

УДК [616.248-06^616.13]-092.4

МОДЕЛИРОВАНИЕ СОСУДИСТОЙ ДИСФУНКЦИИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ С ЭКСПОНИРОВАНИЕМ К ЭКСТРАКТУ КЛЕЩЕЙ ДОМАШНЕЙ ПЫЛИ

Т.А. Бродская¹, В.А. Невзорова¹, Б.И. Гельцер¹, Е.А. Коцюрбий¹, И.Г. Агафонова², П.А. Лукьянов²¹ Владивостокский государственный медицинский университет (690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 2),² Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН (690022 г. Владивосток, пр-т 100 лет Владивостоку, 159)**Ключевые слова:** бронхиальная астма, экспериментальное моделирование, экстракт клещей домашней пыли, мыши.

Представлены результаты экспериментального исследования с моделированием бронхиальной астмы на мышах-самцах линии BALB/c с использованием в качестве аллергена экстракта клещей домашней пыли. Исследовались системные проявления заболевания с регистрацией признаков эндотелиальной дисфункции магистральных и церебральных артерий с фиксацией результатов методом магнитно-резонансного томографического сканирования. Установлено: эндотелийзависимый констриктивный ответ мозговых артерий на фоне экспериментальной бронхиальной астмы ослабевал, а эндотелийнезависимый усиливался. Полученные результаты подтверждают возможность использования описанной модели бронхиальной астмы для изучения системных аспектов этого заболевания у человека.

Бронхиальная астма (БА) – распространенное заболевание человека, в понимании этиологии и патогенеза которого к настоящему времени достигнуты впечатляющие результаты, для которого разработаны достаточно эффективные профилактические и терапевтические подходы. Однако и сегодня открытыми остаются некоторые вопросы, связанные, в частности, с внелегочными эффектами заболевания. В одно время считалось, что БА замедляет развитие атеросклероза, в том числе коронарной локализации, противодействуя развитию ишемической болезни сердца [3]. Однако, согласно докладу GINA (2006), среди причин смертности от БА существенная роль принадлежит сердечно-сосудистым осложнениям.

В соответствии с классическими представлениями, БА – заболевание, характеризующееся гиперреактивностью дыхательных путей воспалительно-аллергической природы, лежащей в основе обратимой бронхообструкции. В то же время развитие воспалительного каскада в дыхательных путях приводит и к системному воздействию нейрогуморальной активации, факторов воспаления, оксидативного стресса, симпатомиметиков [10]. При этом трудно предположить изолированность поражения системы дыхания: описана патология сердечно-сосудистой системы, желудочно-кишечного тракта, центральной нервной системы, дисфункция эндокринных органов [7].

В изучении патогенеза БА несомненный интерес представляет адекватное моделирование процессов, происходящих при формировании этого заболевания у человека. В то же время воспроизвести слож-

ный комплекс патоморфологических и патофизиологических изменений соматического заболевания возможно только в целостном организме. Чтобы быть валидной, модель БА должна воссоздавать весь комплекс патогенеза заболевания у животных *in vivo*.

Существуют стандартные протоколы моделирования БА у животных, проведенный анализ литературы позволяет расставить здесь некоторые акценты.

Во-первых, выбор сенсibilизирующего антигена. Наиболее часто используются протеины, в частности овальбумин, что обусловлено его доступностью, эффективностью и невысокой стоимостью [9]. Реже для сенсibilизации применяют экстракты распространенных аллергенов, такие как *Aspergillus fumigatus* extract, *House dust mite* extract (экстракт клещей домашней пыли) или собственно микроорганизмы (*Schistosoma mansoni* egg и др). Экспертами Европейского респираторного общества в 2005 г. было подчеркнуто, что при моделировании БА предпочтительно использование аллергена, патогенетически значимого для развития заболевания у человека, – экстракта клещей домашней пыли, пыльца растений или *Aspergillus fumigatus* [9]. Однако по сравнению с овальбумином использование патогенетически значимых для человека антигенов ограничивается прежде всего их высокой стоимостью, а также трудностями стандартизации и дозирования.

