

ЦИТОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛЁГОЧНОГО МАТЕРИАЛА МЫШЕЙ ЛИНИИ C57BL/6Y ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ОСТРОГО РЕСПИРАТОРНОГО ДИСТРЕСС-СИНДРОМА

О.В. Алимкина, А.Э. Петренко*

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

Работа посвящена изучению изменений в клеточном составе бронхоальвеолярного лаважа с течением времени при моделировании острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) у мышей. Моделирование ОРДС осуществляли с помощью введения α -галактозилцерамида и смеси липополисахарида с полным адъювантом Фрейнда. После эвтаназии был взят бронхоальвеолярный лаваж, и на основании его анализа были выполнены графики изменения содержания общего количества лейкоцитов, процентного содержания нейтрофилов и макрофагов, из которых следует, что процентное содержание нейтрофилов в группе ОРДС статистически значимо отличается от интактных, начиная с 3 ч после моделирования ОРДС. Далее наблюдается статистически значимое снижение макрофагов.

Ключевые слова: ОРДС, бронхоальвеолярный лаваж, мыши

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Алимкина О.В., Петренко А.Э. Цитологический анализ лёгочного материала мышей линии C57BL/6Y при моделировании острого респираторного дистресс-синдрома. *Биомедицина*. 2021;17(3E):17–22. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-17-22>

Поступила 25.03.2021

Принята после доработки 16.04.2021

Опубликована 20.10.2021

CYTOLOGICAL ANALYSIS OF THE LUNG MATERIAL OF C57BL/6Y MICE IN THE SIMULATION OF ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME

Oksana V. Alimkina, Aleksandra E. Petrenko*

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

The work is devoted to the study of changes in the cellular composition of bronchoalveolar lavage over time in the modeling of acute respiratory distress syndrome (ARDS) in mice. ARDS was modeled by administering α -galactosylceramide and a mixture of lipopolysaccharide with a complete Freud's adjuvant. After euthanasia, bronchoalveolar lavage was taken for analysis. On this basis, changes in the total number of white blood cells, the percentage of neutrophils and macrophages were assessed. It was found that the percentage of neutrophils in the ARDS group shows a statistically significant difference from that in the intact group, starting from 3 hours after modeling ARDS. Further, a statistically significant decrease in macrophages was observed.

Keywords: ARDS, bronchoalveolar lavage, mice

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Alimkina O.V., Petrenko A.E. Cytological Analysis of the lung material of C57BL/6Y Mice in the Simulation of Acute Respiratory Distress Syndrome. *Journal Biomed.* 2021;17(3E):17–22. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-17-22>

Submitted 25.03.2021

Revised 16.04.2021

Published 20.10.2021

Введение

Острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) — воспалительный процесс в лёгких, вызванный инфекцией или другими причинами. Может возникать при вирусных и бактериальных пневмониях, тяжёлой травме [10].

ОРДС характеризуется избыточной продукцией провоспалительных цитокинов и хемокинов, массивной инфильтрацией нейтрофилов в лёгкие, эндотелиальной дисфункцией и активацией макрофагов [6, 9].

Бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ) — диагностическая процедура, предполагающая введение в лёгкие нейтрального (физиологического) раствора и удаление его с последующим изучением состава извлечённого субстрата. Процедура используется для изучения клеточного и внеклеточного содержимого пространства лёгких и дыхательных путей [1]. Методика забора смыва является достаточно простой для воспроизведения и получения данных о протекании респираторных воспалительных процессов. В целом процедура забора БАЛ лучше всего подходит для выявления ранних признаков повреждения лёгких до наступления настолько значительных изменений, что делает проблематичным извлечение лаважа [5].

Материалы и методы

Исследования проводились в НЦБМТ ФМБА России на мышах 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 № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики»; правилам, принятым Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей; утверждённому письменному протоколу, в соответствии со Стандартными операционными процедурами исследователя (СОП); санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев). Протокол эксперимента был одобрен биоэтической комиссией ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

Животные содержались в вентилируемых клетках при температуре воздуха 20–22°C, относительной влажности 40–60%, световом режиме 12:12 с включением света в 8⁰⁰. Использовался полнорационный корм ПК-120 (ООО «Лабораторкорм», Россия) при свободном доступе к водопроводной питьевой воде [2, 3, 7].

