

Л.В.Капилевич, Е.Ю.Дьякова, Т.Н.Зайцева, А.Э.Сазонов, И.С.Лещева,  
А.В.Носарев

## Экспериментальные модели в изучении механизмов развития аллергического бронхоспазма

Сибирский государственный медицинский университет, Томск

L.V.Kapilevich, E.Yu.Diakova, T.N.Zaitseva, A.E.Sazonov, I.S.Leshcheva, A.V.Nosarev

## Experimental models for investigating mechanisms of allergic bronchospasm

### Введение

Механизмы развития бронхоспастических состояний и пути их коррекции активно изучаются во всем мире, но проблема бронхиальной астмы (БА) остается далекой от разрешения. Несмотря на достигнутые успехи за последние 30 лет в России в 3 раза увеличился уровень заболеваемости БА, около 5 % взрослого населения и до 10 % детей страдают этим заболеванием [1, 2].

Изучение механизмов аллергического воспаления и гиперреактивности дыхательных путей, лежащих в основе БА, в эксперименте на животных позволяет глубже понять механизмы этих процессов у человека. Поэтому экспериментальные животные широко используются для изучения физиологии и патофизиологии дыхательных путей, включая исследование клеточного и гуморального ответа на введение аллергена.

В литературе описан целый ряд экспериментальных моделей БА у животных, которые используются для изучения различных аспектов патогенеза и апробации новых способов лечения. В то же время каждая модель имеет определенные особенности, которые ограничивают сферу ее использования.

На сегодняшний день актуальность такого рода работ вновь возрастает в связи с обнаружением новых маркеров БА — в т. ч. цитокинов, интерлейкина-5 (ИЛ-5) и т. д. — и, соответственно, новых направлений исследования патогенеза БА и поиска патогенетически обоснованных методов лечения.

### Способы моделирования бронхоспастических состояний у экспериментальных животных

Еще в 1-й половине XX в. учеными было продемонстрировано, что у животных можно вызвать астмоподобные симптомы, применяя мускарин, пилокарпин [3]. Meltzer в 1910 г. [цит. по 15] отметил сходство проявлений анафилаксии у морских свинок и БА человека и предложил этих животных в качестве удобной модели для изучения БА. С тех пор над морской свинкой наиболее часто проводят опыты в экспериментальной ал-

лергологии [3], и в наше время большинство зарубежных и отечественных ученых предпочитают изучать именно это животное при моделировании БА. Кроме морских свинок, в качестве объекта исследования используют кроликов, мышей, крыс, кошек и обезьян. У всех этих животных шоковым органом при анафилаксии являются легкие.

Исследования проводятся 2 путями: когда эксперименты ставятся на сенсibilизированном животном, а изменения оценивают по состоянию крови (биохимические, иммунологические показатели), составу бронхоальвеолярного лаважжа, или патоморфологически [4–8], или же эксперименты проводятся на отдельно взятом органе, клеточном конгломерате, культуре клеток, полученных от сенсibilизированных животных [9–13]. Исследования 1-го из названных направлений в литературе представлены гораздо шире. В качестве антигена используются овальбумин, лошадиная сыворотка, пневмоцитотоксическая сыворотка. Разработано несколько моделей с их использованием.

В 1937 г. Каллос и Пэйджл сенсibilизировали морских свинок чужеродным белком, а затем подвергали их действию аэрозоля из 10–20%-ного раствора того же белка [14].

Е.С.Разовская и Ф.Н.Штеренсон [14] 3-кратно сенсibilизировали морских свинок весом 200–400 г подкожными инъекциями 0,2–0,4 мл 25%-ной взвеси яичного белка в физиологическом растворе (промежутки между инъекциями — 3–4 дня). Через 14–21 день животные помещались в камеру и подвергались действию аэрозоля из этой же взвеси. Спустя несколько минут после начала ингаляции у морских свинок появляется экспираторная одышка. Затруднение дыхания нарастает в течение ближайших минут, и, если контакт с антигеном не прекращается, животное гибнет в асфиксических судорогах. Повторная ингаляция на выживших морских свинок влияния не оказывает. При вскрытии наблюдается

сильная эмфизема с участками ателектаза, густой, вязкий секрет с фибриноидными свертками в просвете бронхов. При гистологическом исследовании обнаруживается массивная инфильтрация эозинофилами перибронхиальной ткани, межальвеолярных перегородок и подслизистой бронхов.

В модели БА, по P.Andersson (1980 г.) [цит. по 11], группу белых крыс-самцов весом 180–200 г 2 дня подряд надо сенсибилизировать подкожным введением 10 мкг овальбумина, разведенного в 0,5 мл раствора, содержащего 100 мг Al (ОН<sub>3</sub>). Спустя 3 нед. ингалировать разрешающую дозу 0,03%-ного овальбумина в концентрации 0,8–1 мл / мин до появления признаков бронхоспазма.

Существуют различные модификации метода Andersson, например на мышах. Мыши активно иммунизируются в 1-й и 14-й дни внутрибрюшинными инъекциями 100 мкл физиологического раствора, содержащего 20 мкг овальбумина и 2 мг алюминия. На 24, 25 и 26-й дни мыши подвергаются действию аэрозоля — 1%-ного овальбумина в физиологическом растворе, в течение 20 мин [15, 16].

В других исследованиях предлагается иная схема моделирования: в 1-й день мышей внутрибрюшинно сенсибилизируют инъекциями раствора с 10 мкг овальбумина и 1 мг гидроксида алюминия. С 14-го по 21-й дни ежедневно проводят ингалиции овальбумином [17].

По методу В.В.Желтвая в модификации В.И.Бабича [18], в качестве антигена используется нормальная лошадиная сыворотка. Морские свинки сенсибилизируются 0,1 мл нормальной лошадиной сыворотки внутрибрюшинно. Затем 0,1 мл лошадиной сыворотки с убитой вакциной БЦЖ вводится трижды подкожно с интервалом в 24 ч. Следующие 14 дней морские свинки подвергаются ингалиции лошадиной сывороткой в течение 30 мин в камере (1,0 мл сыворотки на каждое животное). По истечении этого срока на 21-й и 28-й дни сенсибилизации опять проводятся ингалиции.

Кроме лошадиной сыворотки, применяли также свиную сыворотку. Ее вводили кроликам трехкратно 1 раз в неделю под кожу в дозе 1 мл / кг. Через 7 дней та же доза антигена, вводимая внутривенно, вызвала аллергическую реакцию [19].

Нормальная сыворотка может быть использована как антиген для сенсибилизации кошек. Подопытным животным 3 дня подряд подкожно вводят нормальную сыворотку по 0,1 мл на 1 кг массы тела. Аллергический бронхоспазм можно получить введением разрешающей дозы антигена (1 мл / кг) на 12-й день от начала иммунизации [20].

На кроликах разработана модель БА с использованием пневмоцитотоксической сыворотки. Донорами сыворотки являются крысы, их иммунизируют экстрактом легких кролика. Получают сыворотку, титр которой в реакции связывания комплемента: ++++ в разведении 1 : 80. Полученную сыворотку вводят 6 раз внутривенно и дважды в виде ингалиции

аэрозолем с интервалом в 3 дня в дозе 0,3 мл на 1 кг веса животного. При гистологическом исследовании легких: мелкие бронхи спазмированы, многие просветы альвеол эмфизематозы, в некоторых участках ткань находится в состоянии гиповентиляции или ателектаза. В некоторых ателектических участках — очаговые кровоизлияния и скопление лейкоцитов, преимущественно эозинофилов. Межальвеолярные перегородки утолщены и инфильтрированы гистиоцитами и эозинофилами, стенки многих артерий утолщены [21].

В экспериментах на обезьянах в качестве антигена применяли экстракт *Ascaris suum*. Ингаляция животным этим экстрактом вызывала типичную IgE-опосредованную реакцию гиперчувствительности, с дегрануляцией тучных клеток и бронхokonстрикцией [22].

Некоторые исследователи для сенсибилизации животных использовали разведенный в изотоническом растворе хлорида натрия с равным количеством вазелинового масла белок куриного яйца (1 : 5). Этот раствор вводили подкожно по 0,5 мл крысам-самцам массой 0,18–0,22 кг [23].

Исследования, выполненные на экспериментальных моделях, позволили получить целый ряд новых данных о патогенезе БА, о вовлечении отдельных звеньев иммунной системы, морфофункциональных параллелей и метаболических расстройствах при данном заболевании. В таблице представлена сравнительная характеристика основных экспериментальных моделей бронхоспастических состояний.

### Патоморфология легких при моделировании бронхоспастических состояний у животных

Наибольшее число работ, выполненных на экспериментальных моделях БА, посвящены изучению морфологических изменений, происходящих при развитии этого патологического состояния.

На моделях БА на морских свинках и кроликах с использованием в качестве антигена овальбумина и пневмоцитотоксической сыворотки было выявлено увеличение эозинофилов, лимфоцитов в крови, в бронхоальвеолярной жидкости и в ткани легкого. Средняя толщина стенки трахеи, тоже определяемая микрометрическим методом, также была увеличена [8, 24]. На гистологических препаратах ткани легких морских свинок с БА соотношение реснитчатых клеток к бокаловидным составляло 1 : 3. Среди эпителиальных клеток отмечено преобладание эпителиоцитов с признаками дистрофии (отсутствие ресничек на апикальной стороне, грубая зернистость в цитоплазме, глыбчатость хроматина, пикноз ядра). Базальная мембрана извита и местами утолщена. В собственной пластинке слизистой оболочки — мощный отек, скопление отечной жидкости наблюдается под базальной мембраной и периваскулярно. Полнокровие сосудов отмечается на всем протяжении собственной пластинки слизистой оболочки, эндотелиальные клетки в капиллярах набухшие,

Сравнительная характеристика экспериментальных моделей бронхоспастических состояний

Объект (животное)	Аллерген	Способ введения аллергена	Источник информации
Морские свинки	Яичный белок	Подкожные инъекции и последующая единичная провокационная ингаляция	Саркисов Д.С., Ремезов П.И. Воспроизведение болезней человека в эксперименте. — М., 1960. — 780 с.
Морские свинки	Нормальная лошадиная сыворотка с убитой вакциной БЦЖ	Внутрибрюшинные инъекции, подкожные инъекции и ингаляции	Ющик Л.В. Активность некоторых ферментов ткани легких морских свинок при модельном процессе бронхиальной астмы // Проблемы патологии в эксперименте и клинике. — Львов, 1986. С. 26–27.
Крысы	Овальбумин	Подкожные инъекции и последующая единичная провокационная ингаляция	Елисеева Е.В. Реакция нитроксидсинтазы и тучных клеток органов дыхания при действии адренэргических веществ при бронхиальной астме: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Владивосток, 1997. — 26 с.
Крысы	Белок куриного яйца, разведенный в изотоническом растворе хлорида натрия с равным количеством вазелинового масла	Подкожные инъекции	Бурый А.А. Содержание глутатиона в ткани легких в кинетике сенсибилизации // Проблемы патологии в эксперименте и клинике. — Львов, 1986. С. 10–11.
Мыши	Раствор овальбумина	Внутрибрюшинные инъекции и ингаляции	CD23 exhibits negative regulatory effects on allergic sensitization and airway hyperresponsiveness / Haczk A., Takeda K., Hamelmann E. et al. // Am. J. Respir. Crit. Care Med. — 2000. Vol. 161, № 3. P. 952-960.
Мыши	Раствор овальбумина с алюминием	Внутрибрюшинные инъекции и последующие ингаляции	Cytokine manipulation in animal models of asthma / Romain A., Pauwels, Guy J., et al. // Am. J. Respir. Crit. Care Med. — 1997. Vol. 156, № 4. P. 78–81.
Кролики	Свиная сыворотка	Подкожные инъекции и провокационное внутривенное введение	Базанов Г.А., Смирнов В.В., Табакова Т.Д. Некоторые показатели крови кроликов при сенсибилизации // Проблемы патологии в эксперименте и клинике. — Львов, 1986. С. 17–18.
Кролики	Пневмоцитотоксическая сыворотка	Внутривенное введение и провокационная ингаляция	Брусиловский Е.С. Экспериментальное воспроизведение бронхиальной астмы с применением пневмоцитотоксической сыворотки // Цитотоксины в современной медицине. — Киев, 1966. С. 155–162.
Коты	Нормальная лошадиная сыворотка	Подкожные инъекции	Воробьева Т.В. Исследование бронхоспазмолитической эффективности препарата Витурид в условиях аллергического бронхоспазма // Астма. — 2003. Т. 4, № 1. С. 68.
Обезьяны	Экстракт <i>Ascaris suum</i>	Ингаляции	Microarray profile of differentially expressed genes in a monkey model of allergic asthma / Jun Zou, 1 Simon Young, 1 Feng Zhu et al. // BioMed Central Ltd Genome Biol. — 2002. № 3. P. 1–13.

отмечается стаз полиморфоядерных лейкоцитов внутри сосудов. Зоны локализации клеточного инфильтрата сочетаются с эксфолиацией бронхиального эпителия в просвете бронха. Мышечные волокна собственной пластинки слизистой оболочки гиперфибрированы [25].

Описанные изменения характерны для воспалительного процесса, который сопровождает развитие БА в легких экспериментальных животных и к тому же характеризуется интенсивной инфильтрацией эозинофилов, особенно в фазу поздней реакции астматического ответа [26]. Эозинофильная инфильтрация продолжается до 48 ч после провокационной ингаляции антигеном, при этом обнаруживается временное увеличение ряда апоптотических клеток и ядерного антигена в альвеолах [8].

Также при гистологическом изучении легких зафиксировано увеличение уровня гиалина в плазме, в бронхоальвеолярной жидкости и в легочной ткани [8, 27].

В модельных исследованиях *in vitro* было показано, что очищенные продукты эозинофилов и стимулированные эозинофилы повреждают респираторный эпителий [24, 28]. Большой основной протеин,

к примеру, вызывает отслоение эпителиальных клеток и нарушает движение ресничек, обнажая базальную мембрану. Исследование бронхиальной ткани методом иммунофлюоресценции выявляет депозиты большого основного протеина в местах повреждения эпителия. Повреждение эпителия, вызываемое продуктами эозинофилов, может приводить к повышению проницаемости слизистой и нарушению ее осмолярности. При этом за счет воздействия на афферентные чувствительные окончания нервов может увеличиваться высвобождение нейропептидов, таких как субстанция П, которые обладают потенциальной бронхоконстрикторной активностью [29]. Десквамация и деструкция клеток дыхательного эпителия могут также приводить к потере продуцируемого эпителием релаксирующего фактора, вызывающие гиперчувствительность гладких мышц бронхов [22, 24].

В биоптатах кожи морских свинок с БА были обнаружены электронномикроскопические изменения. В условиях сенсибилизации в дерме морских свинок отмечена дезорганизация ее составных элементов, проявляющаяся незначительным расслоением ультраструктур на электронносветлые и электронноплотные компоненты, с повышенной

насыщенностью лейкоцитами, Т-лимфоцитами, тучными клетками. Наблюдается разволокнение коллагеновых фибрилл, в отдельных случаях выявляется лизис коллагеновых волокон. В стенке капилляров отмечены нарушения контактов между эндотелиоцитами и разрушения базальной мембраны. В просвете капилляров обнаруживаются явления гиперагрегации и гемолиза эритроцитов, выявляются "тени" эритроцитов и хлопьевидные массы белков. Во время приступа в дерме животных происходит резкое расслоение ультраструктур, в капиллярном русле выявляются сладжи эритроцитов, многие эритроциты имеют неправильную форму и содержат разрыхленные и распадающиеся мембраны. Плазма крови представлена избытком электронноплотного хлопьевидного материала, обрывками цитоплазмы и разрушенными ядрами клеток [30].

Yang Z.W. et al. [31] предложили для оценки морфологических изменений у морских свинок с БА использовать измерение *star volume* стереометрическим методом, у сенсibilизированных свинок этот объем был втрое выше, чем в контрольной группе.

Таким образом, проведено большое количество исследований, посвященных гистопатологическим и морфологическим изменениям при экспериментальной БА. Надо отметить, что обнаруженные исследователями изменения в значительной степени сходны с патоморфологической картиной у больных БА.

### Иммунологическая характеристика экспериментальной БА

Иммунологическим аспектам БА уделяется большое внимание в модельных исследованиях на животных, однако в этом вопросе остается еще много неясного.

Некоторые исследователи отмечают увеличение ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13, ИФγ в бронхоальвеолярной жидкости и в ткани легкого морских свинок, крыс с экспериментальной БА [17, 32]. Доказано, что при воздействии ИЛ-13 и ИЛ-8 у животных с моделью БА повышает гиперреактивность дыхательных путей на воздействие гистамина и их воспаление [35, 49]. У овальбумин-сенсibilизированных мышей отмечается повышение уровня IgE, IgG1. Применение антител CD23 у CD23-избыточных мышей позволило снизить уровень IgE и IgG1, эозинофилии, нормализовать гиперреактивность бронхов. Эти изменения сопровождались повышением ИФγ и снижением ИЛ-4 [15].

Schuster M. et al. [35] изучали миграцию лимфоцитов в легочную ткань у овальбумин-сенсibilизированных кроликов. Они обнаружили увеличение количества CD4, CD8, ИЛ-2, натуральных киллеров методом РИА в бронхоальвеолярной жидкости и в ткани легкого.

Поскольку у человека в клетках бронхиального эпителия NO повышает продукцию ИЛ-8, исследователями была сделана попытка изучить участие эн-

догенного оксида азота в воспалении и гиперреактивности воздухоносных путей в эксперименте и вовлечение в этот процесс ИЛ-8 у морских свинок. При воздействии озоном в бронхоальвеолярной жидкости повышалось содержание нейтрофилов и ИЛ-8, а ингибитор NO-синтазы предотвращал эти изменения [34].

Проведенные исследования с использованием моноклональных антител к ИЛ-5 и рецептору ИЛ-5 показали, что анти-ИЛ-5 терапия, помимо редукции эозинофильного воспаления, может приводить к снижению гиперреактивности дыхательных путей при астме и улучшать функцию легких. Однако в исследованиях на морских свинках с экспериментальной БА было замечено, что для блокирования гиперреактивности дыхательных путей необходимы более высокие дозы препаратов моноклональных антител к ИЛ-5, чем для блокирования эозинофильного воспаления [11, 36].

Для выявления принципиальной возможности гладких мышц (ГМ) бронхов экспрессировать рецепторный комплекс к ИЛ-5 в препаратах методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) был проведен анализ мРНК α-цепи рецептора ИЛ-5. Оказалось, что в ГМ бронхов как сенсibilизированных, так и не сенсibilизированных животных присутствует экспрессия мРНК рецептора ИЛ-5 (α-цепи). Экспрессия мРНК в ГМ бронхов животных, оцениваемая в процентах по отношению к экспрессии мРНК глицерид-3-фосфат дегидрогеназы, составила  $36 \pm 12\%$ ;  $p < 0,05$  [9]. Более того, было показано, что для развития бронхиальной гиперчувствительности критичными являются ИЛ-5 и ИЛ-4, но не эозинофилы или IgE [9, 37], т. е. ИЛ-5 лиганд-рецепторное взаимодействие на гладких мышцах дыхательных путей может вызывать гиперчувствительность независимо от эозинофил-индуцированного повреждения тканей.

C.D.Wegner et al. [38] проводили исследование влияния адгезивных молекул на воспаление при БА. В эксперименте на обезьянах использовались моноклональные антитела к рецепторам адгезивных молекул. Было показано, что у животных уменьшается количество эозинофилов в бронхиальном дереве в ответ на ингаляцию аллергена. Также отмечалось достоверное ограничение повышения бронхиальной гиперчувствительности после аллергенного провоцирования. Это позволило предположить, что цитокины оказывают сильное влияние на адгезивные молекулы.

Электрическое стимулирование блуждающего нерва экспериментальных морских свинок вызывало как бронхоконстрикцию, так и брадикардию. У контрольных животных пилокарпин уменьшал вагус-зависимую бронхоконстрикцию, стимулируя нейрональные мускариновые рецепторы M<sub>3</sub>, а галламин потенцировал бронхоконстрикцию, блокируя эти рецепторы. У сенсibilизированных животных, которые не получали моноклональные антитела к

ИЛ-5 (МА-5), эти эффекты были заметно снижены, подтверждая дисфункцию рецептора  $M_2$ . У морских свинок с экспериментальной БА на фоне введения МА-5 эффекты, как пилокарпина, так и галламина, были такими же, как и у контрольных животных, демонстрируя нормальную функцию рецепторов  $M_2$ . Введение МА-5 селективно тормозило миграцию эозинофилов в легкие, оцениваемую по составу бронхоальвеолярного лаважа [39].

На пассивно иммунизированных морских свинках было показано, что фактор активации тромбоцитов (ФАТ) — самый сильный хемотаксический фактор и в реакциях *in vivo* увеличивает количество эозинофилов при аллергических реакциях. А назначение антагонистов ФАТ предотвращает эозинофильную инфильтрацию в легкие свинок, вызванную антигеном [40].

### Метаболические расстройства при моделировании БА в эксперименте

На морских свинках исследовались показатели функционального состояния кожи. Измерения проводились на предварительно депилированной коже живота животных в межприступный период, во время приступа и после приступа через 24 ч [41]. Перед измерением кожа протиралась ватой, смоченной дистиллированной водой. Контролем служили интактные животные. Во время приступа БА наблюдается сдвиг рН кожи в щелочную сторону ( $7,09 \pm 0,12$  ( $p < 0,05$ ), в контроле —  $6,63 \pm 0,07$ ), уменьшение величины окислительно-восстановительных потенциалов ( $17,25 \pm 7,77$  мВ ( $p < 0,05$ ), в контроле —  $50,38 \pm 6,69$  мВ) и удлинение времени обесцвечивания раствора щелочи ( $56,61 \pm 5,81$  с ( $p < 0,05$ ), в контроле —  $31,16 \pm 1,54$  с). Через 24 ч после приступа наблюдается дальнейшее изменение показателей. Эти данные свидетельствуют о нарушении трофических процессов в коже животных и снижении ее защитных свойств при модельном процессе БА.

Также в опытах на свинках изучалась активность ферментов лактатдегидрогеназы (ЛДГ),  $\alpha$ -гидроксибутиратдегидрогеназы ( $\alpha$ -ГБДГ), креатинфосфокиназы (КФК), щелочной фосфатазы (ЩФ), аланинаминотрансферазы (АлТ), аспаратаминотрансферазы (АсТ),  $\gamma$ -глутамилтрансферазы ( $\gamma$ -ГлТ) ткани легких при модельном процессе БА. Активность ферментов измерялась в единицах на 1 г белка. На высоте приступа активность ЛДГ оставалась на уровне внеприступного периода —  $315,6 \pm 17,8$ , активность  $\gamma$ -ГлТ была ниже контрольного уровня —  $2,7 \pm 0,2$  ( $p < 0,05$ ) (контроль —  $4,6 \pm 0,3$ ). Наблюдалось снижение и других исследуемых ферментов:  $\alpha$ -ГБДГ —  $183,7 \pm 6,6$  ( $p < 0,05$ ) (контроль  $225,9 \pm 8,9$ ); КФК —  $201,1 \pm 5,1$  ( $p < 0,05$ ) (контроль —  $391,7 \pm 17,7$ ); ЩФ —  $63,7 \pm 1,2$  ( $p < 0,05$ ) (контроль —  $85,2 \pm 3,7$ ); АлТ —  $3,7 \pm 0,1$  ( $p < 0,05$ ) (контроль —  $5,6 \pm 0,5$ ); АсТ —  $98,4 \pm 4,9$  ( $p < 0,05$ ) (контроль —  $126,8 \pm 5,8$ ). Выявленные изменения активности ферментов под-

тверждают представления об анаэробизации обмена веществ при аллергии [18].

Активность тех же ферментов изучались в коже морских свинок. Во внеприступный период наблюдалось уменьшение активности ферментов, во время приступа БА активность ферментов в коже увеличивалась [42].

Этими же авторами исследовалась активность ферментов сыворотки крови, ткани гипоталамуса и надпочечников морской свинки при БА. Было выявлено, что во внеприступный период активность  $\alpha$ -ГБДГ и  $\gamma$ -ГлТ сыворотки крови возрастала, активность КФК снижалась, во время приступа активность  $\alpha$ -ГБДГ,  $\gamma$ -ГлТ, АлТ и АсТ снижалась, а ЩФ и КФК — повышалась. В ткани гипоталамуса во внеприступный период активность всех исследуемых ферментов (ЛДГ, КФК, ЩФ, АлТ, АсТ,  $\gamma$ -ГлТ) снижалась, во время приступа активность всех ферментов повышалась. В ткани надпочечников во внеприступном периоде наблюдалось снижение активности ЩФ, АлТ и  $\gamma$ -ГлТ, активность же КФК повышалась, во время приступа БА наблюдалось снижение активности ЛДГ, КФК, активность  $\alpha$ -ГБДГ и  $\gamma$ -ГлТ повышалась [6, 43].

На свинках с БА, моделируемой по методу Желтая–Бабица, было показано, что уровень основного обмена у экспериментальных животных (оценивался по методу *С.Н. Голубевой*, 1959 [цит. по 13], по потреблению кислорода на 1 кг массы тела в сутки) повышен —  $1\,324,1 \pm 30,4$  л / кг ( $p < 0,01$ ) (контроль —  $872,9 \pm 15,4$  л / кг), при проведении терапии церулоплазмином отмечено снижение до  $1\,020,2 \pm 24,5$  л / кг [5]. Одним из механизмов эффективности влияния церулоплазмينا при БА является стимуляция окислительных процессов и повышение тем самым основного обмена. При экспериментальной БА в крови понижается концентрация адреналина —  $0,23 \pm 0,02$  мкг / л ( $p < 0,001$ ) (контроль —  $0,43 \pm 0,02$  мкг / л) и норадреналина —  $0,80 \pm 0,02$  мкг / л ( $p < 0,05$ ) (контроль —  $1,12 \pm 0,03$  мкг / л), эти показатели также нормализуются при терапии церулоплазмином [44].

На сенсибилизированных крысах-самцах было выявлено уменьшение содержания в легочной ткани общего глутатиона с  $0,34 \pm 0,018$  мМ / г до  $0,11 \pm 0,08$  мМ / г ( $p < 0,05$ ) на 3-й день сенсибилизации и возврат показателя к 21-му дню к норме ( $0,39 \pm 0,002$  мМ / г) [23].

Было определено, что развитие сенсибилизации у морских свинок сопровождается увеличением содержания общих липидов в сыворотке крови с максимальной выраженностью на 3-и сут. сенсибилизации — до  $13,2 \pm 0,6$  мМ / л, при контроле —  $4,8 \pm 0,3$  мМ / л ( $p < 0,001$ ). На 3-и сут. сенсибилизации содержание общих липидов в большинстве исследованных тканей (мозга, миокарда, легких, печени, тонкого кишечника, селезенки, почек) было увеличено, причем наиболее существенно — в ткани мозга ( $24,6 \pm 0,8$  до  $36,7 \pm 1,9$  мкМ / г ткани,  $p < 0,001$ ) [4]. При этом содержание фосфолипидов в сыворотке

крови уменьшается на 3-и сут. на 28,1 % от величины контроля, на 12-е сут. — на 63,9 % ( $p < 0,001$ ). В тканях динамика содержания фосфолипидов была различной: на 3-и сут. в миокарде оно увеличивалось на 34 %, в печени — на 17,7 %, в почках — на 39,2 %, а в мозге, легких и селезенке, напротив, уменьшалось. На 12-е сут. содержание фосфолипидов уменьшается во всех тканях, за исключением почек [45].

При изучении содержания в крови фосфорсодержащих соединений у сенсibilизированных кроликов было выявлено уменьшение в процессе сенсibilизации неорганических фосфорсодержащих соединений: до сенсibilизации —  $6,0 \pm 1,0$  мМ / л, через 3 нед. —  $3,8 \pm 0,1$  мМ / л ( $p < 0,05$ ). Количество органических фосфорсвязанных соединений, составляющих в норме  $6,39 \pm 1,1$  мМ / л, в 1-ю нед. увеличивалось до  $10,6 \pm 0,5$  мМ / л ( $p < 0,05$ ), затем уменьшалось до  $2,6 \pm 0,5$  мМ / л ( $p < 0,05$ ) перед разрешающей инъекцией антигена. Содержание общего числа фосфорсвязанных соединений уменьшалось вдвое: от  $12,3 \pm 1,4$  мМ / л — до эксперимента, до  $6,5 \pm 0,5$  мМ / л ( $p < 0,05$ ) — на 3-ю нед. после сенсibilизации [19].

При моделировании состояния гиперреактивности дыхательных путей у крыс-самцов с помощью ингаляционного введения аллергена (овальбумина) было обнаружено дозозависимое увеличение продукции окиси азота эпителиоцитами бронхов. С нарастанием степени повреждения эпителиального пласта увеличивается ферментативная активность его клеток [46].

### Оценка бронхоконстрикторных и бронхолитических эффектов фармакопрепаратов на экспериментальных моделях

У сенсibilизированных морских свинок отмечается развитие гиперреактивности гладких мышц воздухоносных путей на воздействие гистамина, что проявляется в значительном снижении пороговых концентраций и увеличении максимальной амплитуды сокращения. Реакции на холинергические и  $\beta_2$ -адренергические воздействия при этом практически не меняются [25]. При инкубации изолированных сегментов сенсibilизированных морских свинок с ИЛ-5 наблюдается повышение реактивности сегментов на гистамин [10]. Некоторые исследователи считают, что усиление гистаминергических реакций ГМ бронхов связано с тонусом блуждающего нерва и основным большим протеином эозинофилов. В экспериментах на сенсibilизированных морских свинках выявлялось снижение гиперреактивности дыхательных путей на действие гистамина при ваготомии, блокировании притока эозинофилов и нейтрализации основного большого протеина эозинофилов [47].

На морских свинках также было изучено влияние ограничения питания на антиген-индуцированную бронхоконстрикцию, количество воспалительных

клеток и уровни кортизола и катехоламинов в плазме крови. У голодающих животных были повышены уровни эпинефрина (на 30 %) и кортизола (на 33 %), но понижен уровень норэпинефрина, наблюдалось значительное понижение (на 60 %) максимального бронхоконстрикторного ответа. У сытых и голодающих животных, которым вводили полиэтиленгликоль-400, наблюдалось снижение антиген-индуцированной бронхоконстрикции и эозинофилии [7].

Для изучения изменений электрических свойств гладкомышечных клеток (ГМК) у овальбумин-сенсibilизированных морских свинок были использованы стеклянные микроэлектроды [48]. Мембранный потенциал покоя (МПП) ГМК интактных животных составлял  $-40,4 \pm 0,5$  мВ. 27 % всех клеток показали регулярную спонтанную электрическую активность (амплитуда — 2–20 мВ). 44 % клеток показали нерегулярные флуктуации МПП, а остальные клетки не показали электрической активности. Сенсibilизация животных вызывала небольшое, но значимое ( $p < 0,001$ ) повышение МПП до  $-43,1 \pm 0,9$  мВ. Ежедневное ингалирование сенсibilизированных животных аэрозолем овальбумина в течение 2 нед. вызывало значительное уменьшение МПП до  $-27,8 \pm 0,8$  мВ ( $p < 0,001$ ). Повторяющиеся ингаляции в течение 5 нед. вызывали дальнейшее уменьшение МПП ГМК воздухоносных путей до  $-22,6 \pm 0,7$  мВ ( $p < 0,001$ ). Ответы на гистамин (0,1 мМ) и изопреналин (5 мкМ) сопровождалось изменением МПП и были более выражены в воздухоносных путях сенсibilизированных свинок. Эти исследования подтверждают, что изменения электрической активности гладкомышечных клеток при БА может играть важную роль в патогенезе заболевания.

Распределение  $\beta$ -адренергических рецепторов в легких интактных морских свинок и свинок с экспериментальной БА было исследовано с помощью аутордиографического метода [49]. У свинок с БА плотность  $\beta$ -адренорецепторов в легочной ткани была понижена, по сравнению с контролем: на 23,73 % — в гладких мышцах бронхиол, на 18,65 % — в гладких мышцах бронхов, на 23,53 % — в эпителии бронхиол, на 14,23 % — в эпителии бронхов и на 17,16 % — в альвеолярном эпителии. Снижение плотности адренорецепторов, хотя и не признается большинством авторов в качестве патогенетического механизма БА, может служить фактором, обуславливающим снижение чувствительности бронхов к катехоламинам.

*T. Takizawa* [50] показал, что новый антиаллергический препарат, 7-[3-[4-(2-хинолинилметил)-1-пиперазинил]-пропокси]-2,3-дигидро-4Н-1,4-бензоцианил-3-один (VUF-K-8788) ингибирует гиперплазию эпителиальных клеток воздухоносных путей, периваскулярный отек и эозинофильную инфильтрацию паренхимы легких овальбумин-сенсibilизированных морских свинок, а кроме того — адгезию эозинофилов на эндотелиальных клетках пупочной вены человека. Таким образом, ингибиторный эффект VUF-K-8788 на адгезию эозинофи-

лов может способствовать предотвращению поздней фазы астматического периода и инфильтрации эозинофилами в экспериментальной модели БА на морских свинках.

На сенсибилизированных нормальной сывороткой кошках изучалось влияние препарата Витурид [20]. В условиях  $\beta$ -адренергического дисбаланса, вызванного пропранололом, значительно повышается реакция на специфический антиген. При этом Витурид устраняет гиперреактивность бронхиальных мышц, наблюдается и выраженный бронхолитический эффект препарата, по сравнению с условиями ненарушенной  $\beta$ -адренергической иннервации. В основе такого действия Витурида лежит его способность повышать содержание циклического аденозинмонофосфата.

Циклоспорин А при его ингаляционном введении сенсибилизированным морским свинкам в концентрации 10–20 г/л снижал реактивность воздухоносных путей на воздействие гистамина и ацетилхолина, при этом уменьшалось количество эозинофилов в бронхоальвеолярном лаваже и при гистологическом исследовании обнаруживалось уменьшение эозинофильной инфильтрации эпителия, окружающей соединительной ткани бронхов и бронхиол [51].

## Заключение

В литературе описан целый ряд экспериментальных моделей БА у животных — морских свинок, крыс и кроликов. В качестве сенсибилизирующего агента используются натуральная лошадиная сыворотка, раствор овальбумина, цитотоксическая сыворотка и т. д. Модели применяются для изучения различных аспектов патогенеза и апробации новых способов лечения. Критериями оценки чаще всего служат активность тканевых и сывороточных ферментов, гормональный и иммунный статус, морфологические изменения тканей (таблица).

Основной проблемой остается оценка реактивности воздухоносных путей у экспериментальных животных, исследование показателей функции внешнего дыхания. В зарубежных исследованиях встречаются отдельные попытки измерения дыхательных объемов в эксперименте, но имеющиеся методы не обеспечивают необходимой точности исследований. Перспективным в данном направлении является способ косвенной оценки реактивности воздухоносных путей по показателям сократительной и электрической активности изолированных гладкомышечных сегментов трахеи и бронхов.

## Литература

1. Волонская Т.Б., Колтаков М.А. Выбор метода эффективной терапии в лечении больных бронхиальной астмой. Бюл. Сиб. отд-ния РАМН 2000; 2: 45–48.
2. Чучалин А.Г. Бронхиальная астма и астмоподобные состояния. Рус. мед. журн. 2002; 10 [5 (149)]: 232–235.
3. Волков В.Т., Стрелис А.К. Бронхиальная астма. Томск; 1996.
4. Башмаков Ю.К., Головацкий И.В. Показатели обмена общих липидов при сенсибилизации. В кн.: Проблемы патологии в эксперименте и клинике. Львов; 1986. 14–15.
5. Митина Т.В., Регада М.С. Показатели основного обмена при модели бронхиальной астмы и ее терапии церулоплазмином. В кн.: Проблемы патологии в эксперименте и клинике. Львов; 1986. 35–36.
6. Ющик Л.В. Ферментативная активность сыворотки крови морских свинок при модельном процессе бронхиальной астмы. В кн.: Проблемы патологии в эксперименте и клинике. Львов; 1986. 30–31.
7. Underwood D.C., Matthews J.K., Osborn R.R. et al. Food restriction-mediated adrenal influences on antigen-induced bronchoconstriction and airway eosinophil influx in the guinea pig. Int. Arch. Allergy Immunol. 1998; 61: 52–59.
8. Sato Y., Kishi T., Umemura T. Histopathological and immunohistochemical studies on experimental asthmatic model induced by aerosolized ovalbumin inhalation in guinea pigs. J. Toxicol. Sci. 1998; 1: 69–75.
9. Лецева И.С., Дьякова Е.Ю., Копьева А.П. и др. Влияние интерлейкина-5 на сократительную активность гладкомышечных препаратов бронхов морских свинок. В кн.: Науки о человеке. Томск; 2003. 161–162.
10. Дьякова Е.Ю., Носарев А.В., Высоких Е.В. Регуляция сократительной активности гладких мышц воздухоносных путей при модельной бронхиальной астме. В кн.: Науки о человеке. Томск; 2003. 151–152.
11. Oosterhout A.J., Lodenius A.R., Savelkoul H.F. et al. Effect of anti-IL-5 and IL-5 on airway hyperreactivity and eosinophils in guinea pig. Am. Rev. Respir. Dis. 1993; 147: 548–552.
12. Ozaki H., Hori M., Takeo J. et al. Mechanisms responsible for the in vitro relaxation of a novel dibenzothiepine derivative (NSU-242) on tracheal and vascular smooth muscles. Eur. J. Pharmacol. 2004; 19: 191–199.
13. Moffatt J.D., Cocks T.M., Page C.P. Role of the epithelium and acetylcholine in mediating the contraction to 5-hydroxytryptamine in the mouse isolated trachea. Br. J. Pharmacol. 2004; 89 (7): 1159–1166.
14. Саркисов Д.С., Ремезов П.И. Воспроизведение болезней человека в эксперименте. М.; 1960.
15. Haczk A., Takeda K., Hamelmann E. et al. CD23 exhibits negative regulatory effects on allergic sensitization and airway hyperresponsiveness. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2000; 161 (3): 952–960.
16. Jeffrey R.C., Cieslewicz G., Borchers M. et al. Early phase bronchoconstriction in the mouse requires allergen-specific IgG. J. Immunol. 2002; 168: 4050–4054.
17. Romain A. et al. Cytokine manipulation in animal models of asthma. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1997; 156 (4): 78–81.
18. Ющик Л.В. Активность некоторых ферментов ткани легких морских свинок при модельном процессе бронхиальной астмы. В кн.: Проблемы патологии в эксперименте и клинике. Львов; 1986. 26–27.
19. Базанов Г.А., Смирнов В.В., Табакова Т.Д. Некоторые показатели крови кроликов при сенсибилизации. В кн.: Проблемы патологии в эксперименте и клинике. Львов; 1986. 17–18.
20. Воробьева Т.В. Исследование бронхоспазмолитической эффективности препарата Витурид в условиях аллергического бронхоспазма. Астма 2003; 4 (1): 68.

21. Брусиловский Е.С. Экспериментальное воспроизведение бронхиальной астмы с применением пневмоцитотоксической сыворотки. В кн.: Цитотоксины в современной медицине. Киев; 1966. 155–162.
22. Jun Zou, Simon Young, Feng Zhu et al. Microarray profile of differentially expressed genes in a monkey model of allergic asthma. *BioMed. Central Ltd Genome Biol.* 2002; 3: 1–13.
23. Бурый А.А. Содержание глутатиона в ткани легких в кинетике сенсибилизации. В кн.: Проблемы патологии в эксперименте и клинике. Львов; 1986. 10–11.
24. Busse W.W., Sedgwick J.B. Eosinophils in asthma. *Ann. Allergy* 1992; 97: 286–290.
25. Капилевич Л.В., Дьякова Е.Ю., Сазонов А.Э. и др. Сократительные реакции гладких мышц воздухоносных путей при бронхиальной астме в эксперименте. *Бюл. сиб. мед.* 2003; 2 (1): 35–38.
26. Nabe T., Shinoda N., Yamashita K., et al. Leucocyte kinesis in blood, bronchoalveoli and nasal cavities during late asthmatic responses in guinea-pigs. *Eur. Respir. J.* 1998; 79 (3): 636–642.
27. Foster P.S., Hogan S.P., Ramsay A.J. et al. IL-5 deficiency abolishes eosinophilia, airway hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J. Exp. Med.* 1996; 183: 195–201.
28. Corrigan C.J., Kay A.B. T cells and eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Immunol. Today* 1992; 42: 501–507.
29. Brottman G.M., Regelman W.E., Slungaard A. et al. Effect of eosinophil peroxidase on airway epithelial permeability in the guinea pig. *Pediatr. Pulmonol.* 1996; 120 (3): 159–166.
30. Ковалишин В.И., Иванцов В.А., Ющик Л.В. Электронно-микроскопическое исследование кожи при модели бронхиальной астмы. В кн.: Проблемы патологии в эксперименте и клинике. Львов; 1986. 28–29.
31. Yang Z.W., Qin Y.H., Su S.R. Use of star volume to measure the size of the alveolar space in the asthmatic guinea-pig lung. *Respirology.* 2002; 7: 117–121.
32. Gulbenkian A.R., Egan R.W., Fernander X. et al. IL-5 mediates eosinophil accumulation in allergic guinea-pig lung. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1992; 146: 263–266.
33. Morse B., Sypek J.P., Donaldson D.D. et al. Effects of IL-13 on airway responses in the guinea pig. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2002; 282 (1): 44–49.
34. Qi H., Lu K., Wang W. The relationship between interleukin-8 and airway hyperresponsiveness in guinea pigs. *Chin. Med. J. (Engl.)* 1999; 112 (11): 985–987.
35. Schuster M., Tschernig T., Krug N. et al. Lymphocytes migrate from the blood into the bronchoalveolar lavage and lung parenchyma in the asthma model of the brown Norway rat. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000; 161 (2): 558–566.
36. Egan R.W., Athwal D., Bodmer M.W. et al. Effect of Sch 55700, a humanized monoclonal antibody to human interleukin-5, on eosinophilic responses and bronchial hyperreactivity. *Arzneimittelforschung* 1999; 45: 85–90.
37. Bi Y., Yang Z., Wang C. Correlation of eosinophil apoptosis with interleukin 5 mRNA expression in lung tissues of asthmatic guinea pigs. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 1999; 4: 228–230.
38. Wegner C.D., Gundel R.M., Reilly P. et al. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the pathogenesis of asthma. *Science* 1990; 142: 456–459.
39. Elbon C.L., Jacoby D.B., Fryer A.D. Pretreatment with an antibody to interleukin-5 prevents loss of pulmonary M<sub>2</sub> muscarinic receptor function in antigen-challenged guinea pigs. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1995; 12 (3): 320–328.
40. Lin C.C., Lin C.Y. Bronchoconstriction and eosinophil recruitment in guinea pig lungs after platelet activating factor administration. *J. Asthma.* 1997; 58 (2): 153–160.
41. Ющик Л.В. Некоторые показатели функционального состояния кожи при модельном процессе бронхиальной астмы. В кн.: Проблемы патологии в эксперименте и клинике. Львов; 1986. 25–26.
42. Ющик Л.В. Активность некоторых ферментов кожи морских свинок при модельном процессе бронхиальной астмы. В кн.: Проблемы патологии в эксперименте и клинике. Львов; 1986. 27–28.
43. Ющик Л.В., Иванцов В.А., Холин С.Е. Активность ферментов в ткани гипоталамуса и надпочечников при модельном процессе бронхиальной астмы. В кн.: Проблемы патологии в эксперименте и клинике. Львов; 1986. 31–32.
44. Регеда М.С. Влияние церулоплазмينا на содержание в крови катехоламинов при модельном процессе бронхиальной астмы. В кн.: Проблемы патологии в эксперименте и клинике. Львов; 1986. 36.
45. Башмаков Ю.К. Общее содержание фосфолипидов в тканях и крови при сенсибилизации. В кн.: Проблемы патологии в эксперименте и клинике. Львов; 1986. 15–16.
46. Елусеева Е.В. Реакция нитроксидсинтазы и тучных клеток органов дыхания при действии адренэргических веществ при бронхиальной астме: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Владивосток; 1997.
47. Richard W.C., Christopher M.E., Bethany L.Y. et al. Antigen-induced hyperreactivity to histamine: role of the vagus nerves and eosinophils. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 1999; 276 (5): 709–714.
48. McCaig D.J., Souhrada J.F. Alteration of electrophysiological properties of airway smooth muscle from sensitized guinea pigs. *Respir. Physiol.* 1980; 55: 49–60.
49. Mu J.Y., Bi S. The distribution of  $\beta$ -adrenergic receptors in guinea pig lungs and their changes in experimental allergic asthma. *Sci. China B.* 1989; 63 (10): 1208–1214.
50. Takizawa T., Watanabe C., Saiki I. et al. Effects of a new antiallergic drug, VUF-K-8788, on infiltration of lung parenchyma by eosinophils in guinea pigs and eosinophil-adhesion to human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). *Biol. Pharm. Bull.* 2001; 38 (10): 1127–1132.
51. Xie Q.M., Chen J.Q., Shen W.H. et al. Effects of cyclosporin A by aerosol on airway hyperresponsiveness and inflammation in guinea pigs. *Acta Pharmacol. Sin.* 2002; 23 (3): 243–247.

Поступила 03.03.04  
© Коллектив авторов, 2005  
УДК 616.233-009.12-056.3-092