

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

А.С. Гончарова, С.В. Гурова, Д.В. Ходакова,
Т.М. Кечерюкова, А.Ю. Максимов, Т.О. Лаптева,
М.В. Романова, Е.В. Аллилуева

DOI 10.25789/YMJ.2023.82.01

УДК 57.084.1

МОДЕЛИРОВАНИЕ ГИПОКСИИ ПЕЧЕНИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VIVO*

Проведено исследование влияния редукции кровотока портальной триады на уровень ферментов печени, ее состояние и выживаемость лабораторных мышей. Уровни аланинаминотрансферазы и аспаратаминотрансферазы в обеих группах с редукцией кровотока были статистически значимо выше, чем в контрольной, а также статистически значимо выше в группе с забором крови через 24 ч после реперфузии по сравнению с группой с забором крови через 2 ч после реперфузии. Гистологическое исследование показало признаки ишемического повреждения тканей, также наблюдалось увеличение количества сосудов в препаратах печени животных с редукцией кровотока по сравнению с контролем. Уровень выживаемости животных после выполнения процедуры составил более 80%, что является удовлетворительным, но, тем не менее, указывает на необходимость такого количества животных, которое позволит выполнить статистическую обработку результатов даже в случае гибели некоторых особей. Результаты исследования показали, что полученная модель является важным инструментом для исследований в области изучения патологических состояний печени, связанных с ишемическими и гипоксическими условиями.

Ключевые слова: гипоксия, оксигенация, печень, заболевания печени, модели *in vivo*.

Введение. Известно, что недостаточное снабжение тканей кислородом и возникающая вследствие этого гипоксия вносят значительный вклад в развитие многих заболеваний, а в некоторых случаях являются основной детерминантой формирования целого ряда патологических состояний [3, 7, 10]. Показано, что неадекватная оксигенация тканей приводит к окислительному стрессу, воспалительным процессам, дисфункции ключевых звеньев метаболизма липидов и белков [6, 9]. Недавние исследования продемонстрировали влияние гипоксии на формирование патологических состояний печени, таких как стеатоз, фиброз, цирроз, гепатоцеллюлярная карцинома [9]. Помимо этого, в сфере онкологических исследований показана ключевая роль влияния гипоксической

микросреды на образование метастатической ниши, эпителиально-мезенхимального перехода, резистентности к терапии, возникновения более злокачественного фенотипа опухолевых клеток [8].

Для понимания особенностей протекания различных биологических процессов и влияния на них условий среды использование системы «соответствующая микросреда – культура клеток» является первым шагом к получению фундаментальных представлений о сложном взаимодействии между микроокружением и клетками [2, 5]. Однако, несмотря на то, что двумерная клеточная культура уже более века является важным инструментом, помогающим исследователям понять механизмы, лежащие в основе поведения клеток *in vivo* работы с 2D-культурами не в состоянии воспроизвести физиологию реальных тканей. Культивирование в виде монослоя приводит к изменению тканеспецифичной архитектуры (вынужденная поляризованная адгезия, уплощенная форма), трансформации механических и биохимических сигналов, возникновению двумерного контакта с соседними клетками [4]. В связи с этим для того, чтобы подтвердить явление или механизм, наблюдаемый *in vitro*, необходимо проведение исследования *in vivo* [1, 4]. Существует ряд различных экспериментальных подходов, которые могут быть применимы для управления состоянием оксигенации в исследованиях влияния гипоксии *in vivo*, включающих применение специальных камер и воздействие на животных газовой смесью, содержащей

пониженную концентрацию O₂, температурную модификацию, воздействие фармакологическими препаратами или субстанциями, перекрытие притока крови к исследуемой зоне [5]. Для моделирования гипоксии печени в качестве одного из наиболее эффективных способов можно рассмотреть метод зажима кровеносных сосудов, а именно окклюзию портальной триады, включающую печеночную артерию, печеночную вену и желчный проток [11]. Однако упомянутый способ, несмотря на свою эффективность, является технически сложным. Кроме того, нами не были найдены литературные данные о том, какое время отсутствия полноценного кровотока в печени будет для животных не фатальным, так как если исследование не краткосрочное, то оно предполагает высокий уровень выживаемости лабораторных животных после процедуры, а также сохранение основных функций печени на время от нескольких дней до нескольких недель.

В связи с вышеизложенным целью данной работы было исследование влияния окклюзии портальной триады на состояние печени и выживаемость лабораторных мышей.

Материалы и методы. Для эксперимента использовали самок мышей линии Balb/c в возрасте 9-12 недель, средний вес которых составлял 25 г. Животные были получены из собственного разведения вивария Испытательного лабораторного центра ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России. Мышей содержали в открытых клетках конвенционального типа, корм и вода были предоставлены без ограничений.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России, Ростов-на-Дону: **ГОНЧАРОВА Анна Сергеевна** – к.б.н., зав. испытательным лабораторным центром, fateyeva_a_s@list.ru, **ГУРОВА Софья Валерьевна** – м.н.с., gurova.sophie@gmail.com, **ХОДАКОВА Дарья Владиславовна** – м.н.с., khodakovaDV@yandex.ru, **КЕЧЕРЮКОВА Тахмина Мажитовна** – врач по рентгеноваскулярным методам диагностики и лечения, tkecheryukova@mail.ru, **МАКСИМОВ Алексей Юрьевич** – д.м.н., зам. генерального директора по перспективным научным разработкам, m.d.n.maksimov@yandex.ru, **ЛАПТЕВА Татьяна Олеговна** – зав. патологоанатомическим отделением, lto-96@yandex.ru, **РОМАНОВА Мария Владимировна** – м.н.с., m.v.mindar@gmail.com, **АЛЛИЛУЕВА Екатерина Владиславовна** – м.н.с., katherine_bio@mail.ru.

Все манипуляции, проведенные в рамках исследования, были выполнены согласно этическим принципам, установленным Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETSN 123, Страсбург, 18 марта 1986 г). Протокол исследования был одобрен локальным биоэтическим комитетом ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России.

Редукцию кровотока печени выполняли при помощи методики, предложенной Zimmerman M. и соавт. (2012) [11]. Животным выполняли лапаротомию для обеспечения доступа к печени и ее кровеносным сосудам. Желудок и кишечник смещали каудально с помощью влажного ватного тампона, правую долю печени смещали ближе к диафрагме для четкого обзора портальной триады. После ее визуальной идентификации иглу с шовным материалом (полипропилен 4/0) подводили под портальной триадой, включающей печеночную артерию, печеночную вену и желчный проток. На каждом конце шовного материала фиксировали груз весом 3 г, подвешивали груз на специальном держателе, обеспечивая за счет натяжения шовного материала редукцию кровотока сосудов портальной триады. В качестве груза использовали пробирки типа Эппендорф, наполненные водой. Через 20 мин грузы снимали, операционную рану послойно ушивали непрерывным швом.

Эвтаназию выполняли при помощи декапитации с последующим забором биологического материала (кровь, ткань печени).

Все животные в эксперименте были разделены на следующие группы:

1-я группа (n=6) – контрольная, без каких-либо воздействий на животных; была выполнена эвтаназия в 1-й день эксперимента с последующим забором крови и печени;

2-я группа (n=6) – время редукции кровотока печени 20 мин; через 2 ч после завершения процедуры выполняли эвтаназию с последующим забором крови и печени;

3-я группа (n=6) – время редукции кровотока печени 20 мин; через 24 ч после завершения процедуры выполняли эвтаназию с последующим забором крови и печени;

4-я группа (n=6) – время редукции кровотока печени 20 мин; выполняли наблюдение в течение 14 дней для оценки переносимости процедуры, по завершении наблюдений выполняли эвтаназию без забора биологического материала.

Все хирургические манипуляции проводили с использованием анестезии – ветеринарных препаратов «Ксила» в дозе 20 мг/кг, «Золелил-100» в дозе 50 мг/кг.

Ферменты печени аланинаминотрансфераза (АЛТ) и аспартатаминотрансфераза (АСТ) определяли в плазме крови. АЛТ определяли с использованием автоматического биохимического анализатора VETSCANVS2, АСТ определяли с использованием автоматического биохимического анализатора VITROS 5600.

Печень фиксировали в 10%-ном формалине в течение 24 ч, после этого заключали в парафин, затем готовили гистологические микросрезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином согласно стандартной методике.

Полученные данные анализировали при помощи пакета программ STATISTICA 10.0. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего, сравнение выполняли с использованием критерия Стьюдента, статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. В ходе выполнения эксперимента по пережатиям сосудов с использованием шовно-



Рис. 1. Редукция кровотока печени мыши путем окклюзии портальной триады

го материала и подвесных грузов была достигнута редукция кровотока печени, что визуально подтверждалось изменением цвета печени (рис. 1).

Согласно литературным данным, использование системы подвесных грузов менее травматично, чем использование зажимов для сосудов, особенно при повторном наложении инструмента при выполнении многократных циклов ишемии-реперфузии для достижения вследствие этого эффектов гипоксии-реоксигенации, так как даже самые тонкие зажимы могут вызвать значительные повреждения [11]. Тем не менее, нами выявлен ряд особенностей, которые необходимо

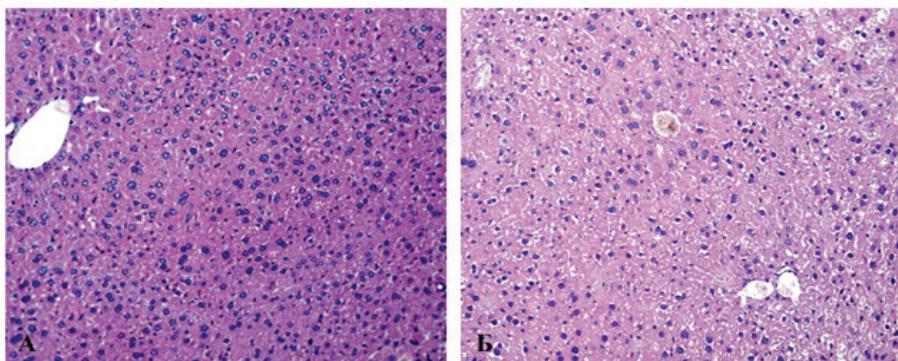


Рис. 2. Гистологические препараты печени мыши линии Balb/c: А – печень интактного животного; Б – печень животного после 20-минутной редукции кровотока. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение: $\times 200$

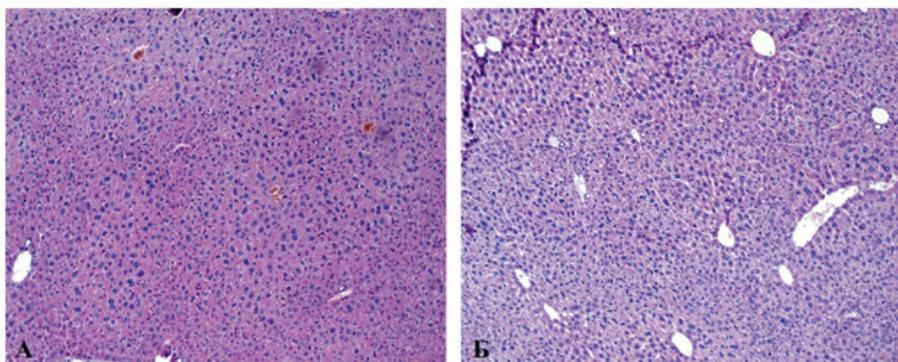


Рис. 3. Гистологические препараты печени мыши линии Balb/c: А – печень интактного животного; Б – печень животного после 20-минутной редукции кровотока через 24 ч после реперфузии. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение: $\times 100$

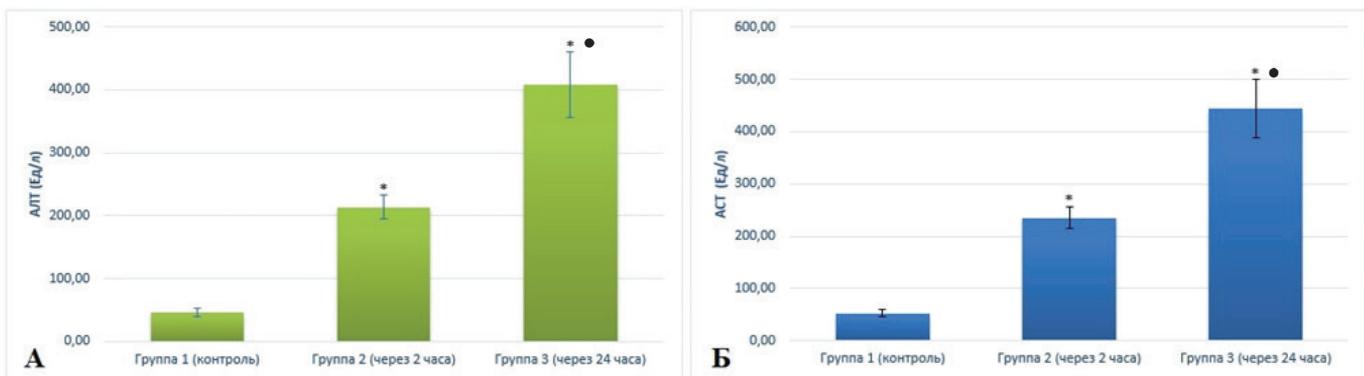


Рис. 4. Уровень ферментов печени в плазме крови мышей групп 1-3: А – уровни АЛТ; Б – уровни АСТ. * Статистически значимые различия уровней ферментов между группами 2, 3 и группой 1 ($p < 0,05$). • – статистически значимые различия уровней ферментов между группой 2 и группой 3 ($p < 0,05$)

учитывать в процессе выполнения процедуры, а именно, следует избегать слишком глубокого погружения иглы при подведении ее под портальную триаду из-за риска повреждения ниже лежащей поллой вены. Также существует риск повреждения триады режущими краями иглы, для предотвращения этого рекомендовано предварительно выдвинуть и удерживать портальную триаду при помощи пинцета, подводя иглу с шовным материалом под него.

Необходимо отметить, что ишемия и гипоксия не являются синонимичными состояниями, поскольку не всегда верно, что ткани с хорошей перфузией являются нормоксическими или что ткани с плохой перфузией являются гипоксическими [3]. В связи с этим для подтверждения возникновения гипоксии в ответ на редукцию кровотока было выполнено гистологическое исследование ткани печени.

Гистологическое исследование печени интактных животных выявило архитектуру ткани без аномалий, признаков воспаления и некроза, а также без отеков гепатоцитов (рис. 2, А). В препаратах, полученных от животных с редукцией кровотока, отмечали признаки ишемического повреждения печени: ткань характеризовалась увеличением межклеточного пространства, заметным отеком гепатоцитов, уменьшением плотности цитоплазмы, большим количеством клеток с кариолизисом, фокальными участками некроза (рис. 2, Б).

Также на гистологическом препарате, полученном от животного с индуцированной гипоксией печени, отмечено значительно большее количество кровеносных сосудов (рис. 3,Б), чем на препарате, соответствующем интактному животному (рис. 3, А), что, вероятно, можно интерпретировать как явление, направленное на компенсацию

возникшего низкого уровня оксигенации ткани.

Результаты исследования показали, что уровни ферментов печени в обеих группах с редукцией кровотока были статистически значимо выше, чем в контрольной группе ($p < 0,05$), и статистически значимо выше в 3-й группе (через 24 ч после реперфузии) по сравнению со 2-й группой (через 2 ч после реперфузии) ($p < 0,05$) (рис. 4).

Результаты исследования уровней ферментов печени показали, что уровень АЛТ у интактных мышей составил $40,8 \pm 6,3$ Ед/л, во 2-й группе – $213,3 \pm 18,7$ Ед/л, а в 3-й группе – $408,3 \pm 52,9$ Ед/л, что соответственно было в 5,2 и 10,0 раз выше, чем у животных контрольной группы. Уровень АСТ у интактных мышей составил $52,4 \pm 6,6$ Ед/л, во 2-й группе – $235,3 \pm 20,7$ Ед/л, а в 3-й группе – $443,8 \pm 56,4$ Ед/л, что соответственно было в 4,5 и 8,4 раза выше, чем в группе контроля. Повышенный уровень ферментов печени в плазме крови связан с ишемическим повреждением клеток, кроме того, было продемонстрировано, что в течение суток происходило нарастание количества АЛТ и АСТ в плазме крови экспериментальных животных.

Также нами была оценена выживаемость животных после выполнения процедуры окклюзии портальной триады. Одна особь из шести (4-я группа) пала на следующий день после выполнения манипуляций, остальные в течение всего срока наблюдений не проявляли признаков ухудшения самочувствия. С одной стороны, продемонстрированная выживаемость более 80% является удовлетворительным результатом, а с другой - указывает на необходимость тщательного планирования количества животных в дальнейших экспериментах с использованием этой методики, чтобы избежать

потерь, которые могут сделать невозможной статистическую обработку результатов.

Заключение. Полученные результаты продемонстрировали, что редукция кровотока портальной триады в течение 20 мин способствует выраженной гипоксии тканей печени, но в то же время характеризуется высокими показателями выживаемости животных, что позволяет оценивать этот метод в качестве незаменимого инструмента для исследований в области изучения патологий печени.

Литература

1. Кит О.И., Гончарова А.С., Лукбанова Е.А. Методы создания ортотопических моделей рака толстой кишки человека на иммунодефицитных животных // Вопросы онкологии. 2019. Т. 65. №. 2. С. 303-307. DOI: 10.37469/0507-3758-2019-65-2-303-307
2. Кит О.И., Гончарова А.С., Лукбанова Е.А. Methods of creation of orthotopic models of human colon cancer in immunodeficient animals // Problems in Oncology. 2019. Vol. 65. №. 2. P. 303-307. DOI: 10.37469/0507-3758-2019-65-2-303-307
3. Межевова И.В., Ситковская А.О., Кит О.И. Первичные культуры опухолевых клеток: современные методы получения и поддержания in vitro. Южно-Российский онкологический журнал // South Russian Journal of Cancer. 2020;1(3): 36- 49. DOI: 10.37748/2687-0533-2020-1-3-4
4. Mezhevova I.V., Sitkovskaya A.O., Kit O.I. Primary tumor cell cultures: current methods of obtaining and subcultivation. South Russian Journal of Cancer. 2020;1(3):36-49. DOI: 10.37748/2687-0533-2020-1-3-4
5. Bonnitche P., Grieve S., Figtree G. Clinical imaging of hypoxia: current status and future directions // Free Radical Biology and Medicine. – 2018. – Vol. 126. – P. 296-312. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.08.019
6. Halfway between 2D and animal models: are 3D cultures the ideal tool to study cancer-microenvironment interactions? / Horary-Véchet J., Rafii A., Touboul C., [et al] // International journal of molecular sciences. – 2018. – Vol. 19. – №. 1. – P. 181. DOI: 10.3390/ijms19010181

5. How to modulate tumor hypoxia for pre-clinical in vivo imaging research / De Bruycker S., Vangestel C., Staelens S., [et al] // Contrast Media & Molecular Imaging. – 2018. – Vol. 2018. DOI: 10.1155/2018/4608186

6. Hypoxia, oxidative stress, and inflammation: three faces of neurodegenerative diseases / Merelli A., Repetto M., Lazarowski A., [et al] // Journal of Alzheimer's Disease. – 2021. – Vol. 82. – №. s1. – P. S109-S126. DOI: 10.3233/JAD-201074

7. Kindrick J.D., Mole D. R. Hypoxic regula-

tion of gene transcription and chromatin: Cause and effect // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Vol. 21. – №. 21. – С. 8320. DOI: 10.3390/ijms21218320

8. Luo W., Wang Y. Hypoxia mediates tumor malignancy and therapy resistance // Hypoxia and Cancer Metastasis. – 2019. – P. 1-18. DOI: 10.1007/978-3-030-12734-3_1

9. Mesarwi O.A., Loomba R., Malhotra A. Obstructive sleep apnea, hypoxia, and nonalcoholic fatty liver disease // American journal of respiratory and critical care medicine. 2019.

Vol. 199. №. 7. P. 830-841. DOI: 10.1164/icc.201806-1109TR

10. Oxygen homeostasis and cardiovascular disease: A role for HIF? / Li X., Zhang Q., Nasser M. I., [et al] // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2020. – Vol. 128. – P. 110338. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110338

11. Use of a hanging-weight system for liver ischemia in mice / Zimmerman M., Tak E., Kaplan M., [et al] // JoVE (Journal of Visualized Experiments). – 2012. – №. 66. – P. e2550. DOI: 10.3791/2550

М.Л. Полина, Л.М. Михалева, И.И. Витязева,
М.Б. Хамошина, И.М. Ордянец, М.Г. Лебедева,
Л.А. Шеленина, П.Н. Захарова, Н.И. Дуглас

ВЗАИМОСВЯЗЬ ТИПА МИКРОБИОТЫ И ИММУННЫХ РЕСУРСОВ ЭНДОМЕТРИЯ БЕСПЛОДНЫХ ЖЕНЩИН В ФАЗУ ИМПЛАНТАЦИОННОГО ОКНА

DOI 10.25789/УМЖ.2023.82.02

УДК 618.14

Изучены особенности микробиоты и иммунного профиля эндометрия женщин с бесплодием различного генеза в период «имплантационного окна».