Модель острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС)

Животные были отобраны в эксперимент методом рандомизации и разделены на 2 группы по 75 особей в каждой. Животные в первой группе были интактными. Для моделирования ОРДС животным второй группы вводили ингаляционно 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 [6].

В каждую временную точку — 15, 30, 45 мин; 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 18, 24,

48 и 72 ч — из эксперимента выводили по 5 животных из каждой группы. Точкой отсчёта считали последние проведённые манипуляции. Процедуру забора БАЛ проводили на животных посмертно, сразу после проведения эвтаназии, путём надреза трахеи, введением катетера с физ. р-ром (1 мл), с промывкой два раза.

На гематологическом анализаторе Mindray BC-3600 (Китай) проводилась оценка общего количества клеток в нативном лаваже. Лаваж центрифугировали, надосадочную жидкость убирали, осадок наносили на предметное стекло, далее окрашивали набором красок Лейкодиф (Чехия), а также микроскопировали для подсчёта и определения клеток.

Статистическую обработку проводили двухфакторным дисперсионным анализом (two-way ANOVA), пост тест Бонферрони, с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Статистически значимые результаты отмечены: ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$; **** — $p < 0,0001$.

Результаты исследований

Полученные данные представлены на рис. 1–3.

Наблюдается тенденция к повышению общего количества лейкоцитов в группе ОРДС по сравнению с интактными животными (недостаточно, $p > 0,05$).

Статистически значимое отличие группы ОРДС от интактных животных, начиная с точки 3 ч, при $p < 0,01$, а на 24 ч — при $p < 0,001$.

Начиная с 3 ч после моделирования ОРДС, наблюдается статистически значимое повышение макрофагов в группе ОРДС. Отличия достоверны при $p < 0,01$ в 3 ч, при $p < 0,0001$ — в 24, 48 и 72 ч.

Выводы

1. В ходе эксперимента статистически значимого повышения общего количества лейкоцитов не наблюдалось, следовательно, происходит процентное перераспределение лейкоцитов за счёт привлечения нейтрофилов макрофагами.

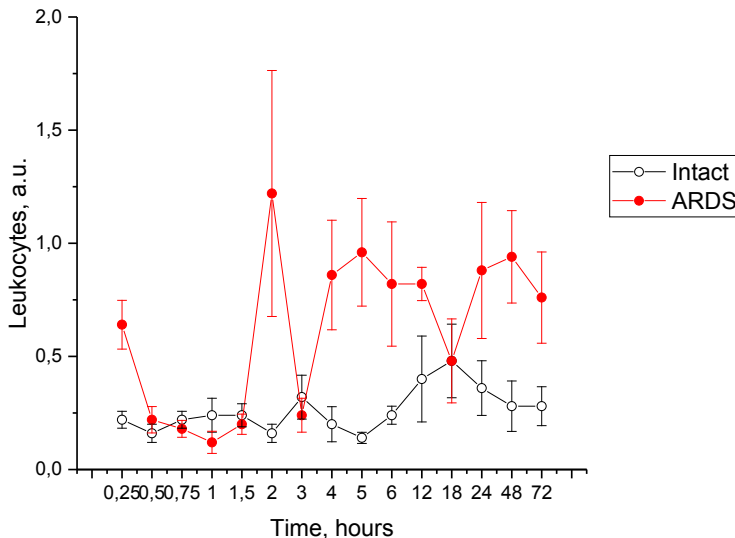


Рис. 1. Изменение общего количества лейкоцитов в БАЛ ($10^6/l$). Intact — группа интактных животных, ARDS — группа моделирования ОРДС.

Fig. 1. Change in the total number of white blood cells in BAL ($10^6/l$). Intact — group of intact animals, ARDS — group of ARDS modeling.

