

<https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-3-17-22>



АНАЛИЗ КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА БРОНХОАЛЬВЕОЛЯРНОГО ЛАВАЖА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ И ЛЕЧЕНИИ ОСТРОГО РЕСПИРАТОРНОГО ДИСТРЕСС-СИНДРОМА НА МЫШАХ-БИОМОДЕЛЯХ

О.В. Алимкина*, А.Э. Петренко, Е.С. Савченко, Н.С. Огнева, Л.А. Таболякова,
С.В. Максименко, М.М. Скрипкина, М.М. Борисова

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, 1

Статья посвящена изучению изменений в клеточном составе бронхоальвеолярного лаважа во времени при моделировании острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) у мышей с последующим однократным введением Лейтрагина. У интактных животных в бронхоальвеолярном лаваже преобладают макрофаги, что является физиологической нормой. При моделировании ОРДС происходит нарастание нейтрофилов. Однократное введение Лейтрагина достоверно уменьшает количество нейтрофилов с одновременным нарастанием макрофагов к 72-м ч, т. е. приводя клеточный состав лаважа к норме.

Ключевые слова: острый респираторный дистресс-синдром, бронхоальвеолярный лаваж, Лейтрагин
Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Алимкина О.В., Петренко А.Э., Савченко Е.С., Огнева Н.С., Таболякова Л.А., Максименко С.В., Скрипкина М.М., Борисова М.М. Анализ клеточного состава бронхоальвеолярного лаважа при моделировании и лечении острого респираторного дистресс-синдрома на мышах-биомоделях. *Биомедицина*. 2021;17(3):17–22. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-3-17-22>

Поступила 01.04.2021

Принята после доработки 16.04.2021

Опубликована 10.09.2021

ANALYSIS OF THE CELLULAR COMPOSITION OF BRONCHOALVEOLAR LAVAGE IN THE MODELING AND TREATMENT OF ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME IN BIOMODEL MICE

Oksana V. Alimkina*, Aleksandra E. Petrenko, Elena S. Savchenko, Nastasya S. Ogneva,
Lidiya A. Taboyakova, Sergey V. Maksimenko, Mariya M. Skripkina, Mariya M. Borisova

Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye gory village, building 1

This article investigates changes in the cellular composition of bronchoalveolar lavage over time in the modeling of acute respiratory distress syndrome (ARDS) in mice, followed by a single administration of Leutragine. In intact animals, macrophages predominate in bronchoalveolar lavage, which is the physiological norm. When modeling ARDS, neutrophils increase. A single administration of Leutragine leads to a significant reduction in the number of neutrophils and a simultaneous increase in macrophages in 72 hours, thus bringing the cellular composition of lavage to normal.

Key words: acute respiratory distress syndrome, bronchoalveolar lavage, Leutragine

Conflict of interest: authors declare no conflicts of interest.

For citation: Alimkina O.V., Petrenko A.E., Savchenko E.S., Ogneva N.S., Taboyakova L.A., Maksimenko S.V., Skripkina M.M., Borisova M.M. Analysis of the Cellular Composition of Bronchoalveolar Lavage in the Modeling and Treatment of Acute Respiratory Distress Syndrome in Biomedel Mice. *Journal Biomed.* 2021;17(3):17–22. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-3-17-22>

Submitted 01.04.2021

Revised 16.04.2021

Published 10.09.2021

Введение

Острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) — тип дыхательной недостаточности, характеризующийся быстрым началом широкого воспалительного процесса в легких [8]. ОРДС чаще возникает в первые 12–48 ч от начала основного заболевания [5] и характеризуется избыточной продукцией провоспалительных цитокинов и хемокинов, массивной инфильтрацией нейтрофилов в легкие, эндотелиальной дисфункцией, микротромбозом, интерстициальным и альвеолярным отеком, гибелью альвеолярных эпителиальных клеток и активацией макрофагов [9].

Лейтрагин — это гексапептид, агонист δ -опиоидных рецепторов с аминокислотной последовательностью Туг-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg, структурный аналог фрагмента 1–6 эндогенного опиоидного пептида динорфина 1–17, полученный заменой остатка Gly во втором положении на D-Ala. Динорфин 1–17 производится многими клетками, в т. ч. лейкоцитами, и подвергаясь биотрансформации в месте воспаления с образованием фрагментов, в т. ч. динорфина 1–6, способен ингибировать канонический путь активации транскрипционного ядерного фактора каппа В (NF- κ B), подавляя т. о. транскрипционную активацию NF- κ B-зависимых генов, кодирующих провоспалительные цитокины, хемокины и др. медиаторы воспаления [2].

