

УДК 616-002-008.953-092

DOI: <https://doi.org/10.17816/rmmar456457>

Научная статья

К вопросу о противовоспалительных эффектах глюкокортикостероидов при экспериментальном остром повреждении легких

Н.И. Волошин¹, Ю.А. Замиралова¹, В.А. Пугач², В.В. Салухов¹, М.А. Тюнин², М.А. Харитонов¹,
И.А. Одинцова¹, П.А. Слизов¹, А.А. Минаков¹, Д.Р. Слуцкая¹

¹ Военно-медицинская академия, Санкт-Петербург, Россия;

² Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Цель исследования. Исследование влияния различных доз дексаметазона как модулятора воспаления при экспериментальном липополисахарид-индуцированном остром повреждении легких у крыс.

Материалы и методы. Острое повреждение легких у крыс моделировали посредством интратрахеального введения липополисахарида клеточной стенки бактерии *Salmonella enterica*. Белые крысы-самцы были разделены на группу интактных животных ($n = 10$); контрольную группу ($n = 40$), в которой животным моделировали острое повреждение легких без дальнейшего лечения и выводили из эксперимента на 3-и сут; 3 опытные группы ($n = 40$), в которых через 3 ч после моделирования острого повреждения легких, а затем ежедневно 1 раз в день в течение 3 сут применяли внутривенно раствор дексаметазона в следующих дозах: в группе 1 — 0,52 мг/кг (эквивалентно 6,0 мг/сут для человека); в группе 2 — 1,71 мг/кг (20,0 мг/сут для человека); в группе 3 — 8,0 мг/кг (94,0 мг/сут, пульс-терапия для человека). На 3-и сут у выживших животных отбирали пробы крови из каудальной полой вены для проведения клинического анализа и оценки функции митохондрий лейкоцитов периферической крови. Для определения степени выраженности местных воспалительных реакций и отека легких проводили бронхоальвеолярное лаважирование с исследованием эндопульмональной цитограммы и оценку патоморфологических изменений в легочной ткани.

Основные результаты работы свидетельствуют, что дексаметазон уменьшает объем повреждения легочной ткани и летальность животных, дозозависимо снижает функции митохондрий и количество лимфоцитов и моноцитов в периферической крови, а также нейтрофилов, лимфоцитов и макрофагов в пробах бронхоальвеолярного лаважа.

Заключение. Применение дексаметазона в дозе 0,52 мг/кг (эквивалент 6,0 мг/сут для человека) сопровождается лучшей выживаемостью, минимальным влиянием на жизнеспособность и функциональную активность клеток воспаления. Пульс-терапия приводит к значимому уменьшению количества иммунокомпетентных клеток в бронхоальвеолярном лаваже, митохондриальной дисфункции в виде снижения способности этих клеток использовать резервную мощность митохондриального дыхания в ответ на действие стрессового фактора. Избыточное угнетение иммунокомпетентных клеток может способствовать активации латентных и оппортунистических инфекций, что необходимо учитывать при выборе режима дозирования глюкокортикостероидов.

Ключевые слова: Agilent seahorse XF; биомоделирование; бронхоальвеолярный лаваж; глюкокортикостероиды; митохондриальная дисфункция; острое повреждение легких.

Как цитировать:

Волошин Н.И., Замиралова Ю.А., Пугач В.А., Салухов В.В., Тюнин М.А., Харитонов М.А., Одинцова И.А., Слизов П.А., Минаков А.А., Слуцкая Д.Р. К вопросу о противовоспалительных эффектах глюкокортикостероидов при экспериментальном остром повреждении легких // Известия Российской Военно-медицинской академии. 2023. Т. 42. № 2. С. 167–176. DOI: <https://doi.org/10.17816/rmmar456457>

DOI: <https://doi.org/10.17816/rmmar456457>

Research Article

Focus on the anti-inflammatory effect of glucocorticosteroids in experimental acute lung injury

Nikita I. Voloshin¹, Yuliya A. Zamiralova¹, Victoriya A. Pugach², Vladimir V. Saluhov¹, Mikhail A. Tyunin², Mikhail A. Kharitonov¹, Irina A. Odintsova¹, Pavel A. Slizhov¹, Aleksey A. Minakov¹, Dina R. Slutskaia¹

¹ Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia;

² State Scientific Research Test Institute of the Military Medicine, Saint Petersburg, Russia

AIM: Assessment of the effect of various doses of dexamethasone as an inflammation modulator in experimental lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats.

MATERIALS AND METHODS: Acute lung injury in rats was modeled by intratracheal administration of cell wall lipopolysaccharide from the *Salmonella enterica*. White male rats were divided into groups: a group of intact animals ($n = 10$); the control group ($n = 40$), in which the animals were simulated acute lung injury without further treatment and removed from the experiment on day 3; three experimental groups ($n = 40$), in which, 3 hours after modeling acute lung injury, and then daily once a day for 3 days, dexamethasone solution was administered intraperitoneally in the following doses: in group 1 — 0.52 mg/kg (equivalent to 6.0 mg/day for a person), in group 2 — 1.71 mg/kg (20.0 mg/day for a person), in group 3 — 8.0 mg/kg (94.0 mg/day, pulse therapy for humans). On the 3rd day, blood samples were taken from the caudal vena cava in surviving animals for clinical analysis and evaluation of the function of mitochondria of peripheral blood leukocytes. To determine the severity of local inflammatory reactions and pulmonary edema, bronchoalveolar lavage was performed with the study of an endopulmonary cytogram and an assessment of pathomorphological changes in the lung tissue.

RESULTS: indicate that dexamethasone reduces the amount of lung tissue damage and animal mortality, dose-dependently reduces the functions of mitochondria and the number of lymphocytes and monocytes in peripheral blood, as well as neutrophils, lymphocytes and macrophages in bronchoalveolar lavage samples.

CONCLUSION: The use of dexamethasone at a dose of 0.52 mg/kg (equivalent to 6.0 mg/day for humans) is accompanied by better survival, minimal effect on the viability and functional activity of inflammatory cells. Pulse therapy leads to a significant decrease in the number of immunocompetent cells in bronchoalveolar lavage, mitochondrial dysfunction in the form of a decrease in the ability of these cells to use the reserve power of mitochondrial respiration in response to the action of a stress factor. Excessive inhibition of immunocompetent cells can contribute to the activation of latent and opportunistic infections, which must be taken into account when choosing a dosing regimen for glucocorticosteroids.