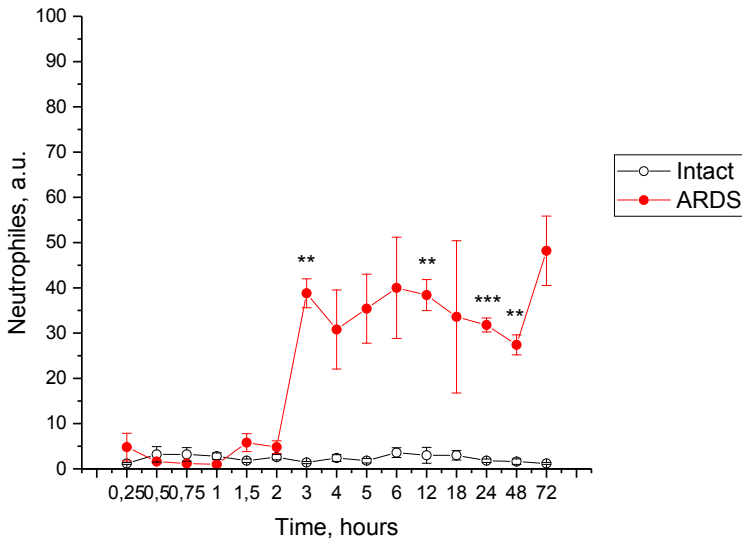


Рис. 2. Изменение содержания нейтрофилов в БАЛ (%). *Intact* — группа интактных животных, *ARDS* — группа моделирования ОРДС.

Fig. 2. Changes in the neutrophil content in BAL (%). *Intact* — group of intact animals, *ARDS* — group of ARDS modeling.

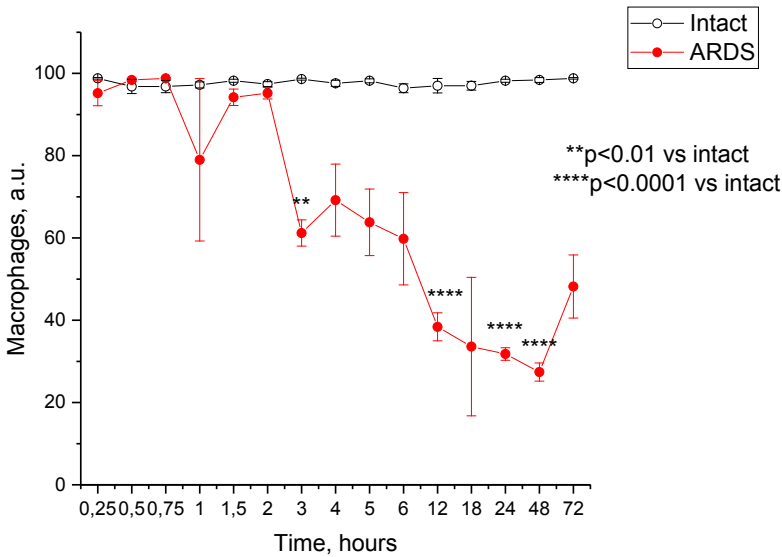


Рис. 3. Изменение содержания макрофагов в БАЛ (%). *Intact* — группа интактных животных, *ARDS* — группа моделирования ОРДС.

Fig. 3. Changes in the content of macrophages in BAL (%). *Intact* — group of intact animals, *ARDS* — group of ARDS modeling.

2. ОРДС характеризуется нерегулируемым воспалением, сопровождающимся значительным ростом уровней провоспалительных медиаторов в лёгких, таких как нейтрофилы, которые проникают в альвеолы и провоцируют гибель альвеолярных эпителиальных клеток, активацию макрофагов и альвеолярное поражение лёгких [4]. Содержащаяся в гранулах нейтрофилов эластаза разрушает сурфактант лёгких, расщепляя все 4 белка, входящие

в его состав, что приводит к потере упругости лёгких и уменьшению площади поверхности газообмена [8].

