma 2 (*Bcl2*), transcript variant 1, мРНК
	Обратная	ACCCCATTCTTCCTGATGC		
Гены, кодирующие компоненты эпителиального барьера				
Muc1	Прямая	GGTGACCACTTCTGCCAACT	NM_013605.2	*Mus musculus* mucin 1, transmembrane (*Muc1*), мРНК
	Обратная	TCCTTCTGAGAGCCACCACT		
Muc13	Прямая	AGCATGTCCCAGCTTTCTCA	NM_001382834.1	*Mus musculus* mucin 13, epithelial transmembrane (*Muc13*), transcript variant 1, мРНК
	Обратная	CCATTTGCTGCCTGAGGA		
Cldn2	Прямая	TGCGACACACAGCACAGGCATCAC	NM_001410421.1	*Mus musculus* claudin 2 (*Cldn2*), transcript variant 2, мРНК
	Обратная	TCAGGAACCAGCGGCGAGTAG		
Cldn7	Прямая	GCCTTGGTAGCATGTTCCTGGA	NM_001193619.1	*Mus musculus* claudin 7 (*Cldn7*), transcript variant 2, мРНК
	Обратная	GGTACGCAGCTTTGCTTTCACTG		

Таблица 3.5.1

Показатели массы тела в разные сроки после введения АОМ до 70-х сут эксперимента у ВУ и НУ мышей, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

Группы наблюдения	**Масса тела в разные сроки потребления ДСН, г**								**p<0,05**
	0-е сут (до начала эксперимента)	**8-е сут**	**15-е сут**	**29-е сут**	**36-е сут**	**50-е сут**	**55-е сут**	**70-е сут**	
ВУ (n=20)	20,0 (20,0-21,0)	20,0 (19,0-21,0)	20,0 (17,0-21,0)	23,0 (21,0-24,0)	18,5 (16,0-21,0)	24,0 (22,0-26,0)	25,0 (22,0-26,0)	24,0 (22,0-26,0)	**0,02**$^{0-50}$; **0,01**$^{0-55}$; **0,02**$^{0-70}$; **0,008**$^{8-50}$; **0,005**$^{8-55}$; **0,007**$^{8-70}$; **0,01**$^{15-29}$; **0,0002**$^{15-50}$; **0,0001**$^{15-55}$; **0,0002**$^{15-70}$; **0,001**$^{29-36}$; **0,0001**$^{36-50}$; **0,0003**$^{36-55}$; **0,001**$^{36-70}$
НУ (n=13)	20,0 (19,0-21,0)	21,0 (20,0-22,0)	19,0 (18,0-20,0)	23,0 (21,0-25,0)	20,0 (19,0-21,0)	25,0 (24,0-26,0)	25,0 (24,0-27,0)	26,0 (26,0-27,0)	**0,01**$^{0-50}$; **0,0002**$^{0-55}$; **0,001**$^{0-70}$; **0,01**$^{8-50}$; **0,001**$^{8-55}$; **0,0004**$^{8-70}$; **0,01**$^{15-29}$; **0,0002**$^{15-50}$; **0,0001**$^{15-55}$; **0,0001**$^{15-70}$; **0,001**$^{36-50}$; **0,001**$^{36-55}$; **0,0003**$^{36-70}$
p (ВУ-НУ)	0,84	0,38	0,76	0,62	**0,04**	0,33	0,09	**0,002**	

Таблица 3.5.2

Показатели массы тела у ВУ и НУ мышей контрольных и опытных групп до и через 70 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

Группы наблюдения	**Масса тела, г**				**p**
	Контрольные группы		**Опытные группы**		
	0-е сут (до начала эксперимента)[1]	**70-е сут[2]**	**0-е сут (до начала эксперимента)[3]**	**70-е сут[4]**	
ВУ	22,0 (21,0-22,0)	26,0 (25,0-27,0)	20,0 (20,0-21,0)	24,0 (22,0-26,0)	**0,007**[1-2]; 0,12[1-3] 0,08[2-4]; **0,01**[3-4]
НУ	23,0 (22,0-23,0)	28,0 (28,0-29,0)	20,0 (19,0-21,0)	26,0 (26,0-27,0)	**0,01**[1-2]; 0,14[1-3] **0,02**[2-4]; **0,005**[3-4]
p (ВУ-НУ)	0,24	**0,01**	0,84	**0,002**	

Таблица 3.5.5

Число эндокринных клеток и содержание бокаловидных клеток в слизистой оболочке дистального отдела ободочной кишки у ВУ и НУ мышей контрольных групп и через 70 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН в зонах вне опухолей и в опухолях, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

Группы наблюдения / **Параметры**	**Контрольные**		**Опытные**				**p<0,05**
	Нормальная ткань		**Вне опухоли**		**В опухоли**		
	ВУ[1] (n=5)	**НУ[2] (n=5)**	**ВУ[3] (n=13)**	**НУ[4] (n=9)**	**ВУ[5] (n=13)**	**НУ[6] (n=9)**	
Число эндокринных клеток/мм^2	140,4 (103,0-172,1)	143,0 (127,5-185,5)	121,0 (87,3-185,3)	170,0 (147,5-191,0)	477,8 (347,6-904,6)	339,6 (195,6-617,3)	**0,012**[1-5] **0,04**[2-6] **0,0009**[3-5]
Содержание бокаловидных клеток, %	42,7 (31,9-44,7)	34,5 (33,2-38,5)	34,0 (25,5-40,2)	28,2 (25,1-33,2)	5,9 (4,1-17,1)	7,7 (2,7-9,8)	**0,009**[1-5] **0,03**[2-6]

Таблица 3.5.6

Показатели клинического анализа крови и индексы LMR, NLR и SIRI у ВУ и НУ мышей в контрольных группах и через 70 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Группы наблюдения / **Параметры**	**Контрольные**		**Опытные**		**p**
	ВУ[1] (n=5)	**НУ[2] (n=5)**	**ВУ[3] (n=13)**	**НУ[4] (n=9)**	
Лейкоциты, 10^9/л	11,0 (7,1-14,3)	16,9 (16,5-17,1)	8,4 (7,0-11,8)	11,5 (8,4-14,8)	**0,04**$^{1-2}$; 0,41$^{1-3}$ 0,41$^{3-4}$; 0,16$^{2-4}$
Лимфоциты, 10^9/л	6,4 (3,7-8,4)	12,8 (12,3-13,4)	5,8 (4,5-8,3)	7,4 (6,1-8,7)	**0,0007**$^{1-2}$; 0,96$^{1-3}$ 0,19$^{3-4}$; **0,009**$^{2-4}$
Лимфоциты, %	75,4 (69,7-77,9)	76,2 (73,2-78,0)	71,9 (64,3-76,3)	74,5 (67,1-77,7)	0,90$^{1-2}$; 0,41$^{1-3}$ 0,51$^{3-4}$; 0,67$^{2-4}$
Моноциты, 10^9/л	0,30 (0,15-0,40)	0,50 (0,43-0,50)	0,30 (0,23-0,45)	0,30 (0,25-0,35)	**0,04**$^{1-2}$; 0,79$^{1-3}$ 0,91$^{3-4}$; **0,02**$^{2-4}$
Моноциты, %	2,7 (2,5-3,1)	3,0 (2,9-3,2)	3,5 (3,0-3,9)	3,0 (2,6-3,2)	0,29$^{1-2}$; **0,04**$^{1-3}$ **0,04**$^{3-4}$; 0,77$^{2-4}$
Гранулоциты, 10^9/л	2,6 (1,6-3,1)	3,4 (2,3-4,0)	2,1 (1,5-3,9)	2,8 (1,7-4,1)	0,13$^{1-2}$; 0,91$^{1-3}$ 0,91$^{3-4}$; 0,91$^{2-4}$
Гранулоциты, %	21,9 (19,4-27,5)	19,8 (19,0-23,4)	25,2 (22,0-30,0)	21,9 (20,2-26,4)	0,56$^{1-2}$; 0,31$^{1-3}$ 0,33$^{3-4}$; 0,48$^{2-4}$
Эритроциты, 10^{12}/л	9,6 (9,4-9,9)	9,7 (9,6-9,8)	8,7 (8,0-8,9)	9,0 (8,9-9,3)	0,56$^{1-2}$; **0,008**$^{1-3}$ 0,06$^{3-4}$; **0,02**$^{2-4}$
Гемоглобин, г/л	142,0 (136,5-144,5)	143,0 (138,3-144,0)	128,0 (111,5-131,0)	132,0 (123,0-135,5)	0,70$^{1-2}$; **0,008**$^{1-3}$ 0,21$^{3-4}$; **0,02**$^{2-4}$
LMR, усл.ед.	27,0 (25,6-33,5)	25,6 (24,6-26,8)	20,7 (19,9-27,8)	25.9 (24,8-28,0)	0,25$^{1-2}$; 0,10$^{1-3}$ 0,25$^{3-4}$; 0,91$^{2-4}$
NLR, усл.ед.	0,29 (0,25-0,39)	0,26 (0,24-0,32)	0,35 (0,30-0,46)	0,30 (0,28-0,47)	0,56$^{1-2}$; 0,31$^{1-3}$ 0,55$^{3-4}$; 0,19$^{2-4}$
SIRI, усл. ед.	0,10 (0,05-0,11)	0,13 (0,12-0,16)	0,10 (0,06-0,19)	0,11 (0,07-0,16)	**0,02**$^{1-2}$; 0,69$^{1-3}$ 0,93$^{3-4}$; 0,76$^{2-4}$

Таблица 3.5.11

Уровни экспрессии генов *Hif1a, Epas1, Hif3a* и *Vegf* в дистальном отделе ободочной кишки у ВУ и НУ мышей контрольных групп и через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