Цель работы — изучение клеточного состава бронхоальвеолярного лаважа в мо-

дели фатального ОРДС у мышей линии C57Bl/6Y с последующим однократным введением Лейтрагина в качестве лечения.

Материалы и методы

Дизайн эксперимента

Исследования проводились в Научном центре биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства (ФГБУН НЦБМТ ФМБА России) на мышах-самцах линии C57Bl/6Y массой 18–21 г, полученных из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России и прошедших 14-дневный карантин. Содержание и обращение с животными в эксперименте соответствовали требованиям приказа Минздрава России от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики»; правилам, принятым Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей [3]; утвержденному письменному протоколу, в соответствии со Стандартными операционными процедурами исследователя (СОП); санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) [7]. Животные содержались в вентилируемых клетках при температуре воздуха 20–22°C, относительной влажности 40–60%, световом режиме 12:12 с включением света в 8.00. Использовался полнорационный корм ПК-120 (ООО «Лабораторкорм», Россия) при свободном доступе к водопроводной питьевой воде.

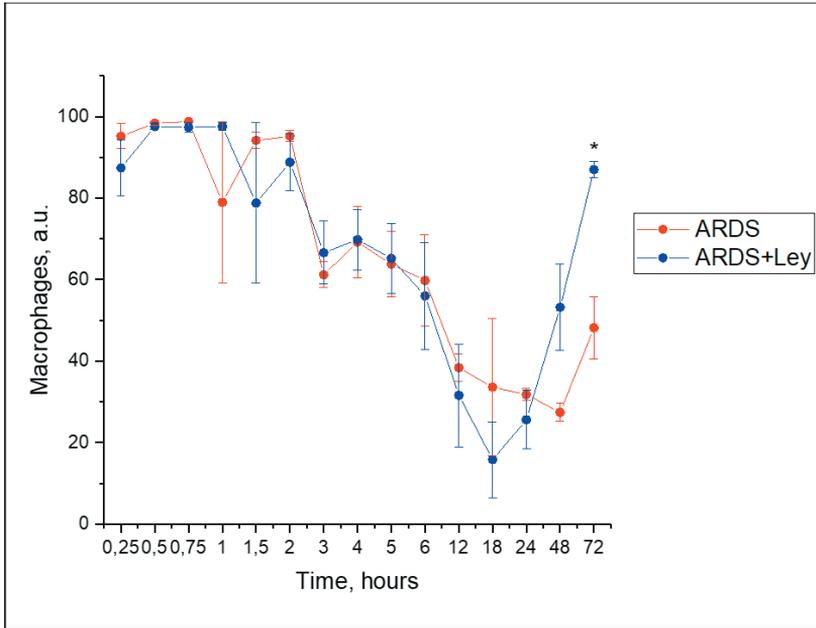


Рис. 1. Изменение процентного содержания макрофагов в БАЛЖ у мышей с ОРДС. ARDS — группа мышей с ОРДС, ARDS+Ley — группа мышей с ОРДС, однократно получивших Лейтрагин.

Примечание: * — статистически значимое отличие на 72 ч.

Fig. 1. Changes in the percentage of macrophages in BALF in mice with ARDS. ARDS — a group of mice with ARDS, ARDS+Ley — a group of mice with ARDS upon a single administration of Leutragine.

Note: * — statistically significant difference at 72 hours.

Модель острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС)

Животные были отобраны в эксперимент методом рандомизации и разделены на две группы по 75 особей в каждой. Обеим группам животных вводили ингаляционно внутрилегочно α -галактозилцерамид в дозе 1 мкг/мышь и через 24 ч под общим наркозом вводили интратрахеально смесь липополисахарида *E. coli* в количестве 1 мг/мышь с добавлением 10 мкл/мышь полного адьюванта Фрейнда, обозначаемую как LPS [1]. Далее одной из групп через 30 мин после введения LPS ингаляционно вводили Лейтрагин в дозе 100 мкг/мышь.

В каждую временную точку — 15, 30 и 45 мин, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 18, 24, 48 и 72 ч — выводили 5 животных из каждой группы. Точка отсчета — через 30 мин

после ингаляции Лейтрагином. Животные подвергались эвтаназии, после чего отбирали бронхоальвеолярную легочную жидкость (БАЛЖ).

Получение БАЛЖ (смыва) — это процедура, используемая для изучения клеточного и внеклеточного содержимого пространства легких [4]. В качестве жидкости для промывания использовали изотонический физ. р-р. Чтобы избежать повреждения тканей легкого в результате введения омывающей жидкости, объем составил 1 мл [4]. Промывку делали два раза, осторожно вводя раствор в легкие и выкачивая его обратно. Для подсчета общего количества клеток и их дифференцировки образец БАЛЖ прогоняли через гематологический анализатор Mindray BC-3600, далее центрифугировали, клеточный осадок наносили на предметное стекло с последующей окра-

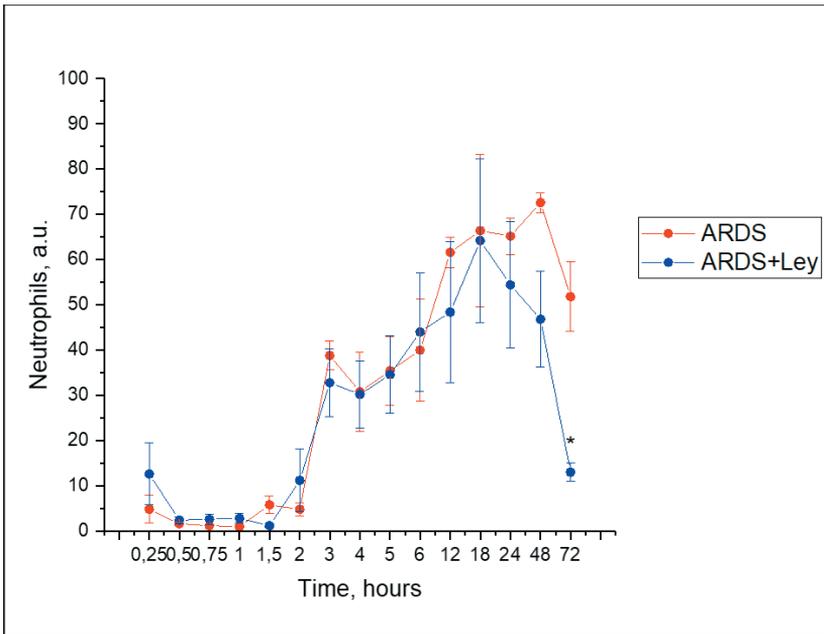


Рис. 2. Изменение процентного содержания нейтрофилов в БАЛЖ у мышей с ОРДС. ARDS — группа мышей с ОРДС, ARDS+Ley — группа мышей с ОРДС, однократно получивших Лейтрагин.

Примечание: * — статистически значимое отличие на 72 ч.

Fig. 2. Changes in the percentage of neutrophils in BALF in mice with ARDS. ARDS — a group of mice with ARDS, ARDS+Ley — a group of mice with ARDS upon a single administration of Leutragine.

Note: * — statistically significant difference at 72 hours.

ской. Окрашенные препараты микроскопировали для определения лейкоцитарного состава БАЛЖ.

Статистическую обработку проводили двухфакторным дисперсионным анализом (two-way ANOVA), пост-тест Бонферрони, с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Уровень достоверности был установлен в 95% ($p < 0,05$). Статистически значимые результаты отмечены звёздочками.

Результаты и их обсуждение

Основным компонентом БАЛЖ здоровых животных является легочный макрофаг (90% от общего количества клеток). Содержание нейтрофилов очень мало, и приток этих клеток является чувствительным индикатором воспалительного ответа [6].

Выводы

1. Модель ОРДС характеризуется обратимой двухфазной динамикой макрофагов (временное снижение) и нейтрофилов (временное повышение) в БАЛЖ.

2. Лейтрагин не влияет на первую фазу, которая характеризуется привлечением нейтрофилов в легкие. Однако однократное введение Лейтрагина достоверно снижает процентное содержание нейтрофилов к 72 ч с одновременным нарастанием макрофагов по сравнению с моделью. Т. о., Лейтрагин сокращает время восстановления нормального клеточного состава БАЛЖ у животных с ОРДС.