3. Доказано, что модель воспроизводит эффекты ОРДС, а анализ БАЛ является достоверным методом исследования воспалительных процессов, протекающих в лёгких, с возможностью оценки эффективности применения различных противовоспалительных препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Зиновьев С.В., Селиверстов С.С., Целуйко С.С., Горбунов М.М., Семенов Д.А., Морфологическая характеристика открытого бронхоальвеолярного лаважа лёгкого крысы. *Амурский медицинский журнал*. 2015;4(12):103–108. [Zinov'ev S.V., Seliverstov S.S., Tselujko S.S., Gorbunov M.M., Semenov D.A. Morfologicheskaya kharakteristika otkrytogo bronkhoal'veolyarnogo lavazha legkogo krysy [Morphological characteristics of open bronchoalveolar lavage rat lung]. *Amur Medical Journal*. 2015;4(12):103–108. (In Russian)].
2. Каркищенко Н.Н. Альтернативы биомедицины. Т. 1. *Основы биомедицины и фармако моделирования*. М.: Изд-во ВПК, 2007:320. [Karkischenko N.N. *Al'ternativy biomeditsiny. T. 1. Osnovy biomeditsiny i farmakomodelirovaniya* [Biomedicine alternatives. Vol. 1. Fundamentals of biomedicine and pharmacomodeling]. Moscow: Izdatel'stvo VPK, 2007:320. (In Russian)].
3. Каркищенко Н.Н. Основы биомоделирования. М.: Межакадемическое изд-во ВПК, 2004:607. [Karkischenko N.N. *Osnovy biomodelirovaniya* [Basics of biomodeling]. Moscow: Mezhakademicheskoe izd-vo VPK, 2004:607. (In Russian)].
4. Каркищенко В.Н., Помыткин И.А., Гасанов М.Т., Степанова О.И., Клёсов Р.А., Огнева Н.С., Савченко Н.С., Скворцова В.И. Сочетанное применение лейтрагина и лёгочного сурфактанта-БЛ повышает выживаемость животных в модели фатального острого респираторного дистресс-синдрома. *Биомедицина*. 2020;16(4):52–59. [Karkischenko V.N., Pomytkin I.A., Gasanov M.T., Stepanova O.I., Klesov R.A., Ogneva N.S., Savchenko E.S., Skvortsova V.I. Sochetannoe primeneniye leytragina i legochnogo surfaktanta-BL povyshayet vyzhivaemost' zhivotnykh v modeli fatal'nogo ostrogo respiratornogo distress-sindroma [The combined use of leytargin and pulmonary surfactant-BL increases animal survival in a model of fatal acute respiratory distress syndrome]. *Biomeditsina* [Journal Biomed]. 2020;16(4):52–59. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-16-4-52-59.
5. Матичин А.А., Кательникова А.Е., Крышень К.Л. Особенности отбора бронхоальвеолярного лаважа у лабораторных животных. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2019;4. [Matichin A.A., Katel'nikova A.E., Kryshen' K.L. Osobennosti otbora bronkhoal'veolyarnogo lavazha u laboratornykh zhivotnykh [Features of selection of bronchoalveolar lavage in laboratory animals]. *Labortornye zhyvotnye dlya nauchnykh issledovaniy* [Laboratory animals for scientific research]. 2019;4. (In Russian)]. DOI: 10.29296/2618723X-2019-04-06.
6. Помыткин И.А., Каркищенко В.Н., Фокин Ю.В., Нестеров М.С., Петрова Н.В. Модель фатального острого поражения лёгких 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 legkikh i ostrogo respiratornogo distress-sindroma [A model of fatal acute lung injury and acute respiratory distress syndrome]. *Biomeditsina* [Journal Biomed]. 2020;16(4):24–33. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-16-4-24-33.
7. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях. Под ред. Н.Н. Каркищенко и др. М.: Профиль-2С, 2010:358. [*Rukovodstvo po laboratornym zhivotnym i al'ternativnym modelyam v biomeditsinskikh issledovaniyakh* [Manual on laboratory animals and alternative models in biomedical research]. Ed. by N.N. Karkischenko, et al. Moscow: Profil'-2S Publ., 2010:358. (In Russian)].
8. Kudo D., Toyama M., Aoyagi T., Akahori Y., Yamamoto H., Ishii K., et al. Involvement of high mobility group box 1 and the therapeutic effect of recombinant thrombomodulin in a mouse model of severe acute respiratory distress syndrome. *Clin. Exp. Immunol*. 2013;173(2):276–287.
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.

10. Zhao J., Li X., Gao Y., Huang W. Risk factors for the exacerbation of patients with 2019 Novel

Coronavirus: A meta-analysis. *Int. J. Med. Sci.* 2020;17(12):1744–1750.

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

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

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author