Группы наблюдения / **Параметры**	**Контрольные**		**Опытные**				**p**
	Нормальная ткань		**Перитуморальная зона**		**Опухоль**		
	ВУ[1] (n=5)	**НУ[2] (n=5)**	**ВУ[3] (n=7)**	**НУ[4] (n=8)**	**ВУ[5] (n=7)**	**НУ[6] (n=8)**	
Уровень экспрессии гена *Hif1a*, усл.ед. $\times 10^{-2}$	4,11 (3,71-6,49)	7,45 (7,26-7,64)	14,8 (8,88-20,43)	7,21 (4,83-8,67)	5,87 (5,33-5,99)	7,33 (5,52-17,99)	**0,03**$^{1-2}$; 0,17$^{3-4}$; 0,19$^{5-6}$ 0,06$^{1-3}$; 0,29$^{1-5}$; **0,02**$^{3-5}$ 0,52$^{2-4}$; 0,90$^{2-6}$; 0,69$^{4-6}$
Уровень экспрессии гена *Epas1*, усл.ед. $\times 10^{-2}$	4,34 (2,18-5,45)	2,34 (2,08-2,53)	11,51 (4,57-18,47)	4,62 (2,72-12,35)	1,55 (1,10-1,60)	1,97 (0,76-5,25)	0,29$^{1-2}$; 0,37$^{3-4}$; 0,27$^{5-6}$ 0,20$^{1-3}$; **0,02**$^{1-5}$; **0,01**$^{3-5}$ 0,13$^{2-4}$; 0,84$^{2-6}$; 0,55$^{4-6}$
Уровень экспрессии гена *Hif3a*, усл.ед. $\times 10^{-2}$	0,07 (0,03-0,08)	0,18 (0,18-0,20)	0,08 (0,04-0,11)	0,07 (0,03-0,22)	0,03 (0,02-0,03)	0,09 (0,06-0,11)	**0,02**$^{1-2}$; 0,99$^{3-4}$; **0,02**$^{5-6}$ 0,89$^{1-3}$; 0,29$^{1-5}$; **0,02**$^{3-5}$ 0,22$^{2-4}$; **0,02**$^{2-6}$; 0,99$^{4-6}$
Уровень экспрессии гена *Vegf*, усл.ед. $\times 10^{-2}$	0,03 (0,02-0,05)	0,03 (0,02-0,04)	0,02 (0,01-0,03)	0,02 (0,01-0,20)	0,012 (0,011-0,014)	0,08 (0,04-0,11)	0,56$^{1-2}$; 0,90$^{3-4}$; **0,02**$^{5-6}$ 0,11$^{1-3}$; **0,02**$^{1-5}$; 0,29$^{3-5}$ 0,99$^{2-4}$; **0,04**$^{2-6}$; 0,56$^{4-6}$

Таблица 3.5.12

Уровни экспрессии генов *Nfkb, Tnfa, Il1b* и *Il6* в дистальном отделе ободочной кишки у ВУ и НУ мышей контрольных групп и через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

Группы наблюдения / **Параметры**	**Контрольные**		**Опытные**				**p**
	Нормальная ткань		**Перитуморальная зона**		**Ткани опухоли**		
	ВУ[1] (n=5)	**НУ[2] (n=5)**	**ВУ[3] (n=7)**	**НУ[4] (n=8)**	**ВУ[5] (n=7)**	**НУ[6] (n=8)**	
Уровень экспрессии гена *Nfkb*, усл.ед.	0,004 (0,003-0,006)	0,008 (0,008-0,009)	0,014 (0,005-0,022)	0,004 (0,002-0,007)	0,009 (0,008-0,010)	0,009 (0,002-0,014)	**0,02**$^{1-2}$; 0,20$^{3-4}$; 0,84$^{5-6}$ 0,34$^{1-3}$; **0,02**$^{1-5}$; 0,29$^{3-5}$ 0,05$^{2-4}$; 0,84$^{2-6}$; 0,44$^{4-6}$
Уровень экспрессии гена *Tnfa*, усл.ед.	0,004 (0,002-0,007)	0,002 (0,002-0,003)	0,006 (0,002-0,010)	0,0022 (0,0006-0,0057)	0,0014 (0,0014-0,0028)	0,007 (0,005-0,076)	0,11$^{1-2}$; 0,69$^{3-4}$; **0,03**$^{5-6}$ 0,69$^{1-3}$; 0,11$^{1-5}$; 0,34$^{3-5}$ 0,90$^{2-4}$; **0,03**$^{2-6}$; 0,11$^{4-6}$
Уровень экспрессии гена *Il1b*, усл.ед.	0,002 (0,0003-0,003)	0,002 (0,0006-0,003)	0,12 (0,04-0,20)	0,04 (0,02-0,42)	0,06 (0,06-0,09)	0,56 (0,05-1,23)	0,99$^{1-2}$; 0,89$^{3-4}$; 0,43$^{5-6}$ **0,03**$^{1-3}$; **0,01**$^{1-5}$; 0,26$^{3-5}$ **0,02**$^{2-4}$; **0,008**$^{2-6}$; 0,19$^{4-6}$
Уровень экспрессии гена *Il6*, усл.ед.	0,000002 (0,0000005-0,00004)	0,000001 (0,0000005-0,000002)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0003)	0,00006 (0,00003-0,00008)	0,00012 (0,00007-0,0018)	0,32$^{1-2}$; 0,99$^{3-4}$; 0,11$^{5-6}$ 0,14$^{1-3}$; 0,07$^{1-5}$; 0,06$^{3-5}$ 0,41$^{2-4}$; **0,02**$^{2-6}$; 0,20$^{4-6}$

Таблица 3.5.13

Уровни экспрессии генов *Il10* и *Tgfb* в дистальном отделе ободочной кишки у ВУ и НУ мышей контрольных групп и через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

Группы наблюдения / **Параметры**	**Контрольные**		**Опытные**				**p**
	Нормальная ткань		**Перитуморальная зона**		**Ткани опухоли**		
	ВУ[1] (n=5)	**НУ[2] (n=5)**	**ВУ[3] (n=7)**	**НУ[4] (n=8)**	**ВУ[5] (n=7)**	**НУ[6] (n=8)**	
Уровень экспрессии гена *Il10*, усл.ед.	0,00004 (0,00001-0,0002)	0,0011 (0,0004-0,003)	0,0023 (0,0008-0,0039)	0,0010 (0,0002-0,0016)	0,000008 (0,000008-0,000009)	0,00011 (0,00005-0,00194)	**0,03**$^{1-2}$; 0,20$^{3-4}$ **0,04**$^{5-6}$; **0,04**$^{1-3}$ 0,09$^{1-5}$; **0,04**$^{3-5}$ 0,89$^{2-4}$; 0,19$^{2-6}$ 0,56$^{4-6}$
Уровень экспрессии гена *Tgfb*, усл.ед.	0,002 (0,001-0,006)	0,001 (0,001-0,045)	0,037 (0,011-0,063)	0,0090 (0,0003-0,0379)	0,0007 (0,0007-0,0007)	0,004 (0,001-0,032)	0,90$^{1-2}$; 0,29$^{3-4}$ **0,04**$^{5-6}$; 0,11$^{1-3}$ 0,11$^{1-5}$; **0,04**$^{3-5}$ 0,99$^{2-4}$; 0,73$^{2-6}$ 0,99$^{4-6}$

Таблица 3.5.14

Уровни экспрессии генов *Trp53, Pten, Egf, Egfr, Cmet, Mki67* и *Pcna* в дистальном отделе ободочной кишки у ВУ и НУ мышей контрольных групп и через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

Группы наблюдения / Параметры	**Контрольные**		**Опытные**				**p**
	Нормальная ткань		**Перитуморальная зона**		**Ткани опухоли**		
	ВУ[1] (n=5)	**НУ[2] (n=5)**	**ВУ[3] (n=7)**	**НУ[4] (n=8)**	**ВУ[5] (n=7)**	**НУ[6] (n=8)**	
Уровень экспрессии гена *Trp53*, усл.ед.	0,02 (0,01-0,03)	0,05 (0,049-0,051)	0,04 (0,01-0,07)	0,02 (0,01-0,08)	0,05 (0,04-0,05)	0,04 (0,02-0,08)	**0,02**$^{1-2}$; 0,99$^{3-4}$; 0,55$^{5-6}$ 0,34$^{1-3}$; **0,02**$^{1-5}$; 0,56$^{3-5}$ 0,69$^{2-4}$; 0,55$^{2-6}$; 0,99$^{4-6}$
Уровень экспрессии гена *Pten*, усл.ед.	0,007 (0,005-0,008)	0,004 (0,004-0,005)	0,04 (0,01-0,07)	0,008 (0,004-0,01)	0,011 (0,010-0,013)	0,01 (0,007-0,02)	**0,03**$^{1-2}$; 0,34$^{3-4}$; 0,69$^{5-6}$ 0,34$^{1-3}$; **0,02**$^{1-5}$; 0,29$^{3-5}$ 0,11$^{2-4}$; **0,008**$^{2-6}$; 0,41$^{4-6}$
Уровень экспрессии гена *Egf*, усл.ед.	0,0004 (0,0002-0,0005)	0,0001 (0,0-0,0002)	0,0 (0,0-0,0)	0,02 (0,003-0,03)	0,0 (0,0-0,0)	0,001 (0,0005-0,02)	0,06$^{1-2}$; **0,04**$^{3-4}$; **0,04**$^{5-6}$ 0,06$^{1-3}$; 0,06$^{1-5}$; 0,99$^{3-5}$ **0,02**$^{2-4}$; **0,008**$^{2-6}$; 0,32$^{4-6}$
Уровень экспрессии гена *Egfr*, усл.ед.	0,005 (0,001-0,01)	0,0006 (0,0005-0,0007)	0,03 (0,008-0,04)	0,009 (0,003-0,03)	0,003 (0,003-0,004)	0,008 (0,006-0,02)	**0,03**$^{1-2}$; 0,69$^{3-4}$; **0,003**$^{5-6}$ 0,20$^{1-3}$; 0,41$^{1-5}$; 0,23$^{3-5}$ **0,02**$^{2-4}$; **0,008**$^{2-6}$; 0,99$^{4-6}$

Таблица 3.5.14 (продолжение)

Уровни экспрессии генов *Trp53, Pten, Egf, Egfr, Cmet, Mki67* и *Pcna* в дистальном отделе ободочной кишки у ВУ и НУ мышей контрольных групп и через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