Вторым принципиальным моментом является выбор вида и породы (линии) животных. О выгоде использования в качестве экспериментального материала мышей говорят многие объективные факторы: большое сходство патогенетических иммунных механизмов экспериментальной БА с БА у человека, детальная изученность анатомии, физиологии и генома этих животных, короткий жизненный цикл и низкая стоимость содержания [12]. Выбор линии животных зависит от антигена, которому отдается предпочтение. Так, например, для хронических моделей БА часто используют мышей линии A/J, в эксперименте с *A. fumigatus* рекомендуют мышей линии Bl/6, при сенсibilизации к экстракту клещей домашней пыли – линии C57Bl/6 и Balb/c [9]. Использование мышей линии Balb/c в большинстве протоколов связано с более высоким содержанием у них иммуноглобулина Е и формированием интенсивного воспалительного процесса в дыхательных путях с высоким уровнем гиперреактивности бронхов [8].

¹ Бродская Татьяна Александровна – канд. мед. наук, ассистент кафедры терапии ФПК и ПП ВГМУ; тел.: 8 (4232) 42-98-13; e-mail: brodskaia@mail.ru

И третье – выбор протокола сенсibilизации. Им должна быть воспроизведена последовательность событий, приводящая к сенсibilизации к аллергену и индукции персистирующего аллергического воспаления в воздухоносных путях (например, повторные инъекции аллергена в комплексе с адъювантом, подобным солям алюминия, или повторяющиеся вдыхания аэрозоля на протяжении недель) [9]. Прекрасный обзор доступных современному ученому протоколов аллергической сенсibilизации был сделан С.М. Lloyd [14]. Протоколы острой сенсibilизации очень эффективны в моделировании острого воспаления и гиперреактивности воздушных путей, в основе которых лежит активация Т-хелперов 2-го типа и эозинофилов. Однако более предпочтительны протоколы хронической аллергической сенсibilизации, когда многократные вдыхания антигенного аэрозоля приводят к индукции длительного (хронического) аллергического воспаления в воздушных путях с их ремоделированием, а также некоторых системных эффектов [11, 13].

Целью данной работы было воспроизведение и описание *in vivo* модели БА у мышей с патогенетически значимым для человека аллергеном – экстрактом клещей домашней пыли.

Материал и методы. Исследование проведено на 40 мышках-самцах линии BALB/c 6–8-недельного возраста весом $23,1 \pm 1,6$ г. Животные содержались в стандартных условиях вивария при естественном световом режиме и свободном доступе к воде и пище. Животные были разделены на две группы: экспериментальная (30 особей) и контрольная (10 особей). Моделирование БА проводилось по протоколу сенсibilизации аллергенами домашней пыли [11].

Дизайн исследования включал в себя два основных этапа. Исходно все животные подвергались магнитно-резонансному томографическому сканированию с целью верификации сохранности вазомоторной функции и выборочно (5 мышей) – морфологическому исследованию для подтверждения отсутствия патологических изменений в легких. Далее в экспериментальной группе моделировалась БА. Моделирование проводилось по протоколу хронической сенсibilизации к экстракту клещей домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus* («Биомед им. И.И. Мечникова», Россия). Экспозиция к аллергену осуществлялась ингаляционным путем в специальной камере с помощью ультразвукового небулайзера («Муссон-1М», Россия) с диаметром аэрозольных частиц 2–5 мкм в течение 20 мин один раз в день при концентрации 200 мкг белкового эквивалента аллергена. Интервалы между сенсibilизирующими воздействиями: по 5 дней экспозиции и 2 дня перерыва на протяжении 7 недель.

