

ИНДИКАТОРЫ УСТОЙЧИВОСТИ К ГИПОКСИИ, ОПРЕДЕЛЯЕМЫЕ ПО КЛЕТОЧНЫМ ЭЛЕМЕНТАМ КРОВИ КРЫС

© 2021 г. М. В. Кондашевская^{1,*}, К. А. Артемьева¹, В. В. Алексанкина¹,
Н. Б. Тихонова¹, М. Н. Болтовская¹

¹ ФГБНУ “Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына”,
Москва, Россия

*e-mail: marinavladi2177@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.03.2021 г.

После доработки 10.06.2021 г.

Принята к публикации 28.06.2021 г.

Несмотря на то что толерантность к гипоксии во многом определяется генетическими факторами, актуальным является изучение индивидуальных особенностей организма для выявления факторов устойчивости животных к гипоксическому воздействию. Для идентификации показателей как предикторов, позволяющих разделить популяцию животных по признаку толерантности к гипоксии, в работе исследовали клеточный состав и коагуляционную систему периферической крови крыс Вистар. Доказательством обоснованности выбора предикторов служило совпадение деления популяции по идентифицированным персонализированным показателям и результатов тестирования животных в барокамере, где создавали разрежение воздуха, соответствующее “подъему на высоту” 11 500 м над уровнем моря. До и после гипоксического воздействия проводили количественное определение форменных элементов периферической крови по восемнадцати параметрам. Выявлены отличия между низкоустойчивыми (НУ), высокоустойчивыми (ВУ) и среднеустойчивыми (СУ) к гипоксии животными по пяти параметрам: абсолютному количеству лейкоцитов, гранулоцитов, эритроцитов, проценту ретикулоцитов от общего числа эритроцитов и среднему содержанию гемоглобина в эритроците. Значения абсолютного количества эритроцитов, процента ретикулоцитов и среднего содержания гемоглобина в эритроците у ВУ крыс были значимо выше, чем у НУ животных (в 1.4, 1.9 и 1.1 раза соответственно). Показатели абсолютного количества лейкоцитов и гранулоцитов у ВУ особей оказались ниже, чем у НУ крыс. По оригинальной формуле вычисляли индекс устойчивости к гипоксии (ИУГ). Установлено, что ИУГ НУ крыс ≤ 0.203 , ВУ ≥ 0.335 , а СУ < 0.335 , но > 0.203 . Значения активированного частичного тромбопластинового (АЧТВ), тромбинового (ТВ) и протромбинового (ПВ) времени снижались, а уровня фибриногена – повышались после тестирования в барокамере. НУ животные характеризовались наименьшими значениями АЧТВ, ТВ и ПВ и наибольшими – уровня фибриногена. В результате проведенной работы определено, что одним из важнейших механизмов, обуславливающих высокую толерантность к гипоксии, является механизм поддержания реципрокных взаимоотношений между комплексом показателей эритроидного ряда, которым при гипоксии свойственно повышаться, и показателей гранулоцитарного ряда, для которых характерно понижение.

Ключевые слова: устойчивость к гипоксии, клеточные элементы крови, крысы Вистар, коагулограмма

DOI: 10.31857/S0044452921060061

ВВЕДЕНИЕ

Достаточно давно известно, что практически при всех заболеваниях инфекционной и неинфекционной природы, а также в экстремальных стрессовых состояниях формируется патологическая эндогенная гипоксия (низкий уровень содержания кислорода) [1, 2]. В частности, гипоксия является одним из патогенетических механизмов, а также фактором, обуславливающим устойчивость к стандартным методам лечения онкологических заболеваний [3]. Снижение по тем или иным причинам эффективности подачи кислорода тканям обуславливает нарушение регуляции микроциркуляторно-

го русла, экстравазации и активации лейкоцитов в зоне гипоксической микросреды. Многие разновидности инфильтрирующих эту зону иммунных и провоспалительных резидентных клеток в состоянии активации продуцируют значительные количества активных форм кислорода, что приводит к окислительному повреждению и окислительному стрессу, способствующему развитию митохондриальной дисфункции большей части окружающих клеток. Большую часть инфильтрирующих зону гипоксии клеток составляют активированные нейтрофилы, высвобождающие во внеклеточное пространство прокоагулянтные биологически актив-

ные вещества [4]. В целом все процессы, вызванные гипоксией, окислительным стрессом и нарушением функций митохондрий, провоцируют секрецию сигнальных молекул, дополнительно стимулирующих воспалительную реакцию [5, 6]. Такая ситуация часто сопровождается повреждением эндотелиального гликокаликса, выполняющего антикоагулянтную функцию, в результате происходит высвобождение таких прокоагулянтных эндотелиальных продуктов, как эндотелин-1, супероксидных анионов, тромбксана A₂, а также снижение биодоступности оксида азота (NO) [6, 7]. В результате консолидации протромботических эффектов нейтрофилов и эндотелия формируется “порочный круг” процессов, усиливающих дисфункцию противосвертывающей системы, обуславливающих доминирование коагуляционной системы крови и возможность перехода местной воспалительной реакции на системный уровень [4].

Продолжительность и тяжесть заболеваний во многом определяются индивидуальным порогом чувствительности к недостатку кислорода, который непосредственно связан с генетическими факторами [8, 9]. Изучение связи устойчивости к гипоксии с особенностями биохимических, клеточных, органных и фенотипических свойств организма животных с целью экстраполяции полученных сведений на человека важно для решения проблемы старения, а также повышения резистентности к гипоксии при различных заболеваниях и работоспособности людей, занятых в профессиях, связанных с большими психофизиологическими и экологическими нагрузками. Экологические нагрузки чаще всего обусловлены антропогенными воздействиями, связанными с загрязнением воздуха, одним из эффектов которого является снижение концентрации кислорода.