Keywords: Agilent seahorse XF; acute lung injury; biomodeling; bronchoalveolar lavage; dose-dependent effect; glucocorticosteroids; mitochondrial dysfunction.

To cite this article:

Voloshin NI, Zamiralova YuA, Pugach VA, Saluhov VV, Tyunin MA, Kharitonov MA, Odintsova IA, Slizhov PA, Minakov AA, Slutskaia DR. Focus on the anti-inflammatory effect of glucocorticosteroids in experimental acute lung injury. *Russian Military Medical Academy Reports*. 2023;42(2):167–176. DOI: <https://doi.org/10.17816/rmmar456457>

Received: 24.05.2023

Accepted: 10.06.2023

Published: 30.06.2023

АКТУАЛЬНОСТЬ

В настоящее время в медицинском научном сообществе имеются противоречивые рекомендации по поводу режимов дозирования, выбора предпочтительного препарата, времени назначения и длительности глюкокортикостероидной (ГКС) терапии при тяжелых повреждениях легких, ассоциированных с такими заболеваниями, как острый респираторный дистресс-синдром взрослых (ОРДС), новая коронавирусная инфекция (НКИ) тяжелого течения, тяжелая пневмония.

Результаты клинических исследований свидетельствуют о снижении риска смерти, в частности при ОРДС, на фоне приема низких доз ГКС и, напротив, о повышении на фоне пульс-терапии [1, 2]. Например, сравнение пульс-терапии, проводимой в течение нескольких суток, со стандартными дозами ГКС в эквиваленте 0,5–1,5 мг/кг метилпреднизолона показало повышение риска смерти на фоне пульс-терапии [1, 3].

Высокая летальность (30–65 %) пациентов с заболеваниями, сопровождающимися тяжелым поражением легких, отсутствие высокоэффективных методов лечения вызывают потребность в поиске эффективных и безопасных схем фармакологической терапии [4, 5].

Один из методов поиска оптимальных средств диагностики, лечения и профилактики ОРДС у человека — это экспериментальное биомоделирование острого повреждения легких (ОПЛ) у лабораторных животных, которое максимально приближено к клиническим проявлениям ОРДС [6]. Известно, что модель липополисахарид-индуцированного ОПЛ у лабораторных животных обладает высокой воспроизводимостью и проявляется диффузным двусторонним легочным повреждением, что в полной мере отвечает современным научно-экспериментальным требованиям [7].

ГКС, согласно современным рекомендациям, входят в состав комплексного лечения ОРДС, НКИ тяжелого течения, тяжелой пневмонии у человека, осложненной ОРДС и/или септическим шоком, а также активно исследуются с целью оценки их эффективности при лечении экспериментального ОПЛ у животных [4, 5, 8–10].

Оценка воспалительного ответа с проведением целого спектра клинических, лабораторно-инструментальных, морфологических методов исследования, на наш взгляд, позволяет дополнить представление о влиянии ГКС на организм.

Цель — исследование влияния различных доз дексаметазона как модулятора воспаления при экспериментальном липополисахарид-индуцированном остром повреждении легких у крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на 170 белых беспородных крысах-самцах (возраст: 8–10 нед, масса тела: 310–320 г). Животные содержались в условиях вивария

с соблюдением основных зоогигиенических требований: температурный режим 22–24 °С, 12-часовой световой день, свободный доступ к корму и воде. Исследование проводили в соответствии с требованиями приказа Минздрава России от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

ОПЛ моделировали посредством интратрахеального (и/т) введения ЛПС клеточной стенки бактерии *Salmonella enterica* (Sigma-Aldrich) в дозе 20 мг/кг. Перед выполнением и/т введения животных наркотизировали с помощью внутривенной (в/в) инъекции препарата «Золетил 100» в дозе 4,0 мг/кг. Процедуру и/т введения ЛПС выполняли с помощью зонда для крыс (MicroSprayer® Aerosolizer, модель IA-1B, США) через 5 мин после наркотизации животных.

Животные были разделены случайным образом на 5 групп: интактная группа ($n = 10$), контрольная группа с ОПЛ ($n = 40$) и экспериментальные группы 1–3 ($n = 10$ в каждой группе), в которых животным через 3 ч после моделирования ОПЛ по лечебной схеме (внутрибрюшинно 1 р/сут в течение 3 сут) вводили дексаметазон в дозах 0,52, 1,71 и 8,00 мг/кг соответственно. Дозы дексаметазона для введения крысам были рассчитаны с помощью методики межвидового переноса доз с учетом площади поверхности тела и были эквивалентны суточным дозам ГКС, равным 6, 20 и 94 мг для человека [11].

На 3-и сут эксперимента оценивали выживаемость крыс и после эвтаназии выживших животных из каудальной полой вены отбирали пробы крови для проведения общего анализа на автоматическом ветеринарном гематологическом анализаторе (Mythic 18 Vet, Швейцария) и оценки митохондриальной функции лейкоцитов при помощи анализатора Agilent Seahorse XF 96, США. Для этого выделяли лейкоциты и лимфоциты периферической крови, которые впоследствии были высеяны на культуральный микропланшет XF96 в количестве $1,5–2,0 \times 10^4$ клеток на лунку, затем инкубированы в течение 1 сут при температуре 37 °С в атмосфере 5 % CO₂ в среде для инкубирования клеток XF. Клетки промывали путем двукратного удаления питательной среды и замены ее небуферизованной средой с pH 7,4, после чего проводили трехкратное измерение уровня базального митохондриального дыхания. Далее последовательно в лунки с анализируемыми клетками были добавлены модуляторы дыхания: 1) ингибитор АТФ-синтазы — олигомицин; 2) протонофорный разобщитель — карбонилцианид 4 (трифторметокси)фенилгидразон; 3) ингибиторы переноса электронов — ротенон и антимицин А. На каждом этапе трехкратно измерялся уровень базального митохондриального дыхания. На основании полученных данных построены графики изменения скорости потребления кислорода лейкоцитами и лимфоцитами.

После обескровливания животного легочный комплекс извлекали и взвешивали для определения массового коэффициента (МКЛ). Пробы бронхоальвеолярной лаважной

жидкости (БАЛЖ) получали посредством трехкратной промывки правого легкого стерильным раствором фосфатно-солевого буфера в объеме 5 мл на 1 кг массы тела животного. Из осадка пробы после центрифугирования (2 раза по 15 мин, 1500 об./мин) изготавливали мазки для цитологического исследования (окраска по Романовскому–Гимзе), а также определяли общее количество клеток (Automated Cell Counter RWD C100, США). В мазках выполняли подсчет количества альвеолярных макрофагов, нейтрофильных гранулоцитов, эозинофильных гранулоцитов, лимфоцитов, эпителиальных клеток до 300 клеток суммарно, после чего определяли процентное соотношение каждой популяции и вычисляли абсолютные значения.