На втором этапе эксперимента, на 50–52-й день, всем животным выполнялось магнитно-резонансное сканирование с вазоактивными фармакологическими пробами. Выборочно, для повышения репрезентативности у 10 животных вазомоторная функция

исследовалась повторно. Развитие экспериментальной БА верифицировалось путем гистологической регистрации аллергического воспаления и ремоделирования в дыхательных путях у всех животных экспериментальной группы.

Системные проявления БА, в частности признаки системной эндотелиальной дисфункции, были зафиксированы с помощью магнитно-резонансного томографического сканирования магистральных и церебральных артерий на томографе для экспериментальных исследований PharmaScan US 70/16 (Bruker, Германия) с напряженностью магнитного поля 7,0 тесла, частотой 300 МГц и катушкой типа BGA 09P по стандартной методике. Томография выполнялась с фиксацией животных раствором рометара (Xylazineum – Spora, Прага) в концентрации 5,5 мг/кг и обездвиживанием раствором реланиума (37 мг/кг, внутривенно). Определяли анатомо-томографическое строение магистрального и церебрального русла кровеносной системы. Послойные срезы во фронтальной, сагитальной и горизонтальной плоскостях с получением T2-томограмм и томограмм, взвешенных по протонной плотности, проводили с применением импульсной последовательности RARE_8, MSME, 3DTOF. Окципитальная трехмерная конструкция сосудистого бассейна выполнялась на лицензионном программном обеспечении ParaVision 3.0.2 (Bruker, Германия).

Изучение вазомоторных реакций осуществляли с использованием фармакологических тестов: эндотелийзависимая вазодилатация – ацетилхолиновый, эндотелийнезависимая вазодилатация – нитроглицериновый, эндотелийзависимая вазоконстрикция – N-монометил-L-аргининовый (L-NMMA), эндотелийнезависимая вазоконстрикция – норадреналиновый [5]. Интерпретация тестов заключалась в непосредственном измерении диаметра средней мозговой и сонной артерий с использованием двух точек, устанавливаемых томографическим курсором: первой – на границе «адвентиция–медия» латеральной стенки артерии, второй – на границе «медия–адвентиция» медиальной стенки до и после теста. Величину вазомоторной реакции оценивали в процентном отношении изменения диаметра артерии в течение теста к значениям в покое.

Результаты обрабатывались по правилам вариационной статистики с использованием пакета программы Excel 2003. Достоверность различий между группами вычисляли по критерию Стьюдента (достоверным считали значение критерия при $p < 0,05$).

Результаты исследования. Ключевым звеном патогенеза БА является хронический воспалительный процесс в дыхательных путях [4]. В экспериментальной группе животных регистрировались морфологические проявления аллергического характера, которые выражались в диффузной полиморфно-клеточной лейкоцитарной инфильтрации с преобладанием нейтрофильного и эозинофильного компонентов.

Таблица

Вазомоторная функция церебральных и магистральных артерий у мышей с экспериментальной БА ($M \pm m$)

Показатель ¹	Церебральные артерии		Магистральные артерии	
	контроль	БА	контроль	БА
Исходный диаметр, мм	0,19±0,02	0,20±0,02	0,34±0,01	0,35±0,02
ЭЗВД, %	4,26±0,88	8,75±1,32 ²	7,33±0,64	11,6±0,34 ²
ЭНЗВД, %	15,07±2,42	5,26±0,93 ²	20,86±1,88	7,1±0,04 ²
ЭЗВК, %	-11,49±0,93	-6,25±0,84 ²	-20,65±1,04	-25,6±1,34 ²
ЭНЗВК, %	-8,08±0,83	-11,18±0,91 ²	-25,50±1,31	-13,15±1,18 ²

¹ ЭЗВД – эндотелийзависимая вазодилатация (ацетилхолиновый тест), ЭНЗВД – эндотелийнезависимая вазодилатация (нитроглицериновый тест), ЭЗВК – эндотелийзависимая вазоконстрикция (L-NMMA-тест), ЭНЗВК – эндотелийнезависимая вазоконстрикция (норадрениновый тест).