В настоящее время приоритетным направлением в экспериментальной биологии и медицине является поиск биомаркеров, устойчивых к гипоксии животных, с целью определения терапевтических мишеней при моделировании различных заболеваний человека и реализации персонализированного подхода к лечению. В большинстве случаев до начала экспериментов возникает необходимость разделить популяцию лабораторных животных на низкоустойчивых (НУ), среднеустойчивых (СУ) и высокоустойчивых (ВУ) к гипоксии особей. Чаще всего исследователи работают с группами резко отличающихся по всем параметрам животных, т.е. с НУ и ВУ. В настоящее время известно, что НУ особи характеризуются неэкономичным расходом кислорода — на единицу массы ткани в единицу времени они тратят кислорода значительно больше, чем ВУ особи. Тогда как у ВУ животных развиты механизмы более эффективной адаптации к гипоксии, поэтому они способны переносить длительное воздействие дефицита кислорода [10]. Для

разделения популяции лабораторных животных применяют тестирование по одиночке в барокамере, где создаются условия острой гипоксии. В биомедицинских исследованиях воспроизводится несколько различных видов гипоксии, среди которых наиболее часто используется имитация экзогенной гипобарической гипоксии [11]. Эту ситуацию искусственно воспроизводят путем управляемого откачивания воздуха из барокамеры, при этом снижение содержания кислорода в окружающей среде приводит к уменьшению напряжения кислорода (pO₂) в альвеолярном воздухе и артериальной крови. Последнее обуславливает падение напряжения кислорода в крови и тканях до уровней ниже критических, т.е. таких, при которых начинает снижаться скорость утилизации (потребления) кислорода тканями, в результате у животных развивается вторичная тканевая гипоксия. Если сила и/или длительность гипоксического воздействия превышают адаптационные возможности организма, в органах и тканях происходят необратимые изменения и животные гибнут.

Выявление взаимосвязи тех или иных физиологических показателей в предгипоксическом периоде с уровнем гипоксической устойчивости позволило бы прогнозировать индивидуальную резистентность лабораторных животных к гипоксии без использования тестирования в барокамере, при котором происходит повреждение ЦНС, возможна гибель животных, а для выживших особей при проведении дальнейших исследований требуется длительное (не менее 1 мес) восстановление организма [9, 12]. Любое гипоксическое состояние индуцирует сложный комплекс ответных реакций, в который включены все функциональные системы организма. Основным и наиболее хорошо изученным фактором, опосредующим этот ответ, является транскрипционный комплекс HIF-1 (HIF-1 α и HIF-1 β субъединицы), вырабатываемый большинством клеток в ответ на недостаток кислорода. HIF-1 β — это конститутивно экспрессируемая субъединица, тогда как HIF-1 α — регулируемая кислородом субъединица [13]. Показано, что уровень экспрессии HIF-1 α в лейкоцитах у людей и животных значительно варьирует, что свидетельствует о фенотипических различиях его регуляции [14, 15]. Однако HIF-1 α сложно использовать в качестве предиктора устойчивости к гипоксии в связи с изменением его уровня в зависимости от множества факторов. Даже вопрос о таргетном фармакологическом воздействии на HIF-1 α с целью направленного регулирования процессов срочной и долговременной адаптации животных и человека к гипоксии рассматривается неоднозначно, так как вклад HIF-1 α в патогенез любого заболевания, как правило, постоянно меняется [16]. Это же правило касается многих нейроиммуноэндокринных показателей.

Бесспорно наиболее привлекательным объектом исследований, направленных на обнаружение предикторов гипоксии, представляется кровь, являющаяся основным путем переноса кислорода от легких к тканям и транспорта углекислого газа в обратном направлении. При любых вызовах внешней среды, в том числе и при гипоксии, клетки эритроидного ряда, изменяясь в числе, размерах, содержании кислорода и др., продолжают выполнять свои специфические функции. В условиях гипоксии лейкоциты, большую часть которых у мелких лабораторных грызунов составляют нейтрофилы, активизируются. Определено, что одним из активаторов лейкоцитов является HIF-1 α , который играет решающую роль в регуляции клеточных ответов на гипоксию. Активированные лейкоциты могут влиять на коагуляцию напрямую, продуцируя прокоагулянтные и антикоагулянтные молекулы, и/или косвенно, воздействуя на тромбоциты и эндотелиальные клетки. Появление большого количества активированных лейкоцитов способно замедлять движение эритроцитов, стать непосредственной причиной закупорки микрососудов и снижения эффективности транспортировки кислорода кровью, что провоцирует гипоксию в микроциркуляции [17, 18].

Мы предположили, что анализ показателей клеточных элементов крови в предгипоксическом периоде позволит установить предикторы устойчивости к острой гипоксической гипоксии. Поэтому целью настоящего исследования явилось изучение клеточного состава и коагуляционной системы периферической крови крыс Вистар до и после тестирования в барокамере с последующим выделением ряда показателей в виде предикторов, позволяющих разделить популяцию животных по признаку толерантности к гипоксии.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводили на 40 крысах-самцах Вистар (филиал “Столбовая” Научного центра биомедицинских технологий Федерального медицинского-биологического агентства России) с массой тела 180–200 г.

Все экспериментальные процедуры выполняли в соответствии с директивой Европейского парламента 2010/63/EU “О защите животных, используемых в экспериментальных целях” (от 22.09.2010 г.). На проведение работы было получено разрешение биоэтической комиссии ФГБНУ “Научно-исследовательский институт морфологии человека” (протокол № 20 от 12 марта 2019 г.).

Животных, прошедших карантин не менее 14 дней, содержали в стандартных условиях вивария, рассаживая в клетки по 10 особей случайным образом, при естественном освещении, температуре 20–22°C. Доступ к воде и полноценному грану-

лированному корму (ГОСТ 34566-2019) был свободным.