Группы наблюдения / **Параметры**	**Контрольные**		**Опытные**				**p**
	Нормальная ткань		**Перитуморальная зона**		**Ткани опухоли**		
	ВУ[1] (n=5)	**НУ[2] (n=5)**	**ВУ[3] (n=7)**	**НУ[4] (n=8)**	**ВУ[5] (n=7)**	**НУ[6] (n=8)**	
Уровень экспрессии гена *Cmet*, усл.ед.	0,02 (0,02-0,04)	0,018 (0,017-0,018)	0,24 (0,08-0,40)	0,03 (0,02-0,08)	0,018 (0,018-0,021)	0,03 (0,02-0,05)	**0,02**$^{1-2}$; 0,11$^{3-4}$; **0,04**$^{5-6}$ 0,06$^{1-3}$; 0,11$^{1-5}$; **0,03**$^{3-5}$ 0,29$^{2-4}$; **0,008**$^{2-6}$; 0,99$^{4-6}$
Уровень экспрессии гена *Mki67*, усл.ед.	0,006 (0,002-0,03)	0,005 (0,005-0,006)	0,03 (0,01-0,05)	0,02 (0,009-0,48)	0,009 (0,009-0,009)	0,003 (0,002-0,004)	0,99$^{1-2}$; 0,86$^{3-4}$; 0,08$^{5-6}$ 0,17$^{1-3}$; 0,29$^{1-5}$; 0,34$^{3-5}$ **0,02**$^{2-4}$; 0,08$^{2-6}$; 0,09$^{4-6}$
Уровень экспрессии гена *Pcna*, усл.ед.	0,02 (0,006-0,07)	0,011 (0,007-0,013)	0,06 (0,02-0,1)	0,24 (0,06-0,6)	0,017 (0,015-0,020)	0,02 (0,01-0,03)	0,76$^{1-2}$; 0,17$^{3-4}$; 0,63$^{5-6}$ 0,46$^{1-3}$; 0,99$^{1-5}$; 0,34$^{3-5}$ **0,04**$^{2-4}$; **0,04**$^{2-6}$; 0,20$^{4-6}$

Таблица 3.5.15

Уровни экспрессии генов *Bax, Bcl2* и соотношение *Bax/Bcl2* в дистальном отделе ободочной кишки у ВУ и НУ мышей контрольных групп и через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

Группы наблюдения / **Параметры**	**Контрольные**		**Опытные**				**p**
	Нормальная ткань		**Перитуморальная зона**		**Ткани опухоли**		
	ВУ[1] (n=5)	**НУ[2] (n=5)**	**ВУ[3] (n=7)**	**НУ[4] (n=8)**	**ВУ[5] (n=7)**	**НУ[6] (n=8)**	
Уровень экспрессии гена *Bax*, усл.ед.	0,037 (0,031-0,054)	0,103 (0,098-0,106)	0,153 (0,063-0,243)	0,048 (0,034-0,396)	0,060 (0,058-0,061)	0,112 (0,077-0,239)	**0,02**$^{1-2}$; 0,99$^{3-4}$; **0,02**$^{5-6}$ 0,20$^{1-3}$; 0,06$^{1-5}$; 0,34$^{3-5}$ 0,69$^{2-4}$; 0,69$^{2-6}$; 0,69$^{4-6}$
Уровень экспрессии гена *Bcl2*, усл.ед.	0,00008 (0,00003-0,00013)	0,00001 (0,00001-0,00001)	0,0003 (0,0002-0,0004)	0,00013 (0,00008-0,00041)	0,0001 (0,0001-0,0001)	0,00007 (0,00002-0,0003)	**0,008**$^{1-2}$; 0,37$^{3-4}$; 0,19$^{5-6}$ **0,03**$^{1-3}$; 0,34$^{1-5}$; **0,03**$^{3-5}$; **0,008**$^{2-4}$; **0,04**$^{2-6}$; 0,19$^{4-6}$
Соотношение *Bax/Bcl2*	470,2 (391,3-1552,6)	9319,5 (8818,6-10432,0)	497,5 (268,7-585,4)	467,7 (68,8-637,5)	452,0 (398,6-621,5)	1504,9 (657,0-2676,8)	**0,02**$^{1-2}$; 0,73$^{3-4}$; 0,06$^{5-6}$ 0,89$^{1-3}$; 0,89$^{1-5}$; 0,89$^{3-5}$ **0,008**$^{2-4}$; **0,02**$^{2-6}$; 0,06$^{4-6}$

Таблица 3.5.16

Уровни экспрессии генов *Muc1, Muc13, Cldn2 и Cldn7* в дистальном отделе ободочной кишки у ВУ и НУ мышей контрольных групп и через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

Группы наблюдения / **Параметры**	**Контрольные**		**Опытные**				**p**
	Нормальная ткань		**Перитуморальная зона**		**Ткани опухоли**		
	ВУ[1] (n=5)	**НУ[2] (n=5)**	**ВУ[3] (n=7)**	**НУ[4] (n=8)**	**ВУ[5] (n=7)**	**НУ[6] (n=8)**	
Уровень экспрессии гена *Muc1*, усл.ед.	0,04 (0,02-0,06)	0,005 (0,005-0,007)	0,14 (0,04-0,24)	0,03 (0,01-0,04)	0,02 (0,01-0,02)	0,03 (0,02-0,03)	**0,02**$^{1-2}$; 0,20$^{3-4}$; **0,008**$^{5-6}$ 0,34$^{1-3}$; 0,19$^{1-5}$; 0,29$^{3-5}$ **0,02**$^{2-4}$; **0,008**$^{2-6}$; 0,99$^{4-6}$
Уровень экспрессии гена *Muc13*, усл.ед.	0,34 (0,26-0,55)	0,14 (0,13-0,14)	0,66 (0,35-0,97)	0,19 (0,17-0,24)	0,07 (0,06-0,08)	0,09 (0,05-0,10)	**0,006**$^{1-2}$; 0,06$^{3-4}$; 0,41$^{5-6}$ 0,34$^{1-3}$; **0,02**$^{1-5}$; **0,02**$^{3-5}$ **0,006**$^{2-4}$; **0,01**$^{2-6}$; **0,03**$^{4-6}$
Уровень экспрессии гена *Cldn2*, усл.ед.	0,02 (0,01-0,03)	0,029 (0,028-0,031)	0,30 (0,08-0,53)	0,02 (0,01-0,08)	0,04 (0,03-0,05)	0,02 (0,02-0,04)	**0,006**$^{1-2}$; 0,29$^{3-4}$; 0,31$^{5-6}$ 0,34$^{1-3}$; **0,04**$^{1-5}$; 0,29$^{3-5}$ 0,64$^{2-4}$; 0,11$^{2-6}$; 0,99$^{4-6}$
Уровень экспрессии гена *Cldn7*, усл.ед.	0,3 (0,2-0,5)	0,1 (0,1-0,1)	6,8 (1,8-11,8)	0,2 (0,1-0,7)	0,1 (0,1-0,1)	0,1 (0,1-0,3)	**0,02**$^{1-2}$; 0,06$^{3-4}$; **0,04**$^{5-6}$ 0,20$^{1-3}$; 0,06$^{1-5}$; 0,06$^{3-5}$ 0,15$^{2-4}$; 0,69$^{2-6}$; 0,69$^{4-6}$

Таблица 3.5.21

Морфометрическое исследование селезенки у ВУ и НУ мышей контрольных групп и через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Группы наблюдения / **Параметры**	**Контрольные**		**Опытные**		**p**
	ВУ[1] (n=5)	**НУ[2] (n=5)**	**ВУ[3] (n=7)**	**НУ[4] (n=8)**	
Объемная доля белой пульпы, %	39,4 (33,6-44,4)	43,9 (39,6-48,2)	35,3 (33,3-39,5)	36,4 (28,6-43,1)	$0,08^{1-2}$; $0,35^{1-3}$ $0,06^{2-4}$; $0,84^{3-4}$
Отношение белой пульпы к красной, усл. ед.	0,65 (0,51-0,80)	0,79 (0,66-0,93)	0,55 (0,50-0,65)	0,57 (0,40-0,78)	$0,08^{1-2}$; $0,35^{1-3}$ $0,06^{2-4}$; $0,84^{3-4}$
Объемная доля лимфоидных узелков, %	22,8 (19,4-27,5)	10,3 (4,4-16,2)	29,6 (28,5-37,7)	31,1 (29,9-41,6)	**0,003**$^{1-2}$; **0,01**$^{1-3}$ **0,002**$^{2-4}$; $0,33^{3-4}$
Объемная доля ПАЛМ-зон, %	77,2 (72,5-80,7)	89,7 (83,8-95,6)	70,4 (62,4-71,5)	68,9 (58,4-70,1)	**0,003**$^{1-2}$; **0,01**$^{1-3}$ **0,002**$^{2-4}$; $0,33^{3-4}$
Объемная доля маргинальных зон лимфоидных узелков, %	45,2 (41,3-48,4)	43,9 (41,6-46,2)	50,0 (45,8-51,1)	48,5 (42,7-54,8)	$0,53^{1-2}$; $0,06^{1-3}$ $0,18^{2-4}$; $0,78^{3-4}$
Объемная доля светлых центров лимфоидных узелков, %	7,8 (6,4-9,2)	6,0 (4,9-7,0)	10,1 (6,6-11,3)	11,1 (9,9-11,9)	$0,18^{1-2}$; $0,30^{1-3}$ **0,002**$^{2-4}$; $0,22^{3-4}$

