

**РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ
ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ
ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЛЁГКИХ**

К.С. Колбасов, В.А. Кашуро, М.В. Мелихова

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства»,
192019, г. Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, д. 1, (812) 365-06-80, institute@toxicology.ru*

В результате экспериментов на белых крысах с использованием комбинированного хронического ингаляционного воздействия пылью и длительной сенсibilизации подкожным введением сывороточного альбумина разработана экспериментальная модель, воспроизводящая основные звенья патогенеза хронических неспецифических заболеваний лёгких. Разработанная модель может быть использована для изучения хронических неспецифических заболеваний лёгких и оценки эффективности лечебно-профилактических мероприятий.

Ключевые слова: экспериментальная модель; хронические неспецифические заболевания лёгких; запыление; лечение; «Сальбуфен»; крысы.

**DEVELOP EXPERIMENTAL MODEL FOR EVALUATING THE EFFECTIVENESS
OF MEDICATIONS AT CHRONIC NONSPECIFIC LUNG DISEASES**

K.S. Kolbasov, V.A. Kashuro, M.V. Melikhova

Federal State Institution of Science

"Institute of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency"

As a result of experiments on white rats using a combined chronic inhalation exposure to dust and prolonged sensitization by subcutaneous injection of serum albumin developed an experimental model that reproduces the main pathogenesis of chronic nonspecific lung diseases. The developed model can be used to study chronic nonspecific lung diseases and assess the effectiveness of treatment and prevention.

Keywords: experimental model; chronic nonspecific lung diseases; dusty conditions; treatment; «Salbufen»; rat.

Введение

Проблема хронических неспецифических заболеваний лёгких (ХНЗЛ) в настоящее время является актуальной из-за широкого распространения среди трудоспособного населения. Неуклонное прогрессирование болезни, частое сочетание данной патологии с другими заболеваниями, развитие тяжёлых осложнений приводят к стойкой потере трудоспособности и смерти [1]. ХНЗЛ представляет собой значительную экономическую и социальную проблему, которая пока не имеет тенденции к улучшению. Это связано не только с широким распространением простудных и аллергических заболеваний бронхо-лёгочного аппарата, но и с возрастающим загрязнением атмосферного воздуха промышленными поллютантами (пыль, аэрозоли, вредные промышленные газы). Многие исследователи акцентируют внимание именно на воздействии негативных факторов, загрязняющих окружающую среду, под влиянием которых от внутриутробного развития человека до его старости происходит кумуляция клеточных повреждений на генном уровне, что может приводить к развитию ХНЗЛ [2, 3].

В патогенезе ХНЗЛ наибольшую роль играют хронический воспалительный процесс, дисбаланс протеиназ и антипротеиназ в лёгких, оксидативный стресс. Воспаление при ХНЗЛ носит не только местный, но и системный характер, что связано с увеличением количества и изменением функции циркулирующих воспалительных клеток, повышением уровня провоспалительных цитокинов и белков острой фазы, а также оксидантов, обуславливающих развитие окислительного стресса и системной эндотелиальной дисфункции [4, 5, 6].

По частоте летальных исходов ХНЗЛ занимает четвертое место в мире в возрастной группе старше 45 лет, и этот показатель продолжает расти [2, 7, 8]. Лечение этих заболеваний представляет собой длительный и сложный процесс. Поэтому весьма актуальными задачами являются разработка адекватных и воспроизводимых экспериментальных моделей ХНЗЛ и испытание на них новых перспективных препаратов. Исходя из этого, целями настоящей работы являлись разработка воспроизводимой модели ХНЗЛ и испытание на ней эффективности рецептуры нового перспективного препарата «Сальбуфен».

Материалы и методы

Моделирование ХНЗЛ на крысах осуществляли комбинированным хроническим ингаляционным воздействием пыли и длительной сенсibilизацией подкожным введением сывороточного альбумина [9, 10].

Для запыления животных использовали мелкодисперсную растительную пыль комбикорма. Динамическое ингаляционное воздействие пылью осуществляли на протяжении 2 месяцев ежедневно по 4 часа в стандартных камерах производства Казанского СКТБ–МПФ объемом 100 л. Внутри каждой камеры помещен вентилятор, поддерживающий пылевую атмосферу. Одна камера может обеспечить одновременную ингаляцию до 30 крыс или морских свинок способами «только голова» или «животное целиком». Режим камер – динамический, т.е. обеспечиваются принудительно приток и отток воздуха. Поэтому возможны длительные, в том числе и хронические заправки. Дозируется пыль специальным дозатором вибрационного типа, устанавливаемом над отверстием в крышке камеры.