Левое легкое крыс разделяли на фрагменты и использовали для проведения гистологического исследования, а также оценки степени влагонасыщения.

Для гистологического анализа один фрагмент левой доли легких фиксировали в 10 % растворе формалина. Изготавливали тонкие срезы легких толщиной 5 μ m и окрашивали гематоксилином и эозином. Морфометрический анализ осуществляли с помощью светового микроскопа Carl Zeiss Scope 1A с камерой AxioCam ERc 5s и использованием морфометрической лицензионной программы ZEN 2.3. Для оценки патоморфологических изменений легких крыс изготовленные срезы были проанализированы на всей площади стереометрическим методом на увеличении $\times 63$ с наложением на каждое поле зрения сетки из 25 квадратов с подсчетом структур, попавших на их вершины. Анализ проводился по следующим параметрам: воспалительная внутри альвеолярная инфильтрация, воспалительная инфильтрация межальвеолярных перегородок, эмфизематозные участки, полнокровие, тромбозы и инфаркты.

С целью определения степени влагонасыщения второй фрагмент левого легкого взвешивали, а затем высушивали в термостате при температуре -60°C в течение 5 сут.

Для проверки гипотез, представленных в данном исследовании, проводили статистический анализ результатов в программе Graph Pad Prism 8.0. Результаты представляли в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей — $Me [Q_1; Q_3]$. Для множественного сравнения количественных переменных использовали критерий Краскела–Уоллиса с апостериорным анализом по Данну. Связь между качественными показателями (летальность) оценивали посредством построения четырехпольных таблиц сопряженности и расчета на их основе точного критерия Фишера. Статистически значимыми считали различия, при которых $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

После и/т введения ЛПС у крыс регистрировали двустороннее диффузное повреждение легких, приводящее к отеку с высокими показателями МКЛ и степени влагонасыщения, что сопровождалось гибелью 40 % контрольных

животных. Летальность животных в группах 1 (дексаметазон, 0,52 мг/кг) и 2 (дексаметазон, 1,71 мг/кг) была ниже и составила 10 и 15 % соответственно ($p = 0,0001$ и $0,003$). Летальность животных группы 3 (дексаметазон 8,0 мг/кг, пульс-терапия) равнялась 20 % и была выше, чем в контрольной группе, и ниже, чем в группах сравнения 1 и 2, однако это различие не было статистически значимым. В группах 1–3 у крыс в сравнении с контрольными животными регистрировали снижение показателей МКЛ ($p = 0,002$, $0,03$ и $0,0001$ соответственно) и степени влагонасыщения легких ($p = 0,006$, $0,04$ и $0,02$).

При исследовании показателей общего анализа крови отмечено снижение абсолютного количества лимфоцитов во всех экспериментальных группах (1–3) животных после применения дексаметазона в сравнении с контрольной группой ($p = 0,002$, $0,02$ и $0,04$). Дозозависимое уменьшение количества лимфоцитов в крови, вероятнее всего, связано с угнетением процессов лимфопоэза и апоптозом лимфоцитов под влиянием ГКС. Кроме этого, в экспериментальных группах 1–3 регистрировали увеличение абсолютного количества гранулоцитов ($p = 0,03$, $0,007$ и $0,01$) и моноцитов ($p = 0,08$, $0,007$ и $0,09$), что может быть связано с повышением мобилизации этих клеток из костного мозга, уменьшением количества рецепторов к молекулам адгезии на поверхности гранулоцитов и моноцитов, приводящим к нарушению процесса миграции в очаг воспаления [12]. Следует отметить, что общее количество лейкоцитов во всех группах животных после применения дексаметазона не отличалось от показателей контрольных животных.

Несмотря на то что в количестве эритроцитов различий между группами не было, в группах, где моделировали ОПЛ (контрольная группа, группы 1–3), концентрация гемоглобина была значимо больше, чем у интактных животных, что, вероятнее всего, обусловлено компенсаторной реакцией на гипоксемию ($p = 0,01$, $0,03$, $0,02$ и $0,008$).

Отмечали снижение количества тромбоцитов у крыс контрольной группы и у животных в группах 1–3 в сравнении с группой интактных животных ($p = 0,004$, $0,006$, $0,002$ и $0,001$), при этом максимальное снижение исследуемого показателя определяли в группе 3 (пульс-терапия) (табл. 1). Уменьшение количества тромбоцитов в периферической крови на фоне ОПЛ и применения ГКС у животных может свидетельствовать об усиленном их потреблении в процессе тромбообразования.

На 3-и сут после моделирования ОПЛ общее количество клеток в БАЛЖ крыс контрольной группы было значимо больше, чем в группе интактных животных ($p = 0,03$), что говорит о закономерной миграции лейкоцитов (в том числе и лимфоцитов) в очаг воспаления легочной ткани (табл. 2).

Общее количество клеток, как и количество лейкоцитов, в том числе живых, в БАЛЖ животных группы 3 было статистически значимо ниже в сравнении с интактными

Таблица 1. Показатели клинического анализа крови у крыс на 3-и сут после моделирования ОПЛ и лечения различными дозами дексаметазона, $Me [Q_1; Q_3]$

Показатели	Экспериментальные группы				
	интактные животные ($n = 10$)	контрольная группа (без лечения) ($n = 24$)	группа 1 (Д 0,52 мг/кг) ($n = 36$)	группа 2 (Д 1,71 мг/кг) ($n = 34$)	группа 3 (Д 8,0 мг/кг) ($n = 32$)
Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	7,2 [6,2; 9,1]	8,6 [7,0; 11,0]	7,9 [6,9; 8,0]	8,3 [6,7; 11,0]	8,5 [7,2; 10,0]
Лимфоциты, $10^9/\text{л}$	5,2 [4,8; 5,6]	5,4 [4,6; 5,8]	1,7*, ** [0,8; 2,2]	2,1*, ** [1,4; 2,8]	2,4*, ** [1,6; 3,0]
Моноциты, $10^9/\text{л}$	0,15 [0,1; 0,2]	0,4 [0,3; 0,5]	0,9*, ** [0,7; 1,2]	1,0*, ** [0,7; 1,3]	1,0*, ** [1,0; 1,3]
Гранулоциты, $10^9/\text{л}$	1,8 [1,6; 2,6]	1,5 [1,3; 1,7]	4,4*, ** [3,3; 5,0]	4,6*, ** [3,6; 6,0]	4,1*, ** [3,7; 4,5]
Эритроциты, $10^{12}/\text{л}$	7,3 [7,2; 7,3]	7,5 [7,4; 7,7]	6,9 [6,5; 7,8]	7,5 [7,2; 8,1]	7,7 [7,3; 7,9]
Гемоглобин, г/л	134,0 [126; 143]	154,0* [150,0; 160,0]	156,0* [147,0; 166,0]	153,0* [147,0; 166,0]	163,0* [155,0; 164,0]
Тромбоциты, $10^9/\text{л}$	728,0# [711; 783]	519,0#* [515,0; 592,0]	548,0#* [506,0; 598,0]	511,0#* [443,0; 586,0]	410,0* [335,0; 449,0]