Таблица 3.5.22

Абсолютное и относительное количество Т-лимфоцитов, цитотоксических Т-лимфоцитов, регуляторных Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, NK клеток и макрофагов в брыжеечных лимфатических узлах у ВУ и НУ мышей контрольных групп и через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Группы наблюдения / **Параметры**		**Контрольные**		**Опытные**		**p**
		ВУ[1] (n=5)	**НУ[2] (n=5)**	**ВУ[3] (n=7)**	**НУ[4] (n=8)**	
Т-хелперы (CD3+CD4+)	% от всех клеток	13,2 (10,8-72,7)	11,3 (9,2-13,8)	17,0 (9,2-22,9)	14,6 (8,6-21,7)	$0,56^{1-2}$; $0,99^{1-3}$ $0,52^{2-4}$; $0,46^{3-4}$
	10^6/мл	1,6 (1,3-6,9)	1,1 (1,0-1,2)	2,0 (0,8-3,4)	1,5 (0,9-3,6)	**0,03**$^{1-2}$; $0,99^{1-3}$ $0,34^{2-4}$; $0,89^{3-4}$
Цитотоксические Т-лимфоциты (CD3+CD8+)	% от всех клеток	0,10 (0,03-0,2)	0,10 (0,0-0,10)	0,15 (0,10-0,35)	0,10 (0,10-0,33)	$0,64^{1-2}$; $0,49^{1-3}$ $0,28^{2-4}$; $0,99^{3-4}$
	10^6/мл	0,013 (0,002-0,018)	0,009 (0,002-0,010)	0,015 (0,01-0,04)	0,018 (0,013-0,04)	$0,77^{1-2}$; $0,69^{1-3}$ **0,03**$^{2-4}$; $0,69^{3-4}$
Регуляторные Т-лимфоциты (CD4+CD25+FOXP3+)	% от Т-хелперов	0,0 (0,0-0,3)	0,0 (0,0-0,0)	0,15 (0,03-0,20)	0,10 (0,03-0,10)	$0,99^{1-2}$; $0,49^{1-3}$ $0,14^{2-4}$; $0,63^{3-4}$
	10^6/мл	0,0 (0,0-0,02)	0,0 (0,0-0,0001)	0,0044 (0,0008-0,0154)	0,006 (0,001-0,008)	$0,99^{1-2}$; $0,49^{1-3}$ $0,14^{2-4}$; $0,97^{3-4}$

Таблица 3.5.22 (продолжение)

Абсолютное и относительное количество Т-лимфоцитов, цитотоксических Т-лимфоцитов, регуляторных Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, NK клеток и макрофагов в брыжеечных лимфатических узлах у ВУ и НУ мышей контрольных групп и через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Группы наблюдения / **Параметры**		**Контрольные**		**Опытные**		**p**
		ВУ[1] (n=5)	**НУ[2] (n=5)**	**ВУ[3] (n=7)**	**НУ[4] (n=8)**	
В-лимфоциты (CD3-CD19+)	% от всех клеток	0,35 (0,13-16,18)	0,30 (0,15-0,38)	0,25 (0,10-0,78)	2,30 (1,55-5,23)	$0,71^{1-2}$; $0,68^{1-3}$ **$0,03^{2-4}$**; **$0,03^{3-4}$**
	10^6/мл	0,04 (0,02-1,53)	0,03 (0,01-0,04)	0,03 (0,008-0,115)	0,24 (0,17-0,90)	$0,40^{1-2}$; $0,69^{1-3}$ **$0,04^{2-4}$**; **$0,03^{3-4}$**
NK клетки (CD3-NK1.1+)	% от всех клеток	0,2 (0,2-0,3)	0,2 (0,2-0,3)	0,3 (0,3-0,7)	1,2 (0,8-1,5)	$0,99^{1-2}$; $0,11^{1-3}$ **$0,03^{2-4}$**; **$0,04^{3-4}$**
	10^6/мл	0,02 (0,02-0,04)	0,02 (0,02-0,02)	0,03 (0,02-0,09)	0,13 (0,13-0,16)	$0,89^{1-2}$; $0,34^{1-3}$ **$0,03^{2-4}$**; **$0,03^{3-4}$**
Макрофаги (F4/80+)	% от всех клеток	4,6 (1,4-16,9)	7,3 (6,3-7,8)	4,1 (2,6-6,4)	3,9 (2,1-4,3)	$0,46^{1-2}$; $0,99^{1-3}$ **$0,03^{2-4}$**; $0,43^{3-4}$
	10^6/мл	0,61 (0,17-1,63)	0,63 (0,59-0,77)	0,53 (0,25-0,66)	0,40 (0,22-0,70)	$0,86^{1-2}$; $0,86^{1-3}$ $0,20^{2-4}$; $0,80^{3-4}$

Таблица 3.5.23

Показатели клинического анализа крови у ВУ и НУ мышей контрольных групп и через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Группы наблюдения / **Параметры**	**Контрольные**		**Опытные**		**p**
	ВУ[1] (n=5)	**НУ[2] (n=5)**	**ВУ[3] (n=7)**	**НУ[4] (n=8)**	
Лейкоциты, 10^9/л	6,7 (6,0-11,6)	16,7 (11,2-17,1)	8,0 (5,0-15,7)	10,9 (8,7-11,1)	**0,02**$^{1-2}$; 0,44$^{1-3}$ 0,79$^{3-4}$; 0,20$^{2-4}$
Лимфоциты, 10^9/л	4,4 (3,6-7,8)	12,6 (8,3-13,3)	4,5 (3,0-8,9)	7,1 (5,5-7,9)	**0,02**$^{1-2}$; 0,68$^{1-3}$ 0,73$^{3-4}$; 0,11$^{2-4}$
Лимфоциты, %	66,5 (61,3-70,4)	75,6 (72,9-78,0)	54,3 (49,8-65,8)	65,3 (62,4-71,1)	**0,003**$^{1-2}$; 0,06$^{1-3}$ 0,17$^{3-4}$; **0,03**$^{2-4}$
Моноциты, 10^9/л	0,2 (0,2-0,4)	0,5 (0,4-0,5)	0,3 (0,2-0,7)	0,3 (0,3-0,4)	**0,003**$^{1-2}$; 0,64$^{1-3}$ 0,99$^{3-4}$; 0,07$^{2-4}$
Моноциты, %	3,2 (3,0-3,4)	3,5 (3,3-3,6)	4,0 (3,4-4,7)	3,1 (2,9-3,4)	0,05$^{1-2}$; **0,04**$^{1-3}$ **0,04**$^{3-4}$; 0,06$^{2-4}$
Гранулоциты, 10^9/л	2,3 (2,0-3,0)	3,2 (2,5-3,9)	3,3 (1,8-6,2)	3,1 (2,7-3,5)	0,10$^{1-2}$; 0,31$^{1-3}$ 0,95$^{3-4}$; 0,99$^{2-4}$
Гранулоциты, %	29,6 (26,2-35,0)	30,8 (23,9-33,7)	36,3 (30,8-44,5)	22,9 (19,5-31,2)	0,71$^{1-2}$; 0,15$^{1-3}$ 0,07$^{3-4}$; 0,08$^{2-4}$
Эритроциты, 10^{12}/л	8,9 (8,7-9,2)	9,7 (9,4-9,8)	7,9 (7,1-8,7)	8,5 (8,3-8,8)	**0,006**$^{1-2}$; **0,03**$^{1-3}$ 0,41$^{3-4}$; **0,03**$^{2-4}$
Гемоглобин, г/л	127,0 (125,0-132,5)	143,0 (134,5-144,0)	111,0 (91,5-120,5)	117,0 (116,0-123,3)	**0,01**$^{1-2}$; **0,005**$^{1-3}$ 0,37$^{3-4}$; **0,03**$^{2-4}$
MCH, пг	14,3 (14,0-16,6)	14,6 (14,4-14,7)	13,9 (13,7-14,1)	13,8 (13,7-14,0)	0,20$^{1-2}$; **0,01**$^{1-3}$ 0,50$^{3-4}$; **0,02**$^{2-4}$
MCV, фл	46,1 (45,3-46,9)	45,3 (44,9-45,7)	45,6 (45,2-46,1)	46,1 (45,2-47,7)	0,10$^{1-2}$; 0,40$^{1-3}$ 0,70$^{3-4}$; 0,20$^{2-4}$

Таблица 3.5.25

Субпопуляционный состав клеток периферической крови у ВУ и НУ мышей контрольных групп и через 140 сут после введения АОМ и потребления трех циклов ДСН, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Параметры \ Группы наблюдения		Контрольные		Опытные		p
		ВУ[1] (n=5)	**НУ[2] (n=5)**	**ВУ[3] (n=7)**	**НУ[4] (n=8)**	
Т-хелперы (CD3+CD4+)	% от лимфоцитов	45,4 (29,7-61,3)	41,7 (28,0-57,6)	12,8 (6,4-23,2)	18,4 (16,9-19,8)	$0,49^{1-2}$; $\mathbf{0,03}^{1-3}$ $\mathbf{0,03}^{2-4}$; $0,56^{3-4}$
	10^6/мл	2,2 (1,2-3,3)	5,7 (3,7-7,2)	0,6 (0,2-2,1)	1,3 (1,0-1,5)	$\mathbf{0,04}^{1-2}$; $0,19^{1-3}$ $\mathbf{0,03}^{2-4}$; $0,73^{3-4}$
Цитотоксические Т-лимфоциты (CD3+CD8+)	% от лимфоцитов	13,3 (2,8-18,8)	10,1 (9,5-14,3)	8,2 (6,9-11,9)	25,9 (20,8-28,6)	$0,99^{1-2}$; $0,56^{1-3}$ $\mathbf{0,03}^{2-4}$; $\mathbf{0,02}^{3-4}$
	10^6/мл	0,9 (0,1-1,4)	1,3 (1,2-1,9)	0,4 (0,2-1,1)	1,6 (1,3-2,2)	$0,69^{1-2}$; $0,90^{1-3}$ $0,49^{2-4}$; $\mathbf{0,02}^{3-4}$
Регуляторные Т-лимфоциты (CD4+CD25+FOXP3+)	% от Т-хелперов	36,3 (26,0-41,2)	37,1 (30,6-41,1)	1,4 (0,3-4,8)	15,2 (1,3-29,1)	$0,69^{1-2}$; $\mathbf{0,03}^{1-3}$ $0,11^{2-4}$; $0,34^{3-4}$
	10^6/мл	0,04 (0,02-0,08)	0,06 (0,04-0,06)	0,0007 (0,0001-0,001)	0,002 (0,0005-0,004)	$0,69^{1-2}$; $\mathbf{0,04}^{1-3}$ $\mathbf{0,03}^{2-4}$; $0,40^{3-4}$
В-лимфоциты (CD3-CD19+)	% от лимфоцитов	8,9 (6,1-14,3)	7,5 (6,4-9,3)	16,2 (8,6-26,4)	30,6 (24,8-33,1)	$0,89^{1-2}$; $0,19^{1-3}$ $\mathbf{0,03}^{2-4}$; $0,11^{3-4}$
	10^6/мл	0,6 (0,2-1,1)	1,0 (0,8-1,2)	0,7 (0,3-2,3)	1,9 (1,6-2,6)	$0,34^{1-2}$; $0,73^{1-3}$ $\mathbf{0,03}^{2-4}$; $0,41^{3-4}$
NK клетки (CD3-NK1.1+)	% от лимфоцитов	20,8 (20,1-30,4)	21,9 (19,6-25,2)	2,5 (2,5-3,1)	7,6 (5,6-22,3)	$0,89^{1-2}$; $\mathbf{0,03}^{1-3}$ $0,34^{2-4}$; $\mathbf{0,03}^{3-4}$
	10^6/мл	2,2 (1,4-2,2)	3,6 (3,3-4,3)	0,2 (0,2-0,5)	0,8 (0,5-2,4)	$\mathbf{0,03}^{1-2}$; $\mathbf{0,03}^{1-3}$ $\mathbf{0,03}^{2-4}$; $\mathbf{0,04}^{3-4}$
CD11b+	% от моноцитов	2,4 (2,0-3,5)	1,9 (1,8-2,4)	25,0 (9,4-28,2)	18,5 (6,4-22,9)	$0,49^{1-2}$;$\mathbf{0,03}^{1-3}$ $\mathbf{0,03}^{2-4}$; $0,20^{3-4}$
	10^6/мл	0,26 (0,25-0,37)	0,33 (0,30-0,39)	2,05 (0,72-4,55)	2,02 (0,63-2,51)	$0,20^{1-2}$; $\mathbf{0,03}^{1-3}$ $0,34^{2-4}$; $0,89^{3-4}$