Выявлены фенотипы эндометрия, отличные по иммунному профилю и профилю микробиоты внутри каждой группы (с бесплодием неясного генеза, трубно-перитонеального генеза, хроническим эндометритом, «тонким» эндометрием): «нормальный», диспластический, хронического воспаления.

При фенотипе хронического эндометрита выявлено достоверное преобладание цитокинов провоспалительного профиля Th1/Th1 в присутствии дисбиотического типа микробиоты. Особенности диспластического фенотипа эндометрия заключаются в «бедном» иммунном ответе (цитокинов, хемокинов, факторов роста) на фоне выраженной фибротической трансформации. Представления о фенотипе эндометрия (нормальный, диспластический, хроническое воспаление) выступают критерием готовности к имплантации blastocysts.

Ключевые слова: бесплодие, период «имплантационного окна», хронический эндометрит, иммуногистохимическое исследование, молекулярный фенотип, лактобациллярный и дисбиотический типы микробиоты

The features of the microbiota and the immune profile of the endometrium of women with infertility of different genesis during the "implantation window" period have been studied.

Endometrial phenotypes different in immune profile and microbiota profile within each group were identified (with infertility of unclear genesis, tube-peritoneal genesis, chronic endometritis, "thin" endometrium): "normal," dysplastic, chronic inflammation.

ПОЛИНА Мирослава Леонидовна – к.м.н., врач-гинеколог Медицинского центра женского здоровья (Москва), ассистент кафедры Медицинского института Российского университета Дружбы народов, polina.ml@mail.ru; **МИХАЛЕВА Людмила Михайловна** – д.м.н., чл.-корр. РАН, проф., директор НИИ морфологии человека, зав. лаб.; **ВИТЯЗЕВА Ирина Ивановна** – д.м.н., зав. отд. Национального медицинского исследовательского центра эндокринологии МЗ РФ (Москва); **ХАМОШИНА Марина Борисовна** – д.м.н., проф. Медицинского института РУДН; **ОРДЯНЕЦ Ирина Михайловна** – д.м.н., проф. Медицинского института РУДН; **ЛЕБЕДЕВА Марина Георгиевна** – к.м.н., доцент Медицинского института РУДН; **ШЕЛЕНИНА Людмила Александровна** – врач гинеколог Городской клинической больницы им. Ф.И. Иноземцева Департамента здравоохранения г. Москвы; **ЗАХАРОВА Пراسковья Николаевна** – аспирант Медицинского института Северо-Восточного федерального университета им. М.К. Аммосова, Якутск; **ДУГЛАС Наталья Ивановна** – д.м.н., зав. кафедрой Медицинского института СВФУ им. М.К. Аммосова.

The phenotype of chronic endometritis is revealed a significant predominance of cytokines of the pro-inflammatory Th1/Th1 profile in the presence of a dysbiotic microbiota type. The features of the dysplastic endometrial phenotype consist in a "poor" immune response (cytokines, chemokines, growth factors) against the background of pronounced fibrotic transformation. Ideas about the endometrial phenotype (normal, dysplastic, chronic inflammation) are a criterion for readiness for blastocyst implantation.

Keywords: infertility, the period of the "implantation window", chronic endometritis, immunohistochemical study, molecular phenotype, lactobacillar and dysbiotic types of microbiota

С позиций молекулярных механизмов формирования восприимчивости к эмбриону, эндометрий, при всем множестве научных работ, остается самой неисследованной тканью женского организма. Оптимальная для локализации эмбриона, адгезии, инвазии и имплантации микросреда развивается с дифференцировкой стромальных клеток эндометрия в децидуальные и изменением количества и функциональной активности иммунных клеток [6, 14]. «Тонкие» механизмы неудач имплантации связывают со сложностями

аутокринной, паракринной и эндокринной передачи сигналов, включая половые стероиды, цитокины, хемокины, факторы роста и внутриклеточные коммуникации [16]. Сообщается, что более 80% повторных имплантационных потерь происходят на фоне аномального профиля цитокинов, однако сложные молекулярно-биологические события при нарушении взаимодействий blastocysts и эндометрия практически не изучены [13].

Изменение представлений о «стерильности» эндометрия на возможное