Примечание. Д — дексаметазон; * — различия статистически значимы относительно группы интактных животных; ** — различия статистически значимы относительно контрольной группы; # — различия статистически значимы относительно группы 3 (везде $p < 0,05$, критерий Краскела–Уоллиса).

Таблица 2. Цитоз и количество лейкоцитов в БАЛЖ на 3-и сутки после моделирования ОПЛ и лечения различными дозами дексаметазона, $Me [Q_1; Q_3]$

Показатели	Экспериментальные группы				
	интактные животные ($n = 10$)	контрольная группа (без лечения) ($n = 24$)	группа 1 (Д 0,52 мг/кг) ($n = 36$)	группа 2 (Д 1,71 мг/кг) ($n = 34$)	группа 3 (Д 8,0 мг/кг) ($n = 32$)
Общее количество клеток, 10^6 в 1 мл	19,7* [18,8; 20,6]	24,5 [21,2; 26,4]	22,4 [19,8; 22,9]	14,0* [13,7; 16,6]	10,2*, **, *** [9,0; 11,4]
Живые клетки, 10^6 в 1 мл	18,3* [16,5; 18,4]	23,2 [21,2; 25,6]	19,0 [17,5; 19,8]	13,3* [12,4; 13,8]	7,6*, **, *** [5,7; 9,0]
Общее количество лейкоцитов, 10^6 в 1 мл	10,3 [9,2; 15,4]	14,3 [13,0; 17,3]	12,8 [11,7; 13,7]	8,3 [7,1; 10,1]	4,0*, **, *** [3,0; 5,4]
Количество живых лейкоцитов, 10^6 в 1 мл	8,9 [7,6; 10,3]	9,2 [7,6; 9,6]	7,2 [4,8; 8,9]	4,0* [3,0; 5,4]	2,9*, **, *** [2,1; 3,2]

Примечание. Д — дексаметазон; * — различия статистически значимы относительно контрольной группы; ** — различия статистически значимы относительно группы интактных животных; *** — различия статистически значимы относительно группы 1.

и контрольными животными и, что примечательно, в сравнении с животными из группы 1 ($p = 0,008$, $0,001$ и $0,0002$; $p = 0,02$, $0,0001$ и $0,0002$ соответственно). Кроме этого, все указанные показатели у крыс в группе 2 были ниже, чем в контрольной группе ($p = 0,02$ и $0,007$ соответственно).

Выявленные изменения в цитозе и количестве лейкоцитов, вероятнее всего, являются следствием апоптоза этих клеток на фоне применения ГКС [12].

Абсолютное количество нейтрофилов в БАЛЖ у животных группы 3 было меньше, чем у интактных, контрольных животных и у животных из группы 1 ($p = 0,004$, $0,0007$ и $0,0002$), при этом у крыс из группы 2 исследуемый

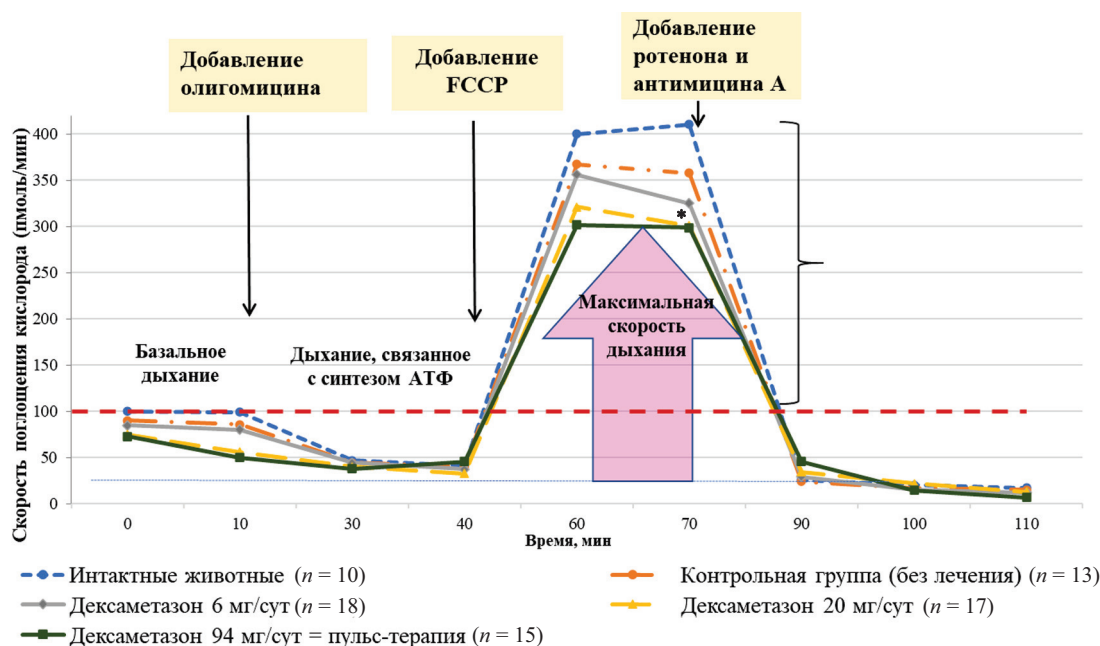
показатель был ниже только в сравнении с контрольной группой ($p = 0,007$). Схожие изменения наблюдали при анализе количества лимфоцитов (за исключением различий между группой 3 и группой интактных животных). Количество макрофагов было самым большим в контрольной группе и регистрировалось значимое дозозависимое снижение их количества у животных групп, где применяли дексаметазон в дозах 1,71 и 8,0 мг/кг ($p = 0,001$ и $0,009$).