Персонафицированную устойчивость животных к гипоксии определяли, моделируя острую гипоксическую гипоксию при помощи барокамеры. Для достижения сходства условий регистрации, ее проводили в утренние часы (с 9 до 11 ч), а также учитывали фазу инфрадианных биоритмов – многодневных периодически повторяющихся изменений характера и интенсивности биологических процессов, колебаний различных показателей животных и человека, по нашим данным, в основном 4-суточных, проводя тестирование между акрофазой и батифазой – наибольшими и наименьшими значениями показателей уровня кортикостерона, локомоторной активности и др. [9, 19].

Создаваемое в барокамере разрежение воздуха соответствовало “подъему на высоту” 11 500 м над уровнем моря. “Подъем” осуществляли со скоростью 80 м/с. К высокоустойчивым к гипоксии относили крыс, время потери позы которых (время от момента окончания “подъема” до принятия животным бокового положения) “на высоте” составляло более 9 мин, к низкоустойчивым – менее 3 мин, к среднеустойчивым – более 3 мин, но менее 9 мин [20].

Забор периферической крови из хвостовой вены производили под золотиловым наркозом (5 мг/100 г, Virbac Sante Animale, Франция) в пробирки с ЭДТА в качестве антикоагулянта за сутки до моделирования острой гипоксической гипоксии и через 5–10 м после. Используя автоматический гематологический анализатор Mindray BC-2800 Vet (Китай) с программным обеспечением Rat, проводили количественное определение форменных элементов крови по 18 параметрам (WBC, Lymph#, Mon#, Gran#, Lymph%, Mon%, Gran%, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, RDW, PLT, MPV, PDV, RTC). Показатели коагуляционного гемостаза определяли, используя полуавтоматический анализатор гемостаза модели KC4 Delta (Tcoag, Ирландия). Концентрацию кортикостерона в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа с использованием набора реагентов (IBL, Германия).

Статистический анализ данных проводили с помощью программы Statistica 8.0. Характер распределения признаков оценивали по критерию Шапиро–Уилка. Было установлено, что эмпирическое распределение полученных нами данных отличается от нормального. Для статистической обработки использовали непараметрический метод парных сравнений – U-критерий Манна–Уитни T-критерий Уилкоксона–Манн–Уитни. Результаты выражали в виде медианы и интерквартильного размаха (Me (25–75%)). Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

Таблица 1. Гематологические показатели высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии крыс до и после тестирования в барокамере (Б), Ме (25–75%)

Фено- типы	Условия	(RBC) Абсолютное количество эритро- цитов $\times 10^{12}/л$	(RTC) Рети- кулоциты, % от RBC	(MCH) Среднее содержание гемоглобина в RBC, пг	(WBC) Абсолютное количество лейко- цитов, $\times 10^9/л$	(Gran#) Абсолютное количество грануло- цитов, $\times 10^9/л$
ВУ (1)	До Б (3)	9.2 (4.7–11.7) $p_{1-2} < 0.001$ $p_{3-4} < 0.001$	3.2 (1.8–4.4) $p_{1-2} < 0.001$ $p_{3-4} < 0.001$	20.1 (19.7–21.2) $p_{1-2} < 0.001$ $p_{3-4} < 0.001$	8.8 (4.3–12.9) $p_{1-2} < 0.001$ $p_{3-4} < 0.001$	2.9 (2.3–3.6) $p_{1-2} < 0.001$ $p_{3-4} > 0.05$
	После Б (4)	12.3 (9.2–13.9) $p_{1-2} < 0.001$	9.2 (5.1–12.6) $p_{1-2} < 0.001$	22.1 (21.8–31.1) $p_{1-2} < 0.001$	13.1 (8.8–16.6) $p_{1-2} < 0.001$	5.1 (3.3–6.1) $p_{1-2} < 0.001$
НУ (2)	До Б (5)	6.4 (3.9–9.3) $p_{5-6} < 0.001$	1.7 (0.8–2.6) $p_{5-6} < 0.001$	19.1 (18.5–19.7) $p_{5-6} > 0.05$	19.2 (11.9–29.8) $p_{5-6} < 0.001$	3.7 (3.8–4.6) $p_{5-6} < 0.001$
	После Б (6)	8.5 (5.9–11.9)	4.8 (1.6–5.2)	19.9 (18.9–21.5)	36.6 (22.9–54.7)	7.4 (5.9–8.9)

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ всех параметров крови с дифференциацией субпопуляций клеточных элементов позволил установить статистически значимые отличия между низкоустойчивыми (НУ), высокоустойчивыми (ВУ) и среднеустойчивыми (СУ) к гипоксии крысами только по пяти параметрам: абсолютному количеству лейкоцитов, гранулоцитов, эритроцитов, проценту ретикулоцитов от общего числа эритроцитов и среднему содержанию гемоглобина в эритроците. Как видно из представленных в табл. 1 данных, у ВУ крыс значения абсолютного количества эритроцитов, процента ретикулоцитов и среднего содержания гемоглобина в эритроците были статистически значимо выше, чем у НУ животных (в 1.4, 1.9 и 1.1 раза соответственно) как до, так и после тестирования в барокамере (табл. 1). В этих же условиях показатели абсолютного количества лейкоцитов и гранулоцитов у ВУ особей оказались гораздо ниже, чем у НУ крыс (табл. 1). Так, если в

норме количество лейкоцитов у ВУ особей было ниже в 2.2 раза, а гранулоцитов – в 1.3 раза, то после тестирования в барокамере различия составляли 2.8 и 1.5 раза соответственно (табл. 1). В целом сразу после тестирования крыс в барокамере наблюдалось увеличение всех исследуемых параметров клеток крови у всех животных (табл. 1). Значения показателей СУ крыс были выше НУ животных, но ниже ВУ особей. Многие измеряемые гематологические показатели СУ крыс не имели статистически значимых отличий как от НУ, так и ВУ животных, в связи с этим мы не стали приводить их значения в таблице.