В качестве перспективного препарата была испытана рецептура с условным названием «Сальбуфен», разработанная совместно учреждениями ФМБА России — ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства» и ФГУП НИЦ «Фармзащита» ФМБА России.

«Сальбутен» – новый комбинированный препарат, сочетающий в себе преимущества применения β_2 -адреномиметика короткого действия сальбутамола сульфата и Н-холинолитика Педифена. Форма выпуска в виде дозированного спрея обуславливает удобство применения, хранения и транспортировки комбинированного препарата.

Сальбутамола сульфат (2-трет-бутиламино-1-(4-окси-3-оксиметил-фенил)-этанол) – короткодействующий селективный агонист β_2 -адренорецепторов, стимулирует β_2 -адренорецепторы бронхов, кровеносных сосудов, практически не оказывает действия на β_1 -адренорецепторы сердца.

Высокоселективно стимулирует β_2 -адренорецепторы, активирует внутриклеточную аденилатциклазу. Бронхолитический эффект обусловлен расслаблением гладкой мускулатуры бронхов. Сальбутамол не разрушается лёгочной катехол-О-метилтрансферазой и поэтому действует длительно. При ингаляции 10–20% достигает мелких бронхов и постепенно всасывается, часть дозы после проглатывания абсорбируется из ЖКТ. Максимальная быстрота действия (снятие бронхоспазма) достигается при ингаляционном пути введения. Тормозит выброс медиаторов воспаления из тучных клеток и базофилов, в частности анти-IgE-индуцированный выброс гистамина, устраняет антигензависимое подавление мукоцилиарного транспорта и выделение фактора хемотаксиса нейтрофилов. Предупреждает развитие индуцированного аллергеном бронхоспазма. Может вызывать десенситизацию и редукцию числа бета-адренорецепторов, в т.ч. на лимфоцитах. Обладает рядом метаболических эффектов — снижает содержание калия в плазме, влияет на гликогенолиз и выделение инсулина, оказывает гипергликемический (особенно у пациентов с бронхиальной астмой) и липолитический эффект, увеличивает риск развития ацидоза.

Педифен (N,M-диэтил-5,5-дифенил-2-пентиламина гидрохлорид) представляет собой ацетиленовый амин с молекулярной массой 327,9. Очень хорошо растворим в воде, в 96% спирте, хлороформе. В водных растворах стабилен. Нерастворим в эфире.

Педифен является антиоксидантом. В опытах *in vitro* было показано, что Педифен примерно в 10 раз превосходит аскорбиновую кислоту, уступая по активности токоферолу. Введение Педифена «интактным» животным сопровождается снижением свободно-радикального окисления тканей и повышением их антиокислительной активности. Предупреждает активацию перекисного окисления липидов (ПОЛ). У Педифена обнаружены и мембраностабилизирующие свойства, которые, возможно, также связаны с его антиокислительной активностью. Обладает стимулирующим воздействием

на центральную нервную систему, выраженной спазмолитической активностью, превышая папаверин в 6,5 раз по данному показателю. Обладает выраженным местно-анестезирующим действием. При изучении терминальной анестезии установлено, что по активности он не уступает дикаину, а при проводниковой превосходит новокаин.

Перечисленные выше фармакологические свойства салбутамола сульфата и Педифена, взаимное потенцирование действия веществ при комбинированной терапии и удобство ингаляционного введения комбинированного препарата являются неоспоримыми преимуществами комбинированного препарата «Сальбуфен».

Каждая экспериментальная группа включала по 10 крыс одного пола средней массы 180 – 200 г. Комбикорм предварительно растирали до мелкопылевой дисперсности (типа пудры). Подача воздуха в камеры составляла 60 л/мин. С помощью пылевых распылителей марки РПВ в каждой камере достигали концентрации пыли, приблизительно равные 10 мг/м^3 , которые контролировали гравиметрически путем взвешивания фильтров марки ФП с рабочей площадью 10 см^2 после прохождения воздуха через фильтр с объемной скоростью 20 л/мин в течение 20 минут.