При исследовании количества эпителиальных клеток (маркер выраженности повреждения бронхиального и альвеолярного эпителия) отмечено значимое

Таблица 3. Клеточный состав БАЛЖ на 3-и сут после моделирования ОПЛ и лечения различными дозами дексаметазона, $Me [Q_1; Q_3]$

Показатели	Экспериментальные группы				
	интактные животные ($n = 10$)	контрольная группа (без лечения) ($n = 24$)	группа 1 (Д 0,52 мг/кг) ($n = 36$)	группа 2 (Д 1,71 мг/кг) ($n = 34$)	группа 3 (Д 8,0 мг/кг) ($n = 32$)
Нейтрофилы, абс. в 10 мкл	7,0 [6,1; 8,9]	12,0* [11,3; 13,2]	7,1 [6,2; 7,3]	5,0**, *** [4,6; 5,4]	2,1*, **, *** [1,5; 2,9]
Лимфоциты, абс. в 10 мкл	2,1 [1,2; 3,2]	3,2 [1,8; 3,2]	3,2 [2,5; 3,4]	0,9** [0,7; 0,9]	1,1**, *** [0,7; 1,3]
Макрофаги, абс. в 10 мкл	0,7**, *** [0,5; 1,3]	3,1 [2,0; 3,2]	2,8 [2,1; 3,2]	1,5** [1,2; 2,0]	1,3** [0,9; 1,5]
Эпителий, абс. в 10 мкл	0,4 [0,2; 0,5]	2,2*, *** [2,0; 3,1]	1,2* [0,9; 1,4]	1,2* [1,2; 1,5]	1,5*, *** [1,4; 2,0]

Примечание. Д — дексаметазон; * — различия статистически значимы относительно группы интактных животных; ** — различия статистически значимы относительно контрольной группы; *** — различия статистически значимы относительно группы 1 (везде $p < 0,05$, критерий Краскела–Уоллиса).

**Рис. 1.** Оценка митохондриальной функции лейкоцитов периферической крови у крыс на 3-и сут после моделирования ОПЛ и применения различных доз дексаметазона. * — различия статистически значимы относительно группы интактных животных ($p < 0,05$, критерий Краскела–Уоллиса)

увеличение исследуемого показателя у крыс контрольной группы и у всех животных после назначения ГКС по сравнению с интактными крысами ($p = 0,001, 0,01, 0,02$ и $0,05$) (табл. 3).

Анализ митохондриальной функции позволил выявить, что скорость потребления кислорода лейкоцитами (рис. 1) была значимо меньше у животных в группах 2 и 3 в сравнении с интактными животными ($p = 0,001$ и $0,0009$), а у крыс из группы 3 еще и в сравнении с контрольными животными ($p = 0,005$).

Аналогичные дозозависимые изменения наблюдали в показателях резервной мощности митохондриального

дыхания: мощность значимо была меньше в группах 2 и 3 при сравнении с интактными животными и группой контрольных животных ($p < 0,05$).

При проведении патоморфологического исследования вначале оценивали гистологическую картину ткани легких у интактных животных, у которых не наблюдали каких-либо патологических изменений (рис. 2, а). На фоне ОПЛ у контрольных животных в 87 % исследованных полей (рис. 2, б) определяли выраженную продуктивную воспалительную реакцию в межальвеолярных перегородках с интерстициальным отеком и изменением гистологической структуры. Кроме этого, отмечали увеличение толщины участков

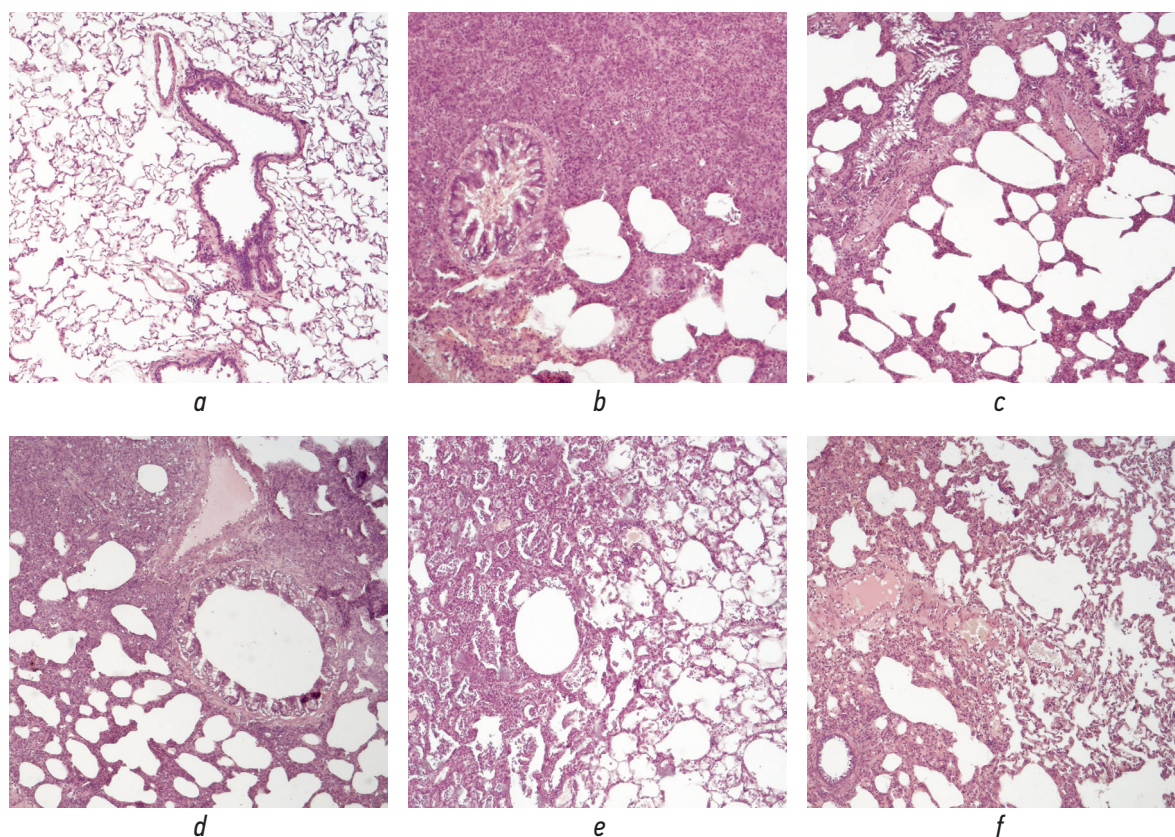


Рис. 2. Микрофотографии легких крыс на 3-и сут эксперимента; *a* — нормальная легочная ткань животных контрольной группы (без и/т введения ЛПС); *b* — ОПЛ без лечения (контрольная группа); *c* — ОПЛ, группа № 1 (дексаметазон 0,52 мг/кг); *d* — ОПЛ, группа 2 (дексаметазон 1,71 мг/кг); *e, f* — ОПЛ, группа 3 (дексаметазон 8,0 мг/кг, пульс-терапия). Окраска: гематоксилин и эозин. Ув. $\times 50$