Ввиду разброса амплитуд и единиц измерения изучаемых нами показателей крови Нагорневым и соавт. была разработана формула индекса устойчивости к гипоксии (ИУГ) на основе формулы для интегративной оценки функциональных резервов организма [21]:

$$\text{ИУГ} = 1 / \sqrt{\left(\frac{\Delta \text{АКЭ}}{\text{АКЭфон}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta \text{СГЭ}}{\text{СГЭфон}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta \text{ПРЭ}}{\text{ПРЭфон}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta \text{АКЛ}}{\text{АКЛфон}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta \text{АКГ}}{\text{АКГфон}}\right)^2}$$

где Δ – прирост вычисляемых показателей крови по сравнению со средним значением в исследуемой группе, фон – среднее значение вычисляемых показателей крови в исследуемой группе, АКЭ – абсолютное количество эритроцитов, СГЭ – среднее содержания гемоглобина в эритроците, ПРЭ – процент ретикулоцитов от общего числа эритроцитов, АКЛ – абсолютное количество лейкоцитов, АКГ – абсолютное количество гранулоцитов.

Было установлено, что в норме ИУГ низкоустойчивых крыс характеризуются значениями, равными, или ниже 0.203, высокоустойчивых – равными или выше 0.335, а среднеустойчивых – ниже 0.335, но выше 0.203.

Важнейшим доказательством того, что абсолютное количество лейкоцитов, гранулоцитов, эритроцитов, процент ретикулоцитов от общего числа эритроцитов, а также среднее содержание гемоглобина в эритроците могут являться предикторами

Таблица 2. Показатели коагуляционного гемостаза и уровня кортикостерона у высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии крыс до и после тестирования в барокамере (Б), Ме (25–75%)

Фенотипы	Условия	АЧТВ, сек	ТВ, сек	ПВ, сек	Фибриноген, г/л	Кортикостерон, нг/мл
ВУ (1)	До Б (3)	17.3 (15.9–18.3) $p_{1-2} > 0.05$ $p_{3-4} > 0.05$	38.4 (32.9–44.1) $p_{1-2} > 0.05$ $p_{3-4} > 0.05$	18.6 (17.9–19.2) $p_{1-2} > 0.05$ $p_{3-4} > 0.05$	2.3 (2.1–2.4) $p_{1-2} > 0.05$ $p_{3-4} < 0.001$	255.6 (226.2–286.7) $p_{1-2} > 0.05$ $p_{3-4} < 0.001$
	После Б (4)	16.4 (12.7–17.5) $p_{1-2} < 0.001$	34.6 (33.3–37.1) $p_{1-2} < 0.001$	18.3 (17.6–19.3) $p_{1-2} < 0.001$	2.5 (2.2–2.7) $p_{1-2} < 0.001$	425.3 (361.4–489.2) $p_{1-2} > 0.05$
НУ (2)	До Б (5)	15.6 (11.5–18.4) $p_{5-6} < 0.001$	36.7 (31.8–40.9) $p_{5-6} < 0.001$	17.9 (16.5–19.1) $p_{5-6} < 0.001$	2.3 (2.1–2.7) $p_{5-6} < 0.001$	250.3 (227.5–267.9) $p_{5-6} < 0.001$
	После Б (6)	10.3 (8.5–12.1)	21.8 (19.8–24.4)	14.7 (13.7–16.1)	3.7 (3.4–4.1)	436.4 (335.1–531.6)

толерантности крыс к гипоксии, было тестирование животных в барокамере. Нами обнаружено, что при “подъеме до высоты” 11 500 м время до потери позы НУ крыс было менее 4 мин. Отмечено, что почти во всех случаях НУ животные начинали метаться по барокамере, не достигая уровня предельной “высоты”, у некоторых из них начинались признаки проявления судорог, 3 крысы умерли после тестирования. СУ животные выдерживали максимальную “высоту” не более 9 мин. Поведение этих крыс характеризовалось беспокойством и энергичными побегками в начале достижения максимального уровня, успокаиваясь через 4–5 мин. ВУ особи отличались выраженным спокойствием и способностью пребывать на “высоте” 11 500 м более 9 мин. Всего в популяции из 40 крыс 30% оказалось ВУ, 40% – НУ и 30% – СУ. Необходимо подчеркнуть, что индивидуальные признаки толерантности к гипоксии ВУ, СУ и НУ крыс, определяемые при тестировании в барокамере, совпали по значениям ИУГ в норме (до тестирования).

Такие компоненты крови, как лейкоциты, в частности гранулоциты, вносят значительный вклад в состояние гемостаза, который оказывает серьезное влияние на транспорт и утилизацию кислорода тканями и, соответственно, на толерантность к гипоксии [22–24]. В связи с этим мы изучали коагуляционный гемостаз у крыс до и после тестирования в барокамере.

Обнаружено, что в норме значения исследуемых показателей гемостаза не имели статистически значимых различий между показателями ВУ, и НУ и СУ крыс, тогда как после тестирования в барокамере значения АЧТВ, ТВ и ПВ снижались, а уровня фибриногена – повышались (табл. 2). Показано, что для НУ животных характерны наименьшие значения АЧТВ, ТВ и ПВ и наибольшие – уровня фибриногена (табл. 2).

Уровни кортикостерона, определяемые в сыворотке крови в норме и после тестирования крыс в барокамере, не имели статистически значимых отличий между животными с различной толерантностью к гипоксии (табл. 2). Безусловно, содержание кортикостерона существенно повышалось после барокамеры, как и в любом случае острого стресса [25] (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Оценивая в настоящем исследовании клеточный состав периферической крови крыс Вистар в период, предшествующий гипоксическому воздействию и после него, установлено, что показатели абсолютного количества лейкоцитов, гранулоцитов, эритроцитов, процент ретикулоцитов от общего числа эритроцитов, а также среднее содержание гемоглобина в эритроците могут быть использованы в качестве предикторов устойчивости к гипоксии. По сравнению с НУ крысами ВУ животные в норме характеризуются значительно более высокими показателями абсолютного количества эритроцитов, процента ретикулоцитов и среднего содержания гемоглобина в эритроците, а также более низкими значениями абсолютного количества лейкоцитов и гранулоцитов. Такие же соотношения всех указанных элементов крови сохраняются и после тестирования крыс в барокамере. Полученные нами данные перекликаются со сведениями Л.А. Гридина, который установил, что гипоксия, как специфический стимулятор эритропоэза, активизирует механизмы, приводящие к компенсаторному, адаптационному, снижению воспроизводства клеток белой крови в костном мозге [26]. В нашем исследовании была зарегистрирована, возможно, генетически закрепленная, повышенная мобилизационная готовность организма ВУ крыс к реакции на гипоксию, или другие стрессорные воздействия в виде механизма подавления вос-

производства клеток гранулоцитарного ряда и интенсификации приумножения клеток эритроидного ряда. Возможно, это объясняется тем, что в случае значительного преобладания лейкоцитарного звена, несмотря на его защитную функцию, может произойти катастрофа, так как гранулоциты, составляющие большую часть лейкоцитов у лабораторных грызунов, мгновенно реагируют на экстренную ситуацию выбросом большого количества токсичных для альтерирующих агентов веществ, но оказывающих негативное воздействие также и на организм хозяина. При этом может повреждаться эндотелий кровеносных сосудов, что вызывает активацию свертывающей системы. Указанные эффекты нейтрофилов, представляющих значительную часть гранулоцитарного звена популяции лейкоцитов, теперь хорошо известны при изучении их действия при заболевании COVID-19 [27, 28].

Среди причин снижения толерантности к гипоксии, повышение свертываемости крови играет значительную роль [29, 30]. В нашей работе установлено, что после пребывания в условиях острой гипоксической гипоксии, у НУ крыс наблюдалось состояние гиперкоагуляции по внутреннему (сокращение времени АЧТВ) и внешнему (сокращение протромбинового времени) пути активации свертывания крови, что усугублялось повышенным уровнем фибриногена. Причинами этого могли быть повреждение сосудистой стенки активными формами кислорода и повышенное по сравнению с ВУ количество активированных гипоксией лейкоцитов (гранулоцитов в частности), высвобождающих прокоагуляционные факторы [17, 24, 31]. Полученные нами данные согласуются с данными других исследователей [32–34]. Повышение содержания фибриногена в крови в ответ на увеличение кортикостерона в результате стресса, вероятно, являлось причиной сокращения показателя тромбинового времени, которое отражает превращение фибриногена в фибрин и зависит от количества фибриногена в крови [35].

Доказательством того, что по значениям ИУГ возможно определять индивидуальную толерантность крыс к гипоксии, было тестирование крыс в барокамере. Как известно, кроме гипоксических стимулов, на живые организмы в барокамере действуют факторы стресса. В физиологии принято выделять две качественно различающиеся тактики адаптации к неблагоприятным условиям среды, характерные для всех этапов эволюции – резидентную, характеризующуюся активным преодолением действия стрессорного фактора, и толерантную, обусловленную спокойной восприятием вмешательства раздражителя. Эти тактики обслуживаются различными нейроиммуноэндокринными механизмами [36, 37]. Судя по нашим данным, в барокамере НУ крысы демонстрировали ярко выраженную резидентную тактику, которая обу-

словливалась перерасход запасов кислорода, и животные быстро утрачивали способность поддерживать позу на 4-х конечностях. В то время как ВУ крысы характеризовались толерантной тактикой, которая способствовала длительной экономии расходов кислорода. СУ крысы демонстрировали смену этих тактик, что детерминировало промежуточные между ВУ и НУ результаты времени сохранения позы. Считается, что так же, как и толерантность к гипоксии, проявление тактик поведения закреплено генетически [37, 38]. В наших предыдущих работах на крысах Вистар было показано, что использование умеренной физической нагрузки в виде плавания позволяет добиться выработки толерантного поведения у большей части популяции. Одновременно с этим, удалось установить, что животные, усвоившие толерантную тактику поведения, становились ВУ, а не обучившиеся остались НУ. Учитывая сведения о том, что толерантность к гипоксии закреплена генетически, а СУ особи, вероятнее всего, устойчивы к гипоксии, то можно полагать, что к ВУ особям примкнули СУ, усвоившие толерантную тактику как основной принцип поведения. Проведенные исследования дают основание для постановки проблемы включения поведенческих механизмов в интегративный ответ организма животных и человека на острую гипоксию.

Таким образом, в проведенном исследовании зарегистрирована, возможно, генетически закреплённая, повышенная мобилизационная готовность организма ВУ крыс к реакции на гипоксию в виде механизма подавления воспроизводства клеток белой крови и усиления эритропоэза, а также определены предикторы толерантности к гипоксии: абсолютное количество лейкоцитов, гранулоцитов, эритроцитов, процент ретикулоцитов от общего числа эритроцитов. Разработана формула для вычисления индекса устойчивости к гипоксии (ИУГ), позволяющая произвести разделение популяции крыс на ВУ, НУ и СУ без использования тестирования в барокамере. Установлено, что ИУГ низкоустойчивых крыс характеризуются значениями, равными или ниже 0.203, высокоустойчивых – выше 0.335, а среднеустойчивых – ниже 0.335, но выше 0.203. Прогнозирование индивидуальной устойчивости лабораторных животных к гипоксии в предгипоксическом периоде представляет интерес как с теоретической, так и с практической точек зрения, поскольку в ситуации острой гипоксической гипоксии происходит повреждение ЦНС, возможна гибель животных, а для выживших особей при проведении дальнейших исследований требуется длительное (не менее 1 мес) восстановление организма. Выявление взаимосвязи тех или иных физиологических показателей в предгипоксическом периоде с уровнем гипоксической устойчивости позволяет улучшить точность прогноза об исходе острого гипоксического воздей-

ствия, что имеет важное значение для представителей профессий, деятельность которых связана с риском развития гипоксических состояний. Кроме того, это важно для поиска терапевтических мишеней при моделировании различных заболеваний человека с целью разработки персонализированного подхода к лечению.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБНУ «НИИ морфологии человека» АААА-А19-119021490067-4.

ВКЛАД АВТОРОВ

М.В. Кондашевская осуществляла планирование, сбор данных, написание статьи. К.А. Артемьева, В.В. Алексанкина и Н.Б. Тихонова осуществляли техническую поддержку при проведении экспериментов, участвовали в обработке и обсуждении экспериментальных данных. М.Н. Болтовская участвовала в обработке и обсуждении экспериментальных данных, осуществляла редактирование статьи.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Настоящая статья не содержит результатов каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Semenza G.L.* (2014) Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology. *Annu Rev Pathol* 9: 47–71. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012513-104720>
2. *Luks A.M., Swenson E.R., Bärtzsch P.* (2017) Acute high-altitude sickness. *Eur Respir Rev* 26 (143): 160096. <https://doi.org/10.1183/16000617.0096-2016>
3. *Multhoff G., Vaupel P.* Hypoxia Compromises Anti-Cancer Immune Responses. *Adv Exp Med Biol.* 2020; 1232: 131–143. https://doi.org/10.1007/978-3-030-34461-0_18
4. *Chen Y.C., Ho C.W., Tsai H.H., Wang J.S.* (2015) Interval and continuous exercise regimens suppress neutrophil-derived microparticle formation and neutrophil-promoted thrombin generation under hypoxic stress. *Clin Sci (Lond)* 128 (7): 425–436. <https://doi.org/10.1042/CS20140498>
5. *McGarry T., Biniiecka M., Veale D.J., Fearon U.* (2018) Hypoxia, oxidative stress and inflammation. *Free Radic Biol Med* 125: 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.042>
6. *Gonzalez N.C., Wood J.G.* (2010) Alveolar hypoxia-induced systemic inflammation: what low PO(2) does and does not do. *Adv Exp Med Biol* 662: 27–32. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1241-1_3
7. *Дремина Н.Н., Шурыгин М.Г., Шурыгина И.А.* (2016) Эндотелины в норме и патологии. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. Медицинские науки. INTERNATIONAL JOURNAL OF APPLIED AND FUNDAMENTAL RESEARCH. MEDICAL SCIENCES.* 10: 210–214 [Dremina N.N., Shurygin M.G., Shurygina I.A. (2016) Endothelins in standard and pathology. *International Journal of Applied and Fundamental Research. Medical sciences. INTERNATIONAL JOURNAL OF APPLIED AND FUNDAMENTAL RESEARCH. MEDICAL SCIENCES* 10: 210–214. (In Russ.)]
8. *Ржепецкая М.К.* (2017) Генетические маркеры как показатель устойчивости человека к различным эколого-профессиональным факторам. *Известия Российской Военно-медицинской академии.* 36 (4): 6–13. [Rzhepetskaya M.K. (2017) Genetic markers as an indicator of human resistance to various environmental and occupational factors. *Proceedings of the Russian Military Medical Academy* 36 (4): 6–13. (In Russ.)]
9. *Dzhalilova D.S., Kosyreva A.M., Diatropov M.E., Makarova O.V.* (2017) Relationship between Hypoxic Resistance and the Phase of 4-Day Corticosterone Biorhythm in Adult Male Rats. *Bull Exp Biol Med* 163: 687–690. <https://doi.org/10.1007/s10517-017-3879-7>
10. *Pavlik L.L., Mikhieva I.B., Al'-Mugkhrabi Y.M., Berest V.P., Kirova Y.I., Germanova E.L., Luk'yanova L.D., Mironova G.D.* (2018) 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.* 164 (3): 376–381. <https://doi.org/10.1007/s10517-018-3993-1>
11. *Каркищенко Н.Н.* (2017) Биомедицинское (доклиническое) изучение антигипоксической активности лекарственных средств. *Методические рекомендации.* М. ФМБА России [Karkishchenko N.N. (2017) *Biomedicinskoe (doklinicheskoe) izuchenie antigipoksi-cheskoj aktivnosti lekarstvennyh sredstv. Metodicheskie rekomendacii* [Biomedical (preclinical) study of antihypoxic activity of drugs. *Methodological recommendations*]. М. FMBA of Russia (In Russ.)]
12. *Байбурина Г.А., Нургалеева Е.А., Дроздова Г.А.* (2016) Влияние экстремальной гипоксии на гормональный профиль и динамику свободнорадикальных процессов в головном мозге крыс с различным фенотипом устойчивости к гипоксии. *Здоровье и образование в XXI веке.* 18 (6): 95–98. [Baiburina G.A., Nurgalieva E.A., Drozdova G.A. (2016) Influence of extreme hypoxia on the hormonal profile and dynamics of free radical processes in the brain of rats with different phenotypes of resistance to hypoxia. *Health and education in the XXI century.* 2016; 18 (6): 95–98 (In Russ.)]
13. *Hirai K., Furusho H., Hirota K., Sasaki H.* (2018) Activation of hypoxia-inducible factor 1 attenuates periapical inflammation and bone loss. *Int J Oral Sci.* 10 (2): 12. <https://doi.org/10.1038/s41368-018-0015-0>

14. Brooks J.T., Elvidge G.P., Glennly L., Gleadle J.M., Liu C., Ragoussis J., Smith T.G., Talbot N.P., Winchester L., Maxwell P.H., Robbins P.A. (2009) Variations within oxygen-regulated gene expression in humans. *J Appl Physiol* (1985). 106 (1): 212–220.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.90578.2008>
15. van Patot M.C., Gassmann M. (2011) Hypoxia: adapting to high altitude by mutating EPAS-1, the gene encoding HIF-2a. *High Alt Med Biol.* 12 (2): 157–167.
<https://doi.org/10.1089/ham.2010.1099>
16. Kabei K., Tateishi Y., Shiota M., Osada-Oka M., Nishide S., Uchida J., Nakatani T., Matsunaga S., Yamaguchi T., Tomita S., Miura K. (2020) Effects of orally active hypoxia inducible factor alpha prolyl hydroxylase inhibitor, FG4592 on renal fibrogenic potential in mouse unilateral ureteral obstruction model. *J Pharmacol Sci.* 142 (3): 93–100.
<https://doi.org/10.1016/j.jphs.2019.12.002>
17. Gaertner F., Massberg S. (2016) Blood coagulation in immunothrombosis—At the frontline of intravascular immunity. *Semin Immunol* 28 (6): 561–569.
<https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.10.010>
18. Tikhomirova I., Petrochenko E., Malysheva Y., Ryabov M., Kislov N. (2016) Interrelation of blood coagulation and hemorheology in cancer. *Clin Hemorheol Microcirc* 64 (4): 635–644.
<https://doi.org/10.3233/CH-168037>
19. Kondashevskaya M.V., Diatroptov M.E. (2013) Behavioral Characteristics of Ovariectomized Wistar Rats Trained in a Maze. Effect of Mental Stress and Castration for Infra-dian Rhythms. *Bull Exp Biol Med* 155: 272–276.
<https://doi.org/10.1007/s10517-013-2130-4>
20. Dzhililova D.S., Kosyreva A.M., Diatroptov M.E., Makarova M.A., Makarova O.V. (2019) Liver and lung morphology and phagocytic activity of peripheral blood cells during systemic inflammatory response in male rats with different resistance to hypoxia. *Clin Exp Morphol* 29: 47–55. (In Russ.). <https://doi.org/31088/2226-5988-2019-29-1-47-55>
21. Нагорнев С.Н., Бобровницкий И.П., Хрипач Л.В., Худов В.В. (2017) Иммуно-биохимический скрининг и метаболические нагрузочные тесты в оценке функциональных резервов организма. *Russian Journal of Rehabilitation Medicine* 2: 3–38 [Nagornev S.N., Bobrovnikitsky S.P., Khripach L.V., Khudov V.V. (2017) Immuno-biochemical screening and metabolic load tests in the assessment of functional reserves of the body. *Russian Journal of Rehabilitation Medicine* 2: 3–38 (In Russ.)]
22. Finsterbusch M., Schrottmaier W.C., Kral-Pointner J.B., Salzmann M., Assinger A. (2018) Measuring and interpreting platelet-leukocyte aggregates. *Platelets* 29: 677–685.
<https://doi.org/10.1080/09537104.2018.1430358>
23. Lodge K.M., Cowburn A.S., Li W., Condliffe A.M. (2020) The Impact of Hypoxia on Neutrophil Degranulation and Consequences for the Host. *Int J Mol Sci* 21: 1183.
<https://doi.org/10.3390/ijms21041183>
24. Egners A., Erdem M., Cramer T. (2016) The Response of Macrophages and Neutrophils to Hypoxia in the Context of Cancer and Other Inflammatory Diseases. *Mediators Inflamm.* Article ID 2053646.
<https://doi.org/10.1155/2016/2053646>
25. Obornikhin S.S., Yaglova N.V., Nazimova S.V., Yaglov V.V., Timokhina E.P. (2019) Transcriptional regulation of morphogenesis of rat adrenal zona glomerulosa during post-natal development. *Clin Exp Morphol.* 8: 48–54. (In Russ.).
<https://doi.org/10.31088/2226-5988-2019-30-2-48-54>
26. Грдин Л.А. (2016) Современные представления о физиологических и лечебно-профилактических эффектах действия гипоксии и гиперкапнии. *Журнал “Медицина”* 3: 45–68 [Gridin L.A. (2016) Modern ideas about the physiological and therapeutic and preventive effects of hypoxia and hypercapnia. *Journal of Medicine* 3: 45–68 (In Russ.)]
27. Lv D., Xu Y., Cheng H., Ke Y., Zhang X., Ying K. (2020) A novel cell-based assay for dynamically detecting neutrophil extracellular traps-induced lung epithelial injuries. *Exp Cell Res.* 394:112101.
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.112101>
28. Colling M.E., Kanthi Y. (2020) COVID–19-associated coagulopathy: An exploration of mechanisms. *Vasc Med* 25: 471–478.
<https://doi.org/10.1177/1358863X20932640>
29. Shang C., Wuren T., Ga Q., Bai Z., Guo L., Eustes A.S., McComas K.N., Rondina M.T., Ge R. (2020) The human platelet transcriptome and proteome is altered and prothrombotic functional responses are increased during prolonged hypoxia exposure at high altitude. *Platelets* 31:33–42.
<https://doi.org/10.1080/09537104.2019.1572876>
30. Viecca M., Radovanovic D., Forleo G.B., Santus P. (2020) Enhanced platelet inhibition treatment improves hypoxemia in patients with severe Covid-19 and hypercoagulability. A case control, proof of concept study. *Pharmacol Res* 158: 104950.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104950>
31. Li X., Yang Y., Liu L., Yang X., Zhao X., Li Y., Ge Y., Shi Y., Lv P., Zhang J., Bai T., Zhou H., Luo P., Huang S. (2020) Effect of combination antiviral therapy on hematological profiles in 151 adults hospitalized with severe coronavirus disease 2019. *Pharmacol Res* 160: 105036.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105036>
32. Tyagi T., Ahmad S., Gupta N., Sahu A., Ahmad Y., Nair V., Chatterjee T., Bajaj N., Sengupta S., Ganju L., Singh S.B., Ashraf M.Z. (2014) Altered expression of platelet proteins and calpain activity mediate hypoxia-induced prothrombotic phenotype. *Blood* 123 (8): 1250–60.
<https://doi.org/10.1182/blood-2013-05-501924>
33. O’Brodoovich H.M., Andrew M., Gray G.W., Coates G. (1984) Hypoxia alters blood coagulation during acute decompression in humans. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol.* 56 (3): 666–670.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.1984.56.3.666>
34. Bärtsch P., Haerberli A., Hauser K., Gubser A., Straub P.W. (1988) Fibrinogenolysis in the absence of fibrin formation in severe hypobaric hypoxia. *Aviat Space Environ Med.* 59 (5): 428–432.
35. Atencio A.C., Chao P.Y., Chen A.Y., Reeve E.B. (1969) Fibrinogen response to corticotropin preparations in rabbits. *Am J Physiol.* 216 (4): 773–780.
<https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1969.216.4.773>
36. Цейликман В.Э., Цейликман О.Б., Сеницкий А.И., Лавин Е.А., Лантева И.А., Горностаева А.Б., Борисенков А.В., Нусратов М.И., Романов Д.А. (2008)

- Биохимические стратегии адаптации в условиях хронического стресса. Вестник ЮУрГУ 4: 56–57 [Tseilikman V.E., Tseilikman O.B., Sinitsky A.I., Levin E., Lapteva I.A., Gornostaeva A.B., Borisenkov A.B., Nusratov M.I., Romanov D.A. (2008) Biochemical strategies of adaptation in conditions of chronic stress. Bulletin of South Ural State University 4: 56–57 (In Russ.)].
37. Байбурина Г.А., Нургалева Е.А., Никитина И.Л., Булыгин К.В., Самигуллина А.Ф., Аглетдинов Э.Ф. (2017) Взаимосвязи уровней циркулирующего кортикостерона, экспрессии центральных кортикостероидных рецепторов и изменения поведенческой активности крыс с разной устойчивостью к гипоксии в динамике восстановления после экстремальной гипоксии. Современные проблемы науки и образования. 4: 36 [Baiburina G.A., Nurgaleeva E.A., Nikitina I.L., Bulygin K.V., Samigullina A.F., Agletdinov E.F. (2017) The relationship between the levels of circulating corticosterone, the expression of central corticosteroid receptors, and changes in the behavioral activity of rats with different resistance to hypoxia in the dynamics of recovery after extreme hypoxia. Modern problems of science and education. 4: 36]
38. Perez-Tejada J., Garmendia L., Labaka A., Vegas O., Gómez-Lazaro E., Arregi A. (2019) Active and Passive Coping Strategies: Comparing Psychological Distress, Cortisol, and Proinflammatory Cytokine Levels in Breast Cancer Survivors. Clin J Oncol Nurs. 23 (6): 583–590. <https://doi.org/10.1188/19.CJON.583-590>

INDICATORS OF HYPOXIA TOLERANCE ARE DETERMINED BY THE CELLS OF RAT BLOOD

M. V. Kondashevskaya^{a,#}, K. A. Artemieva^a, V. V. Aleksankina^a,
N. B. Tikhonova^a, and M. N. Boltovskaya^a

^a A. P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

[#]e-mail: marinavladi2177@yandex.ru

Even though hypoxia tolerance is mainly determined genetically, the research of the individual variability in the tolerance to hypoxia is important. In this study, we investigated the numbers of circulating blood cells and the coagulation system in Wistar rats as predictors that allow splitting the animal population between hypoxia tolerant and non-tolerant. The proof of the choice of reasonable predictors was the matching population split in accordance with detected individual parameters and the results of testing in a pressure chamber with rarefied air corresponding to the altitude of 11 500 m above the sea level. The quantitative assessment of circulating blood cells was performed according to eighteen parameters before and after hypoxic exposure. The differences between low-tolerant (LT), high-tolerant (HT) and medium-tolerant (MT) animals to hypoxia were identified by five parameters: white blood cell counts (WBC), granulocyte counts (Gran#), red blood cell counts (RBC), % reticulocyte (RTC) and mean corpuscular hemoglobin (MCH). The values of RBC, RTC, and MCH in HT rats were significantly higher than in LT animals (by 1.4, 1.9, and 1.1 times, respectively). The values of WBC and Gran# in HT rats were lower than in LT individuals. The hypoxia tolerance index (HTI) was calculated using the original formula. It was found that HTI in LT rats is ≤ 0.203 , in HT rats ≥ 0.335 , and in MT rats < 0.335 but > 0.203 . The activated partial thromboplastin time (APTT), the thrombin time (TT), and the prothrombin time (PT) decreased, but the fibrinogen level increased after testing in a pressure chamber. LT rats were characterized by the lowest values of APTT, TT, and PT and the highest values of the fibrinogen level. As a result of the study, it was determined that one of the most important mechanisms causing a high tolerance to hypoxia is the maintenance mechanism of reciprocal relationships between the complex of the RBC indicators, which tend to increase with hypoxia, and the indicators of granulocytes, which are characterized by a decrease.

Keywords: hypoxia tolerance, blood cells, Wistar rats, coagulogram