² Различие с контролем статистически значимо.

Просветы терминальных бронхов были неправильной формы за счет пролиферации соединительнотканых элементов и утолщения мышечной оболочки. В слизистой оболочке долевых и сегментарных бронхов обнаруживалась пролиферация эпителиоцитов с формированием ложных сосочков. На всем протяжении в просвете кондукторного отдела легких регистрировались гомогенные розовые массы, среди которых располагались комплексы десквамированных эпителиальных клеток (рис.).

Помимо констатации и верификации аллергического воспаления и ремоделирования в дыхательной системе мышей, одной из задач нашего исследования являлся поиск признаков системных нарушений, в частности, системной дисфункции церебральных и магистральных артерий. Так, исходно при анализе результатов магнитно-резонансного томографического сканирования сосудов в группе экспериментальной БА выявлена определенная тенденция к увеличению диаметра их просвета, по сравнению с аналогичными величинами у интактных животных для соответствующих областей.

В ответ на введение ацетилхолина у мышей просвет сосудов увеличивался, причем у мышей с БА происходила чрезмерная релаксация артерий как в церебральном, так и в каротидном бассейнах, и она превышала контрольную в 2,1 и 1,6 раза. При использовании нитроглицерина вазодилатация в обоих отделах сосудистого русла достоверно снижалась – в 3 раза по сравнению с контролем (табл.).

Таким образом, у мышей с экспериментальной БА при сходных размерах первоначального диаметра просвета сосудов по сравнению с контрольной группой выявлено усиление эндотелийзависимой и сокращение эндотелийнезависимой вазодилатации. Следовательно, дилатационное звено вазомоторного аппарата при БА чрезмерно активировано, с наибольшей манифестацией в церебральном бассейне за счет эндотелийзависимого механизма. При этом миогенная ди-

латация была равномерно ингибирована в магистральных и мозговых артериях. Можно предположить увеличение степени релаксации гладких мышц сосудистой стенки вследствие эффективного ответа холинергического аппарата со стимуляцией цГМФ-механизма, приводящего к повышенной экспрессии оксида азота сосудистым эндотелием [1].

Полученные факты соответствуют известным в современной литературе сведениям о повышенной концентрации оксида азота в периферической крови при БА и усиленном его выделении с выдыхаемым воздухом в поздней фазе ответа на аллерген, когда противовоспалительные цитокины вызывают экспрессию индуцибельной нитроксидсинтазы [2, 4]. В то же время, по мнению некоторых авторов, патогомоничная для обострения БА гипоксия, вызванная вентиляционными нарушениями, инициирует снижение восприимчивости гладкомышечных клеток сосудов к нитровазодилаторам [6].

При анализе констрикторного звена вазомоторной функции сосудистого эндотелия также установлено наличие достоверных различий между группами. Так, при экспериментальной БА вазоконстрикторный эффект ослабевал в 1,8 раза. При введении L-NMMA сужение сонной артерии у мышей в группе БА превосходило контрольные показатели в 1,3 раза. Степень уменьшения просвета церебральных сосудов на введение норадренина при экспериментальной БА усиливалась в 1,4 раза. В магистральных сосудах эндотелийзависимая вазоконстрикция у мышей с БА уменьшалась в 1,9 раза (табл.).

Обсуждение полученных данных. Установлено, что эндотелийзависимый констрикторный ответ мозговых

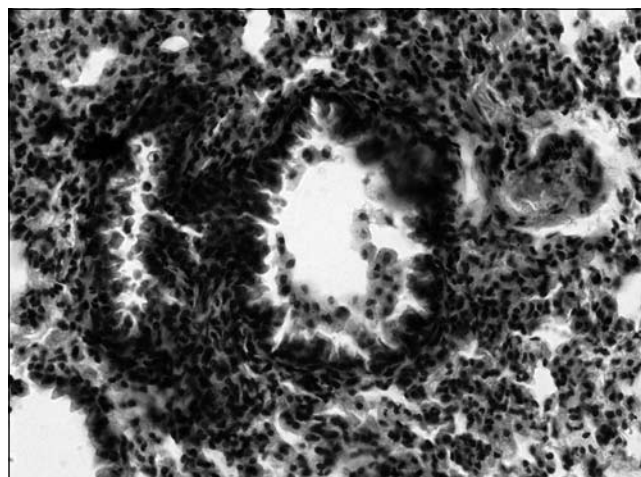


Рис. Срез легкого экспериментального животного.

Диффузная полиморфно-клеточная лейкоцитарная инфильтрация в стенке бронха и окружающей ткани. Проплиферация эпителиоцитов с формированием псевдососочковых выростов. В просвете бронха десквамированные альвеолоциты. Окр. гематоксилином и эозином, $\times 200$.

артерий на фоне экспериментальной БА ослабевал, а эндотелийнезависимый усиливался по сравнению со здоровыми животными. Одновременно в магистральном бассейне процессы были диаметрально противоположные по направлению и степени выраженности.

Выявленное в нашем исследовании усиление эндотелийзависимой вазоконстрикции сонных артерий у мышей с экспериментальной бронхиальной астмой было описано в ряде клинических работ у больных бронхиальной астмой и связывалось с компонентами системного воспалительного ответа и легочной гипертензией, ассоциированных с повышенной выработкой поврежденными эндотелиоцитами эндотелина-1, снижением синтеза простаглицина, а также дефицитом резервов эндогенного оксида азота [4, 15]. При этом зарегистрированное ослабление эндотелийзависимой вазоконстрикции может быть индуцировано повышенной активностью нитрооксидергической системы эндотелия мозговых сосудов, что обусловлено известной ауторегуляцией церебральных сосудов. В то же время прирост эндотелийнезависимой вазоконстрикции церебральных артерий, возможно, связан с регистрируемым региональным увеличением плотности α_1 -адренорецепторов мембраны эндотелиоцитов, чувствительных к экзогенному норадреналину [1].

Итак, при экспериментальной бронхиальной астме имеют место локальные проявления заболевания в форме аллергического воспаления и ремоделирования дыхательных путей. Развитие бронхиальной астмы у мышей характеризуется также эндотелиальной дисфункцией сосудов церебрального и магистрального бассейнов с достоверным преобладанием констрикции сонных и усилением дилатации мозговых артерий, а также региональным своеобразием регуляции циркуляторного гомеостаза.

Таким образом, воспроизведение *in vivo* модели бронхиальной астмы под воздействием хронической сенсибилизации к аллергенам клещей домашней пыли характеризуется не только достоверным развитием локальных легочных признаков бронхиальной астмы, но и системных проявлений этого заболевания – в частности, системной дисфункции сосудистого эндотелия. Полученные результаты подтверждают возможность успешного использования описанного способа *in vivo* моделирования бронхиальной астмы у мышей с экстрактом клещей домашней пыли для изучения различных, в том числе системных аспектов этого заболевания у человека.

Литература

1. Ананьев В.Н., Манухин Б.Н., Ананьева О.В. Адрено- и холинореактивность системного и регионального кровоснабжения при адаптации к холоду. М.: КРУК, 2002. 132 с.
2. Блажко В.И., Ефимов В.В., Бондарь Т.Н., Талай И.В. Роль оксида азота в адаптации к гипоксии у больных хроническими обструктивными заболеваниями легких // Укр. тер. журнал. 2005. № 2. С. 50–55.
3. Бродская Т.А., Гельцер Б.И., Невзорова В.А., Моткина Е.В.

Клинико-функциональная оценка артериальной ригидности при бронхиальной астме // Клини. мед. 2007. № 6. С. 17–23.