аэрогематического барьера и разрушение отростков альвеолоцитов I типа, что характеризовалось уменьшением площади аэрогематического гистиона. Клеточный инфильтрат этих зон был представлен клетками лейкоцитарной группы, в основном нейтрофилами и макрофагами. В бронхах выявлены очаги фокальной или полной деструкции с оголением подслизистого слоя и кровоизлияниями. В сосудах крупного и среднего калибров регистрировали формирующиеся и свежие тромбы, при этом в паренхиме исследованных микропрепаратов легкого встречались единичные очаговые кровоизлияния. В 14 % полей зрения отмечали спадание альвеол, чередующееся в 35 % с зонами компенсаторных эмфизематозных расширений альвеол.

Патоморфологические изменения легких на 3-и сут с введением дексаметазона в дозировке 0,52 мг/кг характеризовались воспалительной инфильтрацией лейкоцитами и макрофагами в зонах деструкции и занимали до 66 % изученной площади (рис. 2, *c*). Установлено, что тромбозы сосудов 4 % и полнокровие 8 % встречаются значительно реже относительно контрольной группы (без лечения) и группы 3 (пульс-терапия) (рис. 2, *b, e, f*). Зоны со спаданием межальвеолярных перегородок, ателектазы определялись в 2 % изученной площади. Участки повышения воздушности легкого занимают на 12 % больше площади, нежели в контрольной группе без лечения.

В патоморфологических изменениях легких животных группы 2 (1,71 мг/кг) наиболее значимыми являются снижение воспалительной реакции на 6 % относительно группы 1 с дозировкой 0,52 мг/кг. Однако в перибронхиальных зонах выражена инфильтрация, а в просветах бронхов определяется лейкоцитарный экссудат (рис. 2, *d*). Достоверно установлено снижение площади эмфизематозных участков на 13 % относительно контрольной группы. В сосудах крупного и среднего калибров отсутствовали тромбозы.

В группе 3 (8,0 мг/кг) характерным патоморфологическим изменением легких на 3-и сут являлось снижение площади воспалительной реакции (рис. 2, *e, f*), которое отличалось от контрольной группы (рис. 2, *b*) на 33 и 12 % от группы 1 (рис. 2, *c*). Так же зоны эмфизематозных изменений уменьшились на 16 %, а полнокровие сосудов — на 12 %. Количество сосудистых тромбозов, выявляемых в паренхиме легких, значительно возросло — на 11 % относительно контрольной группы и на 8 % относительно групп сравнения 1 и 2.

И/т введение ЛПС крысам приводило к двустороннему диффузному повреждению легких, которое характеризовалось выраженным отеком (по данным МКЛ и влагонасыщения) и сопровождалось гибелью 40 % животных в группе, что сопоставимо с результатами современных исследований ОПЛ [6, 7, 9, 13].

На фоне ОПЛ и применения дексаметазона во всех исследованных дозах у крыс отмечали положительные лечебные эффекты: снижение летальности, уменьшение степени выраженности отека легких и лейкоцитарной инфильтрации легочной ткани, а также количества эмфизематозно-ателектатических участков.

В БАЛЖ животных после моделирования ОПЛ и назначения дексаметазона регистрировали дозозависимое снижение количества лимфоцитов и повышение количества гранулоцитов и моноцитов в периферической крови, а в БАЛ наблюдали снижение как общего количества живых клеток, так и абсолютного количества нейтрофилов, лимфоцитов, макрофагов. Важным патогенетическим фактором является и снижение функциональной активности (способность адекватно отвечать в условиях стресса (в нашем исследовании — воспаления)) лейкоцитов и лимфоцитов периферической крови по данным оценки митохондриальной функции. Снижение функции митохондрий носило также дозозависимый характер.

ВЫВОДЫ

Дексаметазон обладает высокой эффективностью для лечения животных с экспериментально смоделированным ЛПС-индуцированным ОПЛ и имеет отчетливый дозозависимый противовоспалительный эффект.

Применение дексаметазона в дозе 0,52 мг/кг (эквивалент 6 мг/сут для человека) сопровождается лучшей выживаемостью, минимальным влиянием на жизнеспособность и функциональную активность клеток воспаления; в свою очередь, применение 8,0 мг/кг (эквивалент пульс-терапии для человека) приводит к максимальному снижению количества лейкоцитов, лимфоцитов, макрофагов в очаге воспаления.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Edalatifard M., Akhtari M., Salehi M., et. al. Intravenous methylprednisolone pulse as a treatment for hospitalised severe COVID-19 patients: results from a randomised controlled clinical trial // *Eur. Respir. J.* 2020. Vol. 56, No. 6. P. 2002808. DOI: 10.1183/13993003.02808-2020
2. Stolz E., Klötzsch C., Schlachetzki F., et. al. High-dose corticosteroid treatment is associated with an increased risk of developing cerebral venous thrombosis // *Eur. Neurol.* 2003. Vol. 49, No. 4. P. 24–78. DOI: 10.1159/000070197
3. Munch M.W., Myatra S.N., Vijayaraghavan B., et. al. Effect of 12 mg vs 6 mg of Dexamethasone on the Number of Days Alive Without Life Support in Adults With COVID-19 and Severe Hypoxemia: The COVID STEROID2 Randomized Trial // *JAMA.* 2021. Vol. 326, No. 18. P. 1807–1817. DOI: 10.1001/jama.2021.18295
4. Ярошецкий А.И., Грицан А.И., Авдеев С.Н., и др. Диагностика и интенсивная терапия острого респираторного дистресс-синдрома. (Клинические рекомендации Общероссийской обще-

На фоне дозы эквивалентной пульс-терапии ГКС регистрируется большее количество тромбозов в легких, что, вероятнее всего, послужило причиной нарушения системы гемостаза и обуславливало более высокую летальность у животных этой группы.