Для усиления сенсibilизации с целью провоцирования бронхиальной обструкции животным опытных и контрольной групп осуществлялось подкожное введение сывороточного альбумина в дозе $0,1 \text{ мг/кг}$ с 1 по 45 день затравки с интервалом в 2 суток. Группе интактных крыс, ежедневно помещаемых на 4 часа в камеру без запыления, подкожно вводился физиологический раствор в том же объеме — $0,1 \text{ мл/100 г}$. На 46 день сенсibilизации животные всех групп, исключая интактных, подвергались ингаляционному воздействию аэрозоля сывороточного альбумина в концентрации $0,5 \text{ мг/м}^3$ в течение 5 минут. Это сопровождалось развитием практически у всех крыс выраженной экспираторной одышки. Если контакт с антигеном не прекращали, то животные могли погибнуть в камере в течение 20 минут в асфиктических судорогах. Поэтому сразу после 5 минутного ингаляционного воздействия сывороточным альбумином крысы извлекались из камеры.

Все группы животных были рандомизированы по полу и массе и пронумерованы:

1 – интактная ($n = 10$);

2 – контрольная ($n = 20$) – запыление + сенсibilизация;

3 – опытная ($n = 10$) – запыление + сенсibilизация + «Сальбуфен» в дозе 25 мг/кг .

В ходе эксперимента оценивались следующие показатели: выживаемость, общее состояние и поведение животных, потребление ими корма и воды, динамика массы тела

(еженедельное взвешивание на весах ВЛР-500), уровень бронхиальной обструкции и другие показатели дыхания по пневмотахограмме.

В конце эксперимента у животных после эвтаназии состояние паренхимы лёгких оценивали по следующим показателям:

–соотношению в бронхоальвеолярных смывах (БАС) альвеолярных макрофагов (АМ) и нейтрофильных лейкоцитов (НЛ) по Б.А. Кацнельсону [11];

–активности лёгочных сурфактантов БАС по величине поверхностного натяжения (ПН) [12];

–величинам ВКЛ;

–содержанию в гомогенатах тканей лёгких малонового диальдегида (МДА) [13], аскорбиновой кислоты (АК) [14] и восстановленного глутатиона (Г-SH) [15];

–морфологической и гистологической картинам (лёгкие фиксировали в 15% формалине и заливали в парафин; срезы окрашивали гематоксилин-эозином).

Интенсивность аллергического и воспалительного процессов в лёгких оценивали, анализируя венозную кровь, которую получали пункцией хвостовой вены крыс до их декапитации в конце эксперимента. Определялись следующие показатели:

–активность кислой и щелочной фосфатаз (КФ, ЩФ), содержание общего белка с помощью наборов Био-Ла-Тест чешской фирмы «Лакхема»;

–белковые фракции – электрофорезом на бумаге; С-реактивный белок (СРБ); сиаловые кислоты; скорость оседания эритроцитов (СОЭ); содержание лейкоцитов и лейкоцитарную формулу общепринятыми методами [16].

Статистическая обработка результатов предусматривала оценку значимости различий средних с использованием t-критерия Стьюдента для несвязанных выборок.

Результаты

Результаты экспериментов представлены в таблице 1.

В группе животных, не получавших ингаляционной терапии, все показатели, характеризующие состояние бронхов и лёгких, свидетельствовали об активном течении воспалительного и аллергического процессов. Выраженными были бронхообтурация, клеточные и метаболические сдвиги: показатель бронхообструкции снизился в среднем на 30%, отношение НЛ/АМ увеличилось в 4 раза, ПН_{БАС} возросло почти в 3 раза, в 1,5 раза увеличился ВКЛ, почти в 2 раза увеличилось содержание малонового диальдегида в гомогенатах тканей лёгких.