Приложение 6. Морфологические, иммуногистохимические и молекулярно-биологические особенности прогрессии глиобластомы 101.8 у ВУ и НУ самцов крыс Вистар

Таблица 3.6.3

Объем опухолей на 11-е и 15-е сут после трансплантации глиобластомы у ВУ и НУ крыс Вистар, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Группы наблюдения / Параметр	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)**	
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**$^{3-4}$

Таблица 3.6.5

Относительное количество (%) Ki-67+ клеток в опухолях на 11-е и 15-е сут после трансплантации глиобластомы у ВУ и НУ крыс Вистар, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Группы наблюдения / Параметр	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)**	
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**$^{3-4}$

Таблица 3.6.6

Содержание TNF-α и IL-1β в сыворотке крови на 11-е и 15-е сут после трансплантации глиобластомы у ВУ и НУ крыс Вистар, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Группы наблюдения / 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)**	
TNF-α, 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-1β, 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**$^{3-4}$

Таблица 3.6.7

Содержание HIF-1α в сыворотке крови на 11-е и 15-е сут после трансплантации глиобластомы у ВУ и НУ крыс Вистар, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Группы наблюдения / **Параметр**	**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)**	
HIF-1α, 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)	$0,69^{1-2}$ $\mathbf{0,008}^{1-3}$ $0,42^{2-4}$ $0,15^{3-4}$

Приложение 7. Морфологические и молекулярно-биологические особенности прогрессии карциномы легких у ВУ и НУ самцов мышей C57Bl/6

Таблица 3.7.4

Показатели массы тела в разные сроки после введения клеток карциномы легких у ВУ и НУ мышей, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

Группы наблюдения	**Масса тела в разные сроки после введения клеток карциномы легких, г**									**p<0,05**
	До эксперимента (0-е сут)	**3-е сут**	**7-е сут**	**9-е сут**	**14-е сут**	**17-е сут**	**21-е сут**	**24-е сут**	**28-е сут**	
ВУ (n=26)	23,6 (22,9-24,5)	23,2 (22,5-24,5)	23,9 (23,4-24,8)	23,6 (22,9-24,6)	24,4 (23,0-25,4)	25,0 (23,9-25,6)	24,9 (24,0-26,2)	25,0 (23,5-26,9)	25,5 (24,1-26,8)	**0,008**$^{0-28}$ **0,001**$^{3-28}$ **0,01**$^{9-28}$ **0,01**$^{3-17}$ **0,009**$^{3-24}$
НУ (n=24)	24,2 (23,0-25,6)	24,1 (23,0-24,9)	24,3 (23,6-25,7)	24,0 (22,6-25,3)	24,4 (23,5-25,6)	24,8 (23,5-25,9)	24,8 (23,7-26,2)	26,3 (25,0-27,1)	26,7 (25,4-27,4)	**0,04**$^{0-28}$ **0,02**$^{3-28}$ **0,016**$^{9-28}$
p (ВУ-НУ)	0,13	0,22	0,26	0,69	0,44	0,92	0,86	0,21	0,29	

Таблица 3.7.5

Масса и объем подкожных опухолей у ВУ и НУ мышей на 21-е и 28-е сут после введения клеток карциномы легких, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Группы наблюдения / **Параметры**	**21-е сут эксперимента**		**28-е сут эксперимента**		**p**
	ВУ[1] (n=12)	**НУ[2] (n=12)**	**ВУ[3] (n=10)**	**НУ[4] (n=10)**	
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]

Таблица 3.7.6

Митотический индекс первичных подкожных опухолей у ВУ и НУ мышей на 21-е и 28-е сут после введения клеток карциномы легких, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Группы наблюдения / **Параметр**	**21-е сут эксперимента**		**28-е сут эксперимента**		**p**
	ВУ[1] (n=12)	**НУ[2] (n=12)**	**ВУ[3] (n=10)**	**НУ[4] (n=10)**	
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]

Таблица 3.7.9

Относительное количество тимических телец у ВУ и НУ мышей контрольных групп и на 21-е и 28-е сут после введения клеток карциномы легких, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

Параметры / Группы наблюдения		Контрольные		Опытные				p
				21-е сут эксперимента		28-е сут эксперимента		
		ВУ[1] (n=5)	НУ[2] (n=8)	ВУ[3] (n=12)	НУ[4] (n=12)	ВУ[5] (n=10)	НУ[6] (n=10)	
% от общего количества тимических телец	из 3-5 эпителиальных клеток	31,3 (25,0-38,1)	30,8 (15,7-48,8)	50,0 (33,3-66,7)	46,2 (33,3-59,4)	36,4 (30,8-50,0)	47,5 (31,6-58,9)	$0,99^{1-2}$; $0,64^{3-4}$ $0,35^{5-6}$; $0,11^{1-3}$ $0,99^{1-5}$; $0,59^{2-4}$ $0,54^{2-6}$; $0,52^{3-5}$ $0,99^{4-6}$
	из 5 и более эпителиальных клеток	31,3 (23,8-37,5)	34,2 (7,5-59,6)	22,2 (18,8-25,0)	20,0 (14,3-27,6)	30,8 (23,1-41,7)	22,8 (18,2-36,5)	$0,89^{1-2}$; $0,98^{3-4}$ $0,35^{5-6}$; $0,08^{1-3}$ $0,99^{1-5}$; $0,49^{2-4}$ $0,99^{2-6}$; $0,10^{3-5}$ $0,99^{4-6}$
	с кератогиалином	17,7 (10,6-23,4)	2,5 (0,0-12,8)	22,2 (11,1-42,9)	20,7 (16,7-38,1)	14,3 (0,0-18,8)	11,8 (5,1-22,1)	$0,07^{1-2}$; $0,99^{3-4}$ $0,96^{5-6}$; $0,99^{1-3}$ $0,99^{1-5}$; $\mathbf{0,03}^{2-4}$ $0,61^{2-6}$; $0,32^{3-5}$ $0,28^{4-6}$
	в виде кистоподобных полостей	18,8 (0,0-25,0)	18,3 (4,2-28,1)	0,0 (0,0-2,5)	6,3 (3,1-14,3)	17,9 (0,0-23,1)	6,3 (0,0-23,2)	$0,90^{1-2}$; $\mathbf{0,03}^{3-4}$ $0,61^{5-6}$; $0,12^{1-3}$ $0,99^{1-5}$; $0,99^{2-4}$ $0,99^{2-6}$; $0,13^{3-5}$ $0,99^{4-6}$

Таблица 3.7.10

Показатели клинического анализа крови у ВУ и НУ мышей контрольных групп и на 21-е и 28-е сут после подкожного введения клеток карциномы легких, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

Группы наблюдения / **Параметры**	**Контрольные**		**Опытные**				**p**
			21-е сут эксперимента		**28-е сут эксперимента**		
	ВУ[1] (n=5)	**НУ[2] (n=8)**	**ВУ[3] (n=12)**	**НУ[4] (n=12)**	**ВУ[5] (n=10)**	**НУ[6] (n=10)**	
Лейкоциты, 10^9/л	9,0 (6,6-12,1)	13,5 (8,4-17,0)	12,2 (10,5-19,3)	23,8 (10,7-28,2)	21,9 (12,4-71,1)	31,9 (21,6-53,7)	$0{,}28^{1\text{-}2}$; $0{,}49^{3\text{-}4}$; $0{,}59^{5\text{-}6}$ $0{,}58^{1\text{-}3}$; $\mathbf{0{,}03}^{1\text{-}5}$; $0{,}99^{3\text{-}5}$ $0{,}53^{2\text{-}4}$; $\mathbf{0{,}03}^{2\text{-}6}$; $0{,}99^{4\text{-}6}$
Лимфоциты, 10^9/л	6,2 (4,3-8,8)	9,8 (6,3-13,0)	6,4 (5,4-11,1)	10,3 (5,3-13,3)	10,1 (6,5-18,9)	13,6 (8,3-16,5)	$0{,}17^{1\text{-}2}$; $0{,}69^{3\text{-}4}$; $0{,}70^{5\text{-}6}$ $0{,}99^{1\text{-}3}$; $0{,}26^{1\text{-}5}$; $0{,}99^{3\text{-}5}$ $0{,}99^{2\text{-}4}$; $0{,}49^{2\text{-}6}$; $0{,}73^{4\text{-}6}$
Лимфоциты, %	68,7 (66,6-71,7)	75,6 (71,7-79,7)	53,0 (49,5-58,0)	49,4 (41,6-49,7)	46,4 (29,1-56,6)	41,7 (29,7-48,3)	$\mathbf{0{,}008}^{1\text{-}2}$; $0{,}20^{3\text{-}4}$; $0{,}48^{5\text{-}6}$ $0{,}06^{1\text{-}3}$; $\mathbf{0{,}003}^{1\text{-}5}$; $0{,}99^{3\text{-}5}$ $0{,}17^{2\text{-}4}$; $\mathbf{0{,}002}^{2\text{-}6}$; $0{,}75^{4\text{-}6}$
Моноциты, 10^9/л	0,3 (0,2-0,3)	0,4 (0,3-0,5)	0,5 (0,4-0,6)	0,9 (0,3-1,1)	0,8 (0,4-3,3)	1,6 (0,6-2,4)	$0{,}14^{1\text{-}2}$; $0{,}29^{3\text{-}4}$; $0{,}73^{5\text{-}6}$ $0{,}07^{1\text{-}3}$; $\mathbf{0{,}02}^{1\text{-}5}$; $0{,}99^{3\text{-}5}$ $0{,}65^{2\text{-}4}$; $\mathbf{0{,}02}^{2\text{-}6}$; $0{,}78^{4\text{-}6}$
Моноциты, %	3,5 (3,0-3,8)	3,1 (2,7-3,2)	3,6 (3,2-3,8)	3,7 (3,2-3,9)	3,6 (3,2-4,4)	3,9 (3,1-5,3)	$0{,}11^{1\text{-}2}$; $0{,}77^{3\text{-}4}$; $0{,}94^{5\text{-}6}$ $0{,}99^{1\text{-}3}$; $0{,}99^{1\text{-}5}$; $0{,}99^{3\text{-}5}$ $0{,}37^{2\text{-}4}$; $0{,}19^{2\text{-}6}$; $0{,}99^{4\text{-}6}$

Таблица 3.7.10 (продолжение)

Показатели клинического анализа крови у ВУ и НУ мышей контрольных групп и на 21-е и 28-е сут после подкожного введения клеток карциномы легких, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

Группы наблюдения / **Параметры**	**Контрольные**		**Опытные**				**p**
			21-е сут эксперимента		**28-е сут эксперимента**		
	ВУ[1] (n=5)	**НУ[2] (n=8)**	**ВУ[3] (n=12)**	**НУ[4] (n=12)**	**ВУ[5] (n=10)**	**НУ[6] (n=10)**	
Гранулоциты, 10^9/л	2,5 (1,9-3,1)	3,1 (1,8-3,4)	5,4 (4,7-7,7)	11,2 (5,1-15,4)	11,2 (5,2-47,0)	16,1 (10,7-36,3)	$0,47^{1-2}$; $0,29^{3-4}$; $0,48^{5-6}$ $0,11^{1-3}$; $\mathbf{0,009}^{1-5}$; $0,99^{3-5}$ $0,14^{2-4}$; $\mathbf{0,004}^{2-6}$; $0,99^{4-6}$
Гранулоциты, %	28,1 (24,6-29,6)	21,2 (17,6-25,3)	43,3 (38,9-46,9)	47,3 (46,7-54,6)	50,1 (40,2-65,8)	55,3 (46,2-65,7)	$0,08^{1-2}$; $0,11^{3-4}$; $0,70^{5-6}$ $0,06^{1-3}$; $\mathbf{0,003}^{1-5}$; $0,99^{3-5}$ $0,06^{2-4}$; $\mathbf{0,006}^{2-6}$; $0,99^{4-6}$
Эритроциты, 10^{12}/л	9,2 (8,8-10,0)	9,7 (9,4-9,9)	6,5 (4,7-7,4)	6,8 (5,5-7,6)	5,2 (4,7-7,5)	4,5 (3,8-5,1)	$0,18^{1-2}$; $0,49^{3-4}$; $0,09^{5-6}$ $\mathbf{0,02}^{1-3}$; $\mathbf{0,004}^{1-5}$; $0,99^{3-5}$ $\mathbf{0,03}^{2-4}$; $\mathbf{0,001}^{2-6}$; $0,41^{4-6}$
Гемоглобин, г/л	130,0 (126,3-139,0)	142,0 (132,0-144,0)	89,5 (67,5-101,0)	95,5 (77,3-103,3)	78,0 (68,3-106,3)	66,5 (57,5-74,8)	$0,07^{1-2}$; $0,49^{3-4}$; $0,09^{5-6}$ $\mathbf{0,02}^{1-3}$; $\mathbf{0,005}^{1-5}$; $0,99^{3-5}$ $\mathbf{0,03}^{2-4}$; $\mathbf{0,001}^{2-6}$; $0,52^{4-6}$

Таблица 3.7.11

Лимфоцитарно-моноцитарный (LMR), нейтрофильно-лимфоцитарный (NLR) индексы и индекс системного воспалительного ответа (SIRI) у ВУ и НУ мышей контрольных групп и на 21-е и 28-е сут после подкожного введения клеток карциномы легких, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

Группы наблюдения / **Параметры**	**Контрольные**		**Опытные**				**p**
			21-е сут эксперимента		**28-е сут эксперимента**		
	ВУ[1] (n=5)	**НУ[2] (n=8)**	**ВУ[3] (n=12)**	**НУ[4] (n=12)**	**ВУ[5] (n=10)**	**НУ[6] (n=10)**	
LMR, усл.ед.	26,3 (24,4-29,8)	34,0 (24,0-44,0)	18,6 (12,7-24,8)	13,9 (10,9-18,1)	13,4 (5,8-18,9)	9,6 (6,4-13,8)	$0,80^{1-2}$; $0,35^{3-4}$; $0,82^{5-6}$ $0,40^{1-3}$; $\mathbf{0,03}^{1-5}$; $0,84^{3-5}$ $\mathbf{0,04}^{2-4}$; $\mathbf{0,007}^{2-6}$; $0,52^{4-6}$
NLR, усл.ед.	0,36 (0,35-0,43)	0,28 (0,16-0,40)	0,69 (0,23-0,93)	0,95 (0,94-1,34)	1,10 (0,72-2,32)	1,37 (0,95-2,38)	$0,66^{1-2}$; $\mathbf{0,04}^{3-4}$; $0,48^{5-6}$ $0,99^{1-3}$; $\mathbf{0,04}^{1-5}$; $0,21^{3-5}$ $\mathbf{0,03}^{2-4}$; $\mathbf{0,01}^{2-6}$; $0,84^{4-6}$
SIRI, усл. ед.	0,11 (0,11-0,13)	0,07 (0,02-0,12)	0,33 (0,08-0,41)	0,80 (0,31-1,44)	0,90 (0,30-8,11)	1,5 (0,99-5,77)	$0,80^{1-2}$; $0,11^{3-4}$; $0,39^{5-6}$ $0,55^{1-3}$; $0,17^{1-5}$; $0,21^{3-5}$ $0,13^{2-4}$; $\mathbf{0,04}^{2-6}$; $0,84^{4-6}$

Таблица 3.7.13

Уровни экспрессии генов *Hif1a, Nfkb, Tnfa, Il1b* и *Tgfb* у ВУ и НУ мышей контрольных групп и на 21-е и 28-е сут после подкожного введения клеток карциномы легких, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

Группы наблюдения / **Параметры**	**Контрольные**		**Опытные**				**p**
			21-е сут		**28-е сут**		
	ВУ[1] (n=5)	**НУ[2] (n=8)**	**ВУ[3] (n=12)**	**НУ[4] (n=12)**	**ВУ[5] (n=10)**	**НУ[6] (n=10)**	
Уровень экспрессии гена *Hif1a*, усл.ед.	0,01 (0,0-0,03)	0,09 (0,03-0,30)	0,03 (0,005-0,42)	0,63 (0,13-0,89)	0,02 (0,0-0,07)	0,36 (0,12-2,7)	**0,04**$^{1-2}$; 0,37$^{3-4}$; **0,02**$^{5-6}$ 0,99$^{1-3}$; 0,99$^{1-5}$; 0,99$^{3-5}$ 0,55$^{2-4}$; 0,22$^{2-6}$; 0,99$^{4-6}$
Уровень экспрессии гена *Nfkb*, усл.ед.	0,005 (0,001-0,014)	0,007 (0,003-0,02)	0,002 (0,0-0,004)	0,0 (0,0-0,0)	0,003 (0,0-0,008)	0,11 (0,008-0,55)	0,89$^{1-2}$; 0,14$^{3-4}$; **0,008**$^{5-6}$ 0,89$^{1-3}$; 0,99$^{1-5}$; 0,99$^{3-5}$ 0,26$^{2-4}$; 0,64$^{2-6}$; **0,005**$^{4-6}$
Уровень экспрессии гена *Tnfa*, усл.ед.	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,3)	0,0 (0,0-0,02)	1,5 (1,3-3,0)	0,01 (0,0-1,5)	0,7 (0,6-4,0)	0,99$^{1-2}$; **0,02**$^{3-4}$; 0,14$^{5-6}$ 0,99$^{1-3}$; 0,19$^{1-5}$; 0,85$^{3-5}$ **0,03**$^{2-4}$; **0,04**$^{2-6}$; 0,99$^{4-6}$
Уровень экспрессии гена *Il1b*, усл.ед.	0,26 (0,03-1,19)	0,31 (0,13-4,32)	0,08 (0-0,65)	0,39 (0,09-0,72)	0,13 (0,0003- 0,72)	0,35 (0,13-0,64)	0,61$^{1-2}$; 0,43$^{3-4}$; 0,49$^{5-6}$ 0,99$^{1-3}$; 0,99$^{1-5}$; 0,99$^{3-5}$ 0,99$^{2-4}$; 0,99$^{2-6}$; 0,99$^{4-6}$
Уровень экспрессии гена *Tgfb*, усл.ед.	0,94 (0,07-11,9)	1,9 (0,3-34,2)	0,8 (0,0-7,3)	0,0 (0,0-0,23)	0,01 (0,0-0,11)	0,54 (0,12-2,9)	0,45$^{1-2}$; 0,43$^{3-4}$; **0,02**$^{5-6}$ 0,99$^{1-3}$; 0,35$^{1-5}$; 0,99$^{3-5}$ **0,04**$^{2-4}$; 0,99$^{2-6}$; 0,30$^{4-6}$

Приложение 8. Молекулярно-биологические особенности макрофагов и уровень продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов у ВУ и НУ самцов крыс Вистар

Таблица 2.7

Последовательности использованных для ПЦР праймеров («Евроген», Россия)

Праймер	**Направление последовательности**	**Последовательность (5’ к 3’)**	**NCBI Ref Seq**	**Определяемый ген**
Gapdh	Прямая	GCGAGATCCCGCTAACATCA	NM_017008.4	*Rattus norvegicus* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*), мРНК
	Обратная	CCCTTCCACGATGCCAAAGT		
Hif1a	Прямая	GAGCCTTAACCTATCTGTCA	NM_024359.2	*Rattus norvegicus* hypoxia inducible factor 1 subunit alpha (*Hif1a*), мРНК
	Обратная	CACAATCGTAACTGGTCAGC		
Epas1	Прямая	GACCAGACTGAATCCTTGTTCA	NM_023090.2	*Rattus norvegicus* endothelial PAS domain protein 1 (*Epas1*), мРНК
	Обратная	GGCACTGTGGCTCCTCAG		
Vegf	Прямая	GGATCAAACCTCACCAAAGC	NM_001317043.1	*Rattus norvegicus* vascular endothelial growth factor A (*Vegfa*), transcript variant 2, мРНК
	Обратная	GGTTAATCGGTCTTTCCGGT		
Nos2	Прямая	CACCTTGGAGTTCACCCAGT	NM_001429940.1	*Rattus norvegicus* nitric oxide synthase 2 (*Nos2*), transcript variant 2, мРНК
	Обратная	CCATTGAAGGGGCAGGCT		
Il1b	Прямая	CTGTCTGACCCATGTGAGCT	NM_031512.2	*Rattus norvegicus* interleukin 1 beta (*Il1b*), мРНК
	Обратная	ACTCCACTTTGGTCTTGACTT		
Il6	Прямая	TACATATGTTCTCAGGGAGAT	NM_012589.2	*Rattus norvegicus* interleukin 6 *(Il6),* мРНК
	Обратная	GGTAGAAACGGAACTCCAG		
Il10	Прямая	GCCCAGAAATCAAGGAGCAT	NM_012854.2	*Rattus norvegicus* interleukin 10 (*Il10*), мРНК
	Обратная	TGAGTGTCACGTAGGCTTCTA		
Tnfa	Прямая	GTTCCGTCCCTCTCATACACTG	NM_012675.3	*Rattus norvegicus* tumor necrosis factor *(Tnf)*, мРНК
	Обратная	GAAGTTCAGTAGACAGAAGAGCGT		
Tgfb	Прямая	CGTGGCTTCTAGTGCTGACG	NM_021578.2	*Rattus norvegicus* transforming growth factor, beta 1 *(Tgfb1)*, мРНК
	Обратная	TGGCGAGCCTTAGTTTGGAC		
Mmp9	Прямая	ATGGTTTCTGCCCCAGTGAG	NM_031055.2	*Rattus norvegicus* matrix metallopeptidase 9 *(Mmp9)*, мРНК
	Обратная	CACCAGCGATAACCATCCGA		

Таблица 3.8.1

Содержание CD11b+, CD68+, CD86+ и CD163+ неактивированных и активированных ЛПС макрофагов у ВУ и НУ крыс Вистар, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Группы наблюдения / **Параметры**	**Неактивированные макрофаги**		**Активированные макрофаги**		**p**
	ВУ[1] (n=6)	**НУ[2] (n=6)**	**ВУ[3] (n=6)**	**НУ[4] (n=7)**	
% CD11b+ клеток	71,3 (63,7-72,4)	30,1 (24,9-39,0)	68,1 (59,9-77,3)	57,4 (38,4-76,9)	**0,008**[1-2]; 0,99[1-3] **0,02**[2-4]; 0,43[3-4]
% CD68+ клеток	13,7 (8,5-32,6)	12,3 (6,7-17,6)	4,7 (2,9-7,8)	16,7 (1,5-30,9)	0,99[1-2]; **0,03**[1-3] 0,93[2-4]; 0,46[3-4]
% CD86+ клеток	14,1 (9,1-26,4)	24,3 (9,1-36,1)	32,6 (23,0-38,1)	24,7 (15,9-33,0)	0,43[1-2]; 0,06[1-3] 0,99[2-4]; 0,31[3-4]
% CD163+ клеток	5,9 (4,5-7,4)	4,5 (3,1-8,9)	3,0 (2,4-3,6)	3,1 (2,5-4,5)	0,57[1-2]; **0,02**[1-3] 0,25[2-4]; 0,54[3-4]

Оригинальные мембраны Вестерн-блоттинга – определение содержания iNOS, CCR7, HGF и VEGF относительно GAPDH

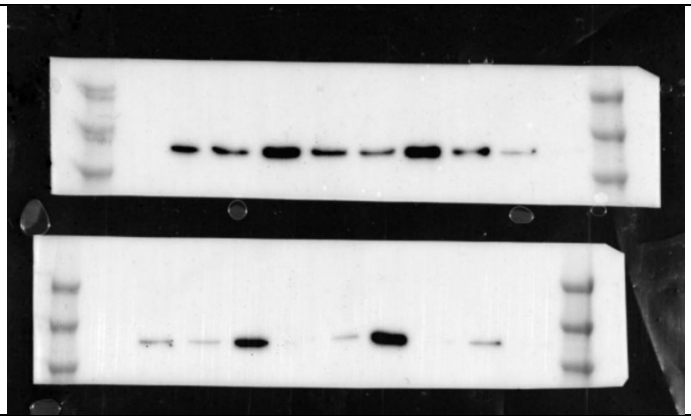
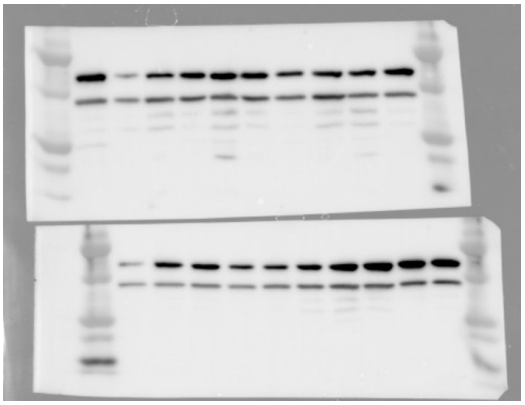
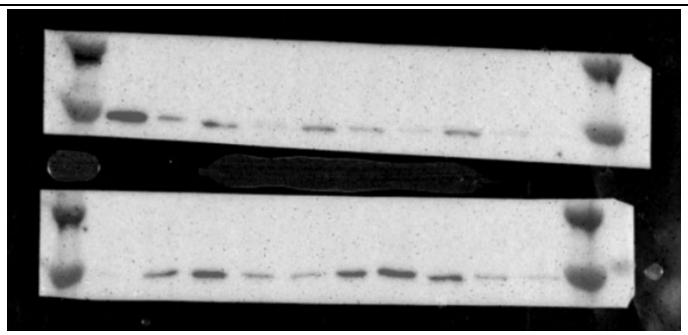
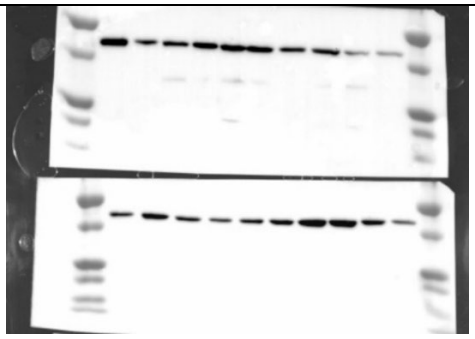
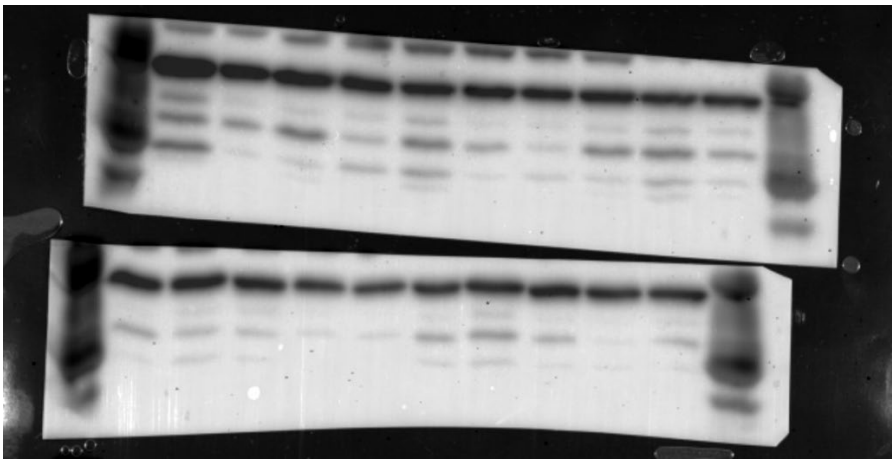
iNOS	CCR7
	
HGF	**VEGF**
	
GAPDH	
	

Таблица 3.8.5

Уровень экспрессии гена *Nos2* и относительное содержание белка iNOS в неактивированных и активированных ЛПС макрофагах у ВУ и НУ крыс Вистар, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Группы наблюдения / **Параметры**	**Неактивированные макрофаги**		**Активированные макрофаги**		**p**
	ВУ[1] (n=6)	**НУ[2] (n=6)**	**ВУ[3] (n=6)**	**НУ[4] (n=7)**	
Уровень экспрессии гена *Nos2,* усл. ед.	0,26 (0,19-0,62)	0,36 (0,10-1,27)	1,85 (1,11-5,93)	2,34 (1,60-3,87)	$0,81^{1-2}$; $\mathbf{0,03}^{1-3}$ $\mathbf{0,03}^{2-4}$; $0,66^{3-4}$
Белок iNOS, усл. ед.	12,3 (3,6-26,6)	9,2 (2,1-37,6)	2,0 (0,2-26,5)	2,9 (0,2-39,5)	$0,99^{1-2}$; $0,55^{1-3}$ $0,42^{2-4}$; $0,84^{3-4}$

Таблица 3.8.6

Относительное содержание белков CCR7 и HGF в неактивированных и активированных ЛПС макрофагах у ВУ и НУ крыс Вистар, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Группы наблюдения / **Параметры**	**Неактивированные макрофаги**		**Активированные макрофаги**		**p<0,05**
	ВУ[1] (n=6)	**НУ[2] (n=6)**	**ВУ[3] (n=6)**	**НУ[4] (n=7)**	
Белок CCR7, усл. ед.	138,5 (65,4-187,8)	97,0 (55,1-116,2)	69,8 (43,0-86,4)	350,4 (199,0-433,5)	$\mathbf{0,008}^{2-4}$ $\mathbf{0,008}^{3-4}$
Белок HGF, усл. ед.	0,9 (0,3-1,6)	0,2 (0,1-0,8)	1,2 (0,6-2,2)	1,7 (0,5-3,2)	$\mathbf{0,04}^{2-4}$

Таблица 3.8.8

Содержание HIF-1α в культуральной жидкости неактивированных и активированных ЛПС макрофагов у ВУ и НУ крыс Вистар, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Группы наблюдения / **Параметр**	**Неактивированные макрофаги**		**Активированные макрофаги**		**p**
	ВУ[1] (n=6)	**НУ[2] (n=6)**	**ВУ[3] (n=6)**	**НУ[4] (n=7)**	
Белок HIF-1α, пг/мл	625,0 (281,5-862,5)	500,0 (73,9-715,0)	876,0 (712,0-1102,0)	1057,0 (745,5-1116,0)	$0,55^{1-2}$ $0,10^{1-3}$ $\mathbf{0,02}^{2-4}$ $0,84^{3-4}$

Таблица 3.8.9

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

Группы наблюдения / **Параметры**	**Неактивированные макрофаги**		**Активированные макрофаги**		**p<0,05**
	ВУ[1] (n=6)	**НУ[2] (n=6)**	**ВУ[3] (n=6)**	**НУ[4] (n=7)**	
Уровень экспрессии гена *Vegf,* 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]

Таблица 3.8.10

Фагоцитарная активность моноцитов в условиях нормоксии, после *in vivo* и *ex vivo* гипоксического воздействия у ВУ (n=12) и НУ (n=20) крыс Вистар, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Фагоцитарная активность моноцитов, %	**Группы наблюдения**		**p**
	ВУ (n=12)	**НУ (n=20)**	
Нормоксия	4,3 (4,1-5,4)	4,5 (2,9-8,6)	0,71
In vivo гипоксическое воздействие (5000 м)	7,0 (5,4-13,2)	2,7 (1,6-3,6)	**0,02**
Ex vivo гипоксическое воздействие (1% O_2)	17,7 (9,2-19,4)*	3,5 (1,6-9,5)	**0,01**

* – статистически значимые различия (p=0,006) по сравнению с нормоксией, критерии Краскела-Уоллиса и Данна

Таблица 3.8.12

Продукция провоспалительного цитокина IL-1β и противовоспалительного цитокина IL-10 клетками периферической крови в условиях нормоксии и гипоксии в течение 1 ч *ex vivo* у ВУ и НУ крыс Вистар за две недели до и через один месяц после определения устойчивости к гипоксии в барокамере, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

Группы наблюдения / **Параметры**	**До сублетальной гипоксической нагрузки**				**После сублетальной гипоксической нагрузки**				**p**
	Нормоксия		***Ex vivo* гипоксия, 1% O_2**		**Нормоксия**		***Ex vivo* гипоксия, 1% O_2**		
	ВУ[1] (n=10)	**НУ[2] (n=12)**	**ВУ[3] (n=10)**	**НУ[4] (n=12)**	**ВУ[5] (n=10)**	**НУ[6] (n=12)**	**ВУ[7] (n=10)**	**НУ[8] (n=12)**	
IL-1β, пг/мл	10,9 (4,0-20,7)	5,8 (4,3-9,8)	23,9 (21,4-33,0)	21,0 (14,5-29,7)	23,0 (22,1-26,3)	23,0 (22,5-24,4)	34,9 (29,5-37,3)	29,9 (28,5-36,2)	$0,40^{1-2}$; $0,20^{3-4}$ $0,95^{5-6}$; $0,23^{7-8}$ **$0,01^{1-3}$**; **$0,003^{2-4}$** **$0,003^{5-7}$**; **$0,0008^{6-8}$** **$0,03^{1-5}$**; **$0,01^{3-7}$** **$0,002^{2-6}$**; **$0,009^{4-8}$**
IL-10, пг/мл	8,2 (3,3-15,6)	11,5 (9,1-17,3)	23,0 (20,6-61,7)	47,7 (33,7-69,1)	23,8 (22,9-24,0)	24,4 (23,5-27,0)	31,9 (27,6-37,9)	33,6 (30,4-37,3)	$0,21^{1-2}$; $0,10^{3-4}$ $0,06^{5-6}$; $0,84^{7-8}$ **$0,0002^{1-3}$**; **$0,0001^{2-4}$** **$0,0001^{5-7}$**; **$0,0001^{6-8}$** **$0,0001^{1-5}$**; $0,71^{3-7}$ **$0,0001^{2-6}$**; **$0,02^{4-8}$**

Таблица 3.8.13

Нестимулированная (НСТ) и стимулированная (СТ) комплексным митогеном (ЛПС, ФГА и КонА) в течение 24 ч *ex vivo* продукция провоспалительного цитокина IL-1β и противовоспалительного цитокина IL-10 клетками периферической крови у ВУ и НУ крыс Вистар за две недели до и через один месяц после определения устойчивости к гипоксии в барокамере, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерии Краскела-Уоллиса, Данна и Манна-Уитни

Группы наблюдения / **Параметры**	**До сублетальной гипоксической нагрузки**				**После сублетальной гипоксической нагрузки**				**p**
	НСТ		**СТ**		**НСТ**		**СТ**		
	ВУ[1] (n=10)	**НУ[2] (n=12)**	**ВУ[3] (n=10)**	**НУ[4] (n=12)**	**ВУ[5] (n=10)**	**НУ[6] (n=12)**	**ВУ[7] (n=10)**	**НУ[8] (n=12)**	
IL-1β, пг/мл	8,7 (4,0-23,6)	7,2 (3,6-8,7)	22,5 (14,1-27,9)	20,3 (6,9-25,0)	28,6 (25,9-36,0)	25,4 (22,7-27,7)	31,8 (26,7-34,3)	30,5 (26,0-32,8)	$0,36^{1-2}$; $0,25^{3-4}$ $0,10^{5-6}$; $0,47^{7-8}$ $0,10^{1-3}$; $\mathbf{0,03}^{2-4}$ $0,73^{5-7}$; $\mathbf{0,02}^{6-8}$ $\mathbf{0,04}^{1-5}$; $\mathbf{0,02}^{3-7}$ $\mathbf{0,004}^{2-6}$; $\mathbf{0,008}^{4-8}$
IL-10, пг/мл	19,7 (18,1-21,0)	24,7 (21,4-35,0)	36,2 (28,8-51,8)	52,6 (35,4-57,2)	28,0 (27,2-32,9)	29,8 (27,2-32,1)	38,4 (31,7-41,4)	36,3 (33,1-41,0)	$\mathbf{0,04}^{1-2}$; $0,07^{3-4}$ $0,74^{5-6}$; $0,90^{7-8}$ $\mathbf{0,0002}^{1-3}$; $\mathbf{0,0002}^{2-4}$ $\mathbf{0,03}^{5-7}$; $\mathbf{0,0008}^{6-8}$ $\mathbf{0,0001}^{1-5}$; $0,73^{3-7}$ $0,13^{2-6}$; $\mathbf{0,02}^{4-8}$

Приложение 9. Разработка способов *ex vivo* оценки устойчивости к недостатку кислорода самцов крыс Вистар без сублетального гипоксического воздействия в барокамере

Таблица 3.9.3

Спонтанная продукция цитокинов IL-6, IL-10 и TNF-α клетками периферической крови при инкубации в течение 24 ч *ex vivo* у ВУ и НУ крыс Вистар до определения устойчивости к гипоксии в барокамере, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Цитокины, пг/мл	**Устойчивость к гипоксии**		**p**
	Высокая, «время жизни» на «высоте» от 240 с (n=7)	**Низкая, «время жизни» на «высоте» от 20 до 60 с (n=11)**	
IL-6	7,6 (7,3-8,8)	15,8 (12,7-21,2)	**0,01**
IL-10	12,5 (3,1-31,2)	62,4 (37,4-74,9)	**0,003**
TNF-α	3,1 (2,5-7,0)	17,1 (14,4-21,1)	**0,0001**

Таблица 3.9.4

Нестимулированная (НСТ) и стимулированная (СТ) комплексным митогеном (ЛПС, ФГА и КонА) в течение 24 ч *ex vivo* продукция провоспалительного цитокина IL-1β клетками периферической крови у ВУ и НУ крыс Вистар до определения устойчивости к гипоксии в барокамере, Me (25%-75%), p – статистическая значимость различий, критерий Манна-Уитни

Группы наблюдения / **Параметр**	**ВУ (n=7)**		**НУ (n=11)**		**p**
	НСТ[1]	**СТ[2]**	**НСТ[3]**	**СТ[4]**	
IL-1β, пг/мл	47,0 (23,5-89,5)	76,5 (47,0-97,1)	31,3 (14,3-45,7)	86,9 (63,5-133,6)	$0{,}29^{1\text{-}2}$ **$0{,}003^{3\text{-}4}$** $0{,}29^{1\text{-}3}$ $0{,}64^{2\text{-}4}$