При назначении глюкокортикостероидов необходимо осуществлять постоянный мониторинг нежелательных явлений данной терапии, так как из-за крайне выраженного угнетения клеток иммунной системы, особенно при использовании высоких доз (пульс-терапия), увеличивается вероятность инфицирования и/или активации латентных и оппортунистических инфекций.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

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

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования.

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Соответствие принципам этики. Исследование было выполнено с соблюдением принципов Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей (Страсбург, 1986), в соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики и Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. Также оно было одобрено локальными этическими комитетами Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова (протокол № 258 от 21.12.2021). Исследование выполнено в соответствии со стандартами «ARRIVE», принятыми для проведения доклинических исследований на животных.

ственной организации «Федерация анестезиологов и реаниматологов» // *Анестезиология и реаниматология.* 2020. № 2. С. 5–39. DOI: 10.17116/anaesthesiology20200215

5. Fan E., Del Sorbo L., Goligher E.C., et. al. An Official American Thoracic Society/European Society of Intensive Care Medicine/Society of Critical Care Medicine Clinical Practice Guideline: Mechanical Ventilation in Adult Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2017. Vol. 195, No. 9. P. 1253–1263. DOI: 10.1164/rccm.201703-0548ST

6. Matute-Bello G., Downey G., Moore B.B., et. al. Acute Lung Injury in Animals Study Group. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2011. Vol. 44, No. 5. P. 725–738. DOI: 10.1165/rcmb.2009-0210ST

7. Lin S., Wu H., Wang C., et. al. Regulatory T Cells and Acute Lung Injury: Cytokines, Uncontrolled Inflammation, and Therapeutic Implications // *Front. Immunol.* 2018. Vol. 9. Art. 1545. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01545

8. Салухов В.В., Харитонов М.А., Крюков Е.В., и др. Актуальные вопросы диагностики, обследования и лечения больных с COVID-19-ассоциированной пневмонией в различных странах и континентах // Медицинский Совет. 2020. № 21. С. 96–102.
9. Салухов В.В., Волошин Н.И., Шперлинг М.И. Эффективность применения различных схем системной противовоспалительной терапии глюкокортикоидами при развитии острого ЛПС-индуцированного повреждения легких в эксперименте // Известия Российской Военно-медицинской академии. 2022. Т. 41, № 2. С. 111–116. DOI: 10.17816/rmmar104619
10. Griffiths M., McAuley D., Perkins G., et. al. Guidelines on the management of acute respiratory distress syndrome //

- BMJ Open Respir. Res. 2019. Vol. 6, No. 1. Art. e000420. DOI: 10.1136/bmjresp-2019-000420
11. Шекунова Е.В., Ковалева М.А., Макарова М.Н., и др. Выбор дозы препарата для доклинического исследования: межвидовой перенос доз // Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. 2020. Т. 10, № 1. С. 19–28.
12. Ince L.M., Weber J., Scheiermann C. Control of Leukocyte Trafficking by Stress-Associated Hormones // Front. Immunol. 2019. Vol. 9. Art. 3143. DOI: 10.3389/fimmu.2018.03143
13. Qin M., Qiu Z. Changes in TNF- α , IL-6, IL-10 and VEGF in rats with ARDS and the effects of dexamethasone // Exp. Ther. Med. 2019. Vol. 17, No. 1. P. 383–387. DOI: 10.3892/etm.2018.6926

REFERENCES

1. Edalatfard M, Akhtari M, Salehi M, et. al. Intravenous methylprednisolone pulse as a treatment for hospitalised severe COVID-19 patients: results from a randomised controlled clinical trial. *Eur Respir J.* 2020;56(6):2002808. DOI: 10.1183/13993003.02808-2020
2. Stolz E, Klötzsch C, Schlachetzki F, et. al. High-dose corticosteroid treatment is associated with an increased risk of developing cerebral venous thrombosis. *Eur Neurol.* 2003;49(4):24–78. DOI: 10.1159/000070197
3. Munch MW, Myatra SN, Vijayaraghavan B, et. al. Effect of 12 mg vs 6 mg of Dexamethasone on the Number of Days Alive Without Life Support in Adults With COVID-19 and Severe Hypoxemia: The COVID STEROID2 Randomized Trial. *JAMA.* 2021;326(18):1807–1817. DOI: 10.1001/jama.2021.18295
4. Yaroshetskiy AI, Gritsan AI, Avdeev SN, et. al. Diagnostics and intensive therapy of Acute Respiratory Distress Syndrome Russian. (Clinical guidelines of the Federation of Anesthesiologists and Reanimatologists of Russia). *Russian Journal of Anaesthesiology and Reanimatology.* 2020;(2):5–39. (In Russ.) DOI: 10.17116/anaesthesiology20200215
5. Fan E, Del Sorbo L, Goligher EC, et. al. An Official American Thoracic Society/European Society of Intensive Care Medicine/Society of Critical Care Medicine Clinical Practice Guideline: Mechanical Ventilation in Adult Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017;195(9):1253–1263. DOI: 10.1164/rccm.201703-0548ST
6. Matute-Bello G, Downey G, Moore BB, et. al. Acute Lung Injury in Animals Study Group. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011;44(5):725–738. DOI: 10.1165/rcmb.2009-0210ST
7. Lin S, Wu H, Wang C, et. al. Regulatory T Cells and Acute Lung Injury: Cytokines, Uncontrolled Inflammation, and Therapeutic Implications. *Front Immunol.* 2018;9:1545. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01545
8. Salukhov VV, Kharitonov MA, Kryukov EV, et. al. Topical issues of diagnostics, examination and treatment of patients with COVID-19-associated pneumonia in different countries and continents. *Meditsinskiy sovet* 2020;(21):96–102. (In Russ.) DOI: 10.21518/2079-701X-2020-21-96-102
9. Salukhov VV, Voloshin NI, Shperling MI. Effectiveness of various regimens of systemic anti-inflammatory therapy with glucocorticoids in the development of acute LPS-induced lung damage in the experiment. *Russian Military Medical Academy Reports.* 2022;41(2):111–116. (In Russ.) DOI: 10.17816/rmmar104619
10. Griffiths M, McAuley D, Perkins G, et. al. Guidelines on the management of acute respiratory distress syndrome. *BMJ Open Respir Res.* 2019;6(1):e000420. DOI: 10.1136/bmjresp-2019-000420
11. Shekunova EV, Kovaleva MA, Makarova MN, et. al. The choice of dose of the drug for preclinical studies: interspecies transfer of doses. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya.* 2020;10(1):19–28 (In Russ.) DOI:10.30895/1991-2919-2020-10-1-19-28
12. Ince LM, Weber J, Scheiermann C. Control of Leukocyte Trafficking by Stress-Associated Hormones. *Front Immunol.* 2019;9:3143. DOI: 10.3389/fimmu.2018.03143
13. Qin M, Qiu Z. Changes in TNF- α , IL-6, IL-10 and VEGF in rats with ARDS and the effects of dexamethasone. *Exp Ther Med.* 2019;17(1):383–387. DOI: 10.3892/etm.2018.6926