3. Исследование динамики клеточного состава в БАЛЖ является эффективным методом изучения воспалительных процессов в легких, а также поиска препаратов, подавляющих воспаление.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Каркищенко В.Н., Пomyткин И.А., Гасанов М.Т., Нестеров М.С., Фокин Ю.В., Табоякова Л.А., Алимкина О.В., Хвостов Д.В. Лейтрагин повышает выживаемость животных в модели фатального острого респираторного дистресс-синдрома при профилактическом и лечебном режимах введения. *Биомедицина*. 2020;16(4):44-51. [Karkischenko V.N., Pomytkin I.A., Gasanov M.T., Nesterov M.S., Fokin Yu.V., Taboyakova L.A., Alimkina O.V., Hvostov D.V. Lejtragin povyshayet vyzhivaemost' zhivotnyh v modelifatal'nogo ostrogo respiratornogo distress-sindroma pri profilakticheskom i lechebnom rezhimakh vvedeniya [Leytragine increases the survival rate of animals in a model of fatal acute respiratory distress syndrome with preventive and therapeutic modes of administration]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2020;16(4):44-51. (In Russian)].
2. Пomyткин И.А., Каркищенко В.Н., Фокин Ю.В., Нестеров М.С., Петрова Н.В. Модель фатального острого поражения легких и острого респираторного дистресс-синдрома. *Биомедицина*. 2020;16(4):24-33. [Pomytkin I.A., Karkischenko V.N., Fokin Yu.V., Nesterov M.S., Petrova N.V. Model' fatal'nogo ostrogo porazheniya legkih i ostrogo respiratornogo distress-sindroma. [Model of fatal acute lung injury and acute respiratory distress syndrome]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2020;16(4):24-33. (In Russian)].
3. *European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123)*, Strasbourg, 1986.
4. Henderson R.F. Use of bronchoalveolar lavage to detect respiratory tract toxicity of inhaled material. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2005;57:155-159. DOI:10.1016/j.etp.2005.05.004.
5. Iribarren C., Jacobs D.R., Sidney S., Gross M.D., Eisner M.D. Cigarette smoking, alcohol consumption, and risk of ARDS: a 15-year cohort study in a managed care setting. *Chest*. 2000;117(1):163-168. DOI: 10.1378/chest.117.1.163. PMID 10631215.
6. Kodavanti U.P. Respiratory toxicity biomarkers. Biomarkers in Toxicology. *Academic Press*. 2014:217-239. DOI: 10.1016/B978-0-12-404630-6.00012-9.
7. Loscalzo J., Longo D.L., Fauci A.S., Dennis L.K., Hauser S.L. Harrison's Principles of Internal Medicine, 18th Ed. *McGraw-Hill Education*, 2011. – ISBN 0-07-174889-X.
8. Matthay M.A., Zemans R.L., Zimmerman G.A., Arabi Y.M., Beitler J.R., Mercat A., Herridge M., Randolph A.G., Calfee C.S. Acute respiratory distress syndrome. *Nature Reviews. Disease Primers*. 2019;5(1):18. DOI:10.1038/s41572-019-0069-0. PMC 6709677. PMID 30872586.
9. Potey P.M., Rossi A.G., Lucas C.D., Dorward D.A. Neutrophils in the initiation and resolution of acute pulmonary inflammation: understanding biological function and therapeutic potential. *J. Pathol*. 2019;247(5):672-685.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Алимкина Оксана Владимировна*, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: alimkina@scbmt.ru

Петренко Александра Эдуардовна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: pae@scbmt.ru

Савченко Елена Сергеевна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: savelaine@gmail.com

Огнева Настасья Сергеевна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: ognevanastya@mail.ru

Oksana V. Alimkina*, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: alimkina@scbmt.ru

Aleksandra E. Petrenko, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: pae@scbmt.ru

Elena S. Savchenko, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: savelaine@gmail.com

Nastasya S. Ogneva, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: ognevanastya@mail.ru

Табоякова Лидия Александровна, ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»;
e-mail: lida-vet@mail.ru

Максименко Сергей Васильевич, к.б.н.,
ФГБУН «Научный центр биомедицинских тех-
нологий ФМБА России»;
e-mail: vx136@rambler.ru

Скрипкина Мария Михайловна, ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»;
e-mail: skripkina.fmba@gmail.com

Борисова Мария Михайловна, ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»;
e-mail: borisova_mm@mail.ru

Lidiya A. Taboyakova, Scientific Center of
Biomedical Technologies of the Federal Medical
and Biological Agency of Russia;
e-mail: lida-vet@mail.ru

Sergey V. Maksimenko, Cand. Sci. (Biol.),
Scientific Center of Biomedical Technologies of the
Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: vx136@rambler.ru

Mariya M. Skripkina, Scientific Center of
Biomedical Technologies of the Federal Medical
and Biological Agency of Russia;
e-mail: skripkina.fmba@gmail.com

Mariya M. Borisova, Scientific Center of
Biomedical Technologies of the Federal Medical
and Biological Agency of Russia;
e-mail: borisova_mm@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author