4. Бродская Т.А., Невзорова В.А., Гельцер Б.И., Моткина Е.В. Дисфункция эндотелия и болезни органов дыхания // Тер. архив. 2007. № 3. С. 76–84.
5. Гельцер Б.И., Котельников В.Н., Агафонова И.Г., Лукьянов П.А. Неинвазивное исследование вазодилатирующей активности церебральных артерий белой крысы // Бюл. экспер. биол. и мед. 2005. № 11. С. 587–591.
6. Манак Н.А., Козич И.А., Карпова И.С. Патогенетические механизмы толерантности к нитратам и возможные пути коррекции // Кардиология СНГ. 2003. № 5. С. 26–29.
7. Федосова Н.Н., Цюрюпа В.Н., Власова И.В. Церебральная гемодинамика и электроэнцефалографические показатели у больных бронхиальной астмой // Ультразвук. и функц. диагностика. 2005. № 3. С. 72–77.
8. Хаитов М.Р. Рекомбинантные аллергены. Стратегия создания алерговакцин нового поколения // Российский алергологический журнал. 2004. № 1. С. 28–31.
9. Braun A. Models to mimic allergic asthma using house dust mite or *Aspergillus fumigatus* in mice: advantages and disadvantages // Experimental models for COPD and asthma. 15 ERC. Copenhagen, 2005. P. 97–115.
10. Iribarren C., Tolstykh I.V., Eisner M.D. Are patients with asthma at increased risk of coronary heart disease? // Int. J. Epidemiol. 2004. Vol. 33, No. 4. P. 743–748.
11. Johnson J.R., Wiley R.E., Fattouh R. et al. Continuous Exposure to House Dust Mite Elicits Chronic Airway Inflammation and Structural Remodeling // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2004. Vol. 169, No. 3. P. 378–385.
12. Joos G.F. Cigarette smoke in mice, rats and guinea-pigs: value to the study of pathogenic factors involved in COPD // Experimental models for COPD and asthma. 15 ERC. Copenhagen, 2005. P. 9–38.
13. Kumar R.K., Foster P.S. Modeling allergic asthma in mice: pitfalls and opportunities // Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 2002. Vol. 27, No. 3. P. 267–272.
14. Lloyd C.M., Gonzalo J.A., Coyle A.J., Gutierrez-Ramos J.C. Mouse models of allergic airway disease // Adv. Immunol. 2001. No. 77. P. 263–295.
15. Nikolaou E., Trekada G., Prodromakis E. et al. Evaluation of artery endothelin-1 levels, before and during a sleep study, in patients with bronchial asthma and COPD // Respiration. 2003. No. 6. P. 606–610.

Поступила в редакцию 17.07.2008.

SIMULATING VASCULAR DYSFUNCTION IN CASE OF EXPERIMENTAL BRONCHIAL ASTHMA EXPOSED TO HOUSE DUST MITE EXTRACT

T.A. Brodskaya¹, V.A. Nevzorova¹, B.I. Geltser¹, E.A. Kotsurbiy¹, I.G. Agafonova², P.A. Lukianov²

¹ Vladivostok State Medical University (2 Ostryakova Av. Vladivostok 690950 Russia), Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS (159 100 Ann. of Vladivostok Av. Vladivostok 690022 Russia)

Summary – The authors present results of experimental study supplemented by simulation of bronchial asthma on male BALB/c mice using house dust mite extract as incitant of allergy. The study is aimed to research into the system manifestations of the disease and detect signs of endothelial dysfunction of magistral and cerebral arteries needed to record results by MRT scanning. As reported, the endothelium-dependent constrictive response of brain arteries against the bronchial asthma decreases, while the endothelium-independent one increases. The findings allow confirming the probability of applying the described bronchial asthma simulation to study system aspects of this disease in humans.

Key words: bronchial asthma, experimental simulation, house dust mite extract, mice.

Pacific Medical Journal, 2009, No. 4, p. 64–67.