ОБ АВТОРАХ

*Никита Игоревич Волошин, адъюнкт первой кафедры (Терапии усовершенствования врачей); ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3880-9548>; eLibrary SPIN: 6061-4342; Scopus Author ID: 57926549500; Researcher ID: HSG-7925-2023; e-mail: nikitavoloshin1990@gmail.com

AUTHORS' INFO

*Nikita I. Voloshin, M.D., postgraduate student of Therapy of Doctors Improvement Department; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3880-9548>; eLibrary SPIN: 6061-4342; Scopus Author ID: 57926549500; Researcher ID: HSG-7925-2023; e-mail: nikitavoloshin1990@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

ОБ АВТОРАХ

Юлия Александровна Замиралова, студентка;
ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-5631-9932>;
eLibrary SPIN: 7692-9410; Researcher ID: HSG-9775-2023;
e-mail: yulia_nikolaeva@hotmail.com

Виктория Александровна Пугач, канд. биол. наук,
старший научный сотрудник;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4290-350X>;
eLibrary SPIN: 3739-3699; Scopus Author ID: 57195201128;
Researcher ID: ACD-0418-2022; e-mail: gniiivm_7@mail.ru

Владимир Владимирович Салухов, докт. мед. наук, доцент,
начальник первой кафедры (Терапии усовершенствования
врачей); ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1851-0941>;
eLibrary SPIN: 4531-6011; Scopus Author ID: 55804184100;
e-mail: vlasaluk@yandex.ru

Михаил Александрович Тюнин, канд. мед. наук,
заместитель начальника центра;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6974-5583>;
eLibrary SPIN: 6161-7029; Scopus Author ID: 25032311600;
e-mail: gniiivm_7@mail.ru

Михаил Анатольевич Харитонов, докт. мед. наук, профессор,
первая кафедра (Терапии усовершенствования врачей);
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6521-7986>;
eLibrary SPIN: 7678-2278; Scopus Author ID: 57521284600;
Researcher ID: H-6056-2015; e-mail: micjul11@yandex.ru

Ирина Алексеевна Одинцова, докт. биол. наук, профессор,
заведующая, кафедра гистологии с курсом эмбриологии;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0143-7402>;
eLibrary SPIN: 1523-8394; Scopus Author ID: 6603745712;
Researcher ID: 96874; e-mail: odintsova-irina@mail.ru

Павел Алексеевич Слизов, младший научный
сотрудник отдела (медико-биологических исследований) на-
учно-исследовательского центра;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0143-7402>;
eLibrary SPIN: 3626-6262; Author ID: 1072193;
Scopus Author ID: 57203389614; Researcher ID: X-5497-2018;
e-mail: maidel@bk.ru

Алексей Александрович Минаков, адъюнкт первой
кафедры (Терапии усовершенствования врачей);
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1525-3601>;
eLibrary SPIN-код: 5344-7883; Scopus Author ID: 57926549400;
Researcher ID: HSG-9445-2023; e-mail: minacom@mail.ru

Дина Радиковна Слуцкая, канд. биол. наук, доцент,
преподаватель, кафедра гистологии с курсом эмбриологии;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3910-2621>;
eLibrary SPIN: 2546-9393; Researcher ID: 882535;
e-mail: dina_hanieva@mail.ru

AUTHORS' INFO

Yuliya A. Zamiralova, student;
ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-5631-9932>;
eLibrary SPIN: 7692-9410; Researcher ID: HSG-9775-2023;
e-mail: yulia_nikolaeva@hotmail.com

Victoriya A. Pugach, Ph.D. (Biology), Senior researcher;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4290-350X>;
eLibrary SPIN: 3739-3699; Scopus Author ID: 57195201128;
Researcher ID: ACD-0418-2022; e-mail: gniiivm_7@mail.ru

Vladimir V. Salukhov, M.D., D.Sc. (Medicine),
Associate Professor, the Head of Therapy of Doctors Improvement
the first Department; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1851-0941>;
eLibrary SPIN: 4531-6011; Scopus Author ID: 55804184100;
e-mail: vlasaluk@yandex.ru

Mikhail A. Tyunin, M.D., Ph.D. (Medicine), deputy Head
of the center; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6974-5583>;
eLibrary SPIN: 6161-7029; Scopus Author ID: 25032311600;
e-mail: gniiivm_7@mail.ru

Mikhail A. Kharitonov, M.D., D.Sc. (Medicine), Professor, the
Therapy of Doctors Improvement the first Department;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6521-7986>;
eLibrary SPIN: 7678-2278; Scopus Author ID: 57521284600;
Researcher ID: H-6056-2015; e-mail: micjul11@yandex.ru

Irina A. Odintsova, D.Sc. (Biology), Professor, the Head of the
Histology with a Course in Embryology Department;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0143-7402>;
eLibrary SPIN: 1523-8394; Scopus Author ID: 6603745712;
Researcher ID: 96874; e-mail: odintsova-irina@mail.ru

Pavel A. Slizhov, junior researcher
of the Department (experimental medicine)
of the Research Center;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0143-7402>;
eLibrary SPIN: 3626-6262; Author ID: 1072193;
Scopus Author ID: 57203389614; Researcher ID: X-5497-2018;
e-mail: maidel@bk.ru

Aleksey A. Minakov, M.D., postgraduate student
of Therapy of Doctors Improvement the first Department;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1525-3601>;
eLibrary SPIN-код: 5344-7883; Scopus Author ID: 57926549400;
Researcher ID: HSG-9445-2023; e-mail: minacom@mail.ru

Dina R. Slutskaya, Ph.D. (Biology), Associate Professor, the
teacher of Histology with a Course in Embryology Department;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3910-2621>;
eLibrary SPIN: 2546-9393; Researcher ID: 882535;
e-mail: dina_hanieva@mail.ru