Таблица 1 – Показатели, характеризующие состояние бронхо-лёгочной системы экспериментальных животных, при моделировании ХНЗЛ и применении препарата «Сальбуфен»

Показатели и единицы их измерения	Экспериментальные группы		
	1	2	3
Выживаемость, пало/всего	0/10	6/20	2/10
Масса тела, г	220±10	190±15*	195±10*
Показатель бронхообструкции, вдох/выдох	0,65±0,05	0,44±0,06*	0,48±0,07*
Отношение НЛ/АМ	0,54±0,11	2,16±0,45*	1,47±0,33*
ПН _{БАС} , мН/м	20,2±0,4	56,2±1,2*	48,5±1,5*
ВКЛ, мг/100 г массы тела	6,5±0,5	9,5±0,5*	8,6±0,4*
МДА, нмоль/мг белка	3,65±0,72	6,62±0,46*	5,14±0,81*
АК, мкг/мг белка	4,12±0,34	2,13±0,52*	2,28±0,46*
Г-SH, мкг/мг белка	5,16±0,45	2,18±0,44*	2,48±0,27*
КФ, мккат/л	0,75±0,11	2,01±0,28*	1,26±0,27*
ЩФ, мккат/л	0,68±0,12	1,46±0,24*	1,11±0,07*
Общий белок сыворотки, г/л	64±2	60±4	60±3
Альбумины, г/л	41±5	28±3*	36±2
Глобулины, г/л	23±3	32±2*	24±5
СРБ, ±	–	+++	++
Сиаловые кислоты, ммоль/л	1,65±0,25	4,27±0,45*	3,16±0,81*
СОЭ, мм/ч	4,1±0,2	12,2±0,3*	8,1±0,3*
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	7,6±0,7	13,4±0,3*	9,3±0,5*
Сегментоядерные нейтрофилы, %	13±2	5±1*	6±2*
Палочкоядерные нейтрофилы, %	2±1	7±1*	5±1*
Лимфоциты, %	72±4	51±3*	62±3*
Эозинофилы, %	3±1	9±2*	7±1*
Примечание – * – Достоверные отличия от интактных животных (группа №1) при p < 0,05			

В данной экспериментальной группе в 2 раза снизилось содержание аскорбиновой кислоты и восстановленного глутатиона, достоверно увеличилась активность кислой и щелочной фосфатаз. Кроме этого, наблюдалось достоверное увеличение показателей

воспалительного и аллергического процессов: содержания глобулинов, СРБ, сиаловых кислот, СОЭ, лейкоцитов. Наблюдались палочкоядерный сдвиг влево, лимфоцитопения и эозинофилия. При просмотре гистологических препаратов лёгких отмечались полнокровие сосудов всех калибров, одиночные кровоизлияния, мелкоочаговый отек, воспалительные инфильтрации. Просвет мелких и средних бронхов был сужен, слизистая бронхов имела фистончатый вид.

Животные, получавшие ингаляции препарата «Сальбуфен», практически не отличались от интактных особей. Показатели, характеризующие состояние бронхо-лёгочного аппарата, возвращались к нормальным величинам: ликвидировалась бронхообтурация, уменьшалось количество НЛ и возрастало количество АМ, повышалась активность сурфактантной системы лёгких (уменьшалось ПН_{БАС}), увеличивалась активность антирадикальной системы, а прооксидантные эффекты нивелировались. Это подтверждалось и гистологическими данными: у животных практически отсутствовали структурные изменения лёгких.

Выводы

1. Полученные результаты свидетельствуют о формировании адекватной модели для изучения эффективности лекарственных средств при ХНЗЛ.

2. Результаты демонстрируют высокую эффективность ингаляционного применения препарата «Сальбуфен». Прежде всего, необходимо отметить, что в экспериментальной группе без лечения 6 из 20 животных погибли в ходе опыта, а при лечении — пало 2 животных из 10.

3. Разработанная модель позволяет изучать патогенез профессиональных заболеваний лёгких и оценивать на ней эффективность лечебно-профилактических мероприятий. С помощью данной модели показано, что ингаляционное применение рецептуры оказалось эффективным при экспериментальном моделировании ХНЗЛ.

Литература

1. Клинические рекомендации. Хроническая обструктивная болезнь лёгких / Под ред. А.Г. Чучалина. – М., 2003. – 225 с.

2. Чучалин А.Г. Глобальная стратегия диагностики, лечения и профилактики хронической обструктивной болезни лёгких: пер. с англ. – М.: Издательский дом «Атмосфера», 2007. – 96 с.

3. MacNee W. Oxidants/antioxidants and COPD //Chest. – 2000. – Vol. 117, №2. – P. 303–317.
4. Barnes P.J. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease // Pharmacol. Rev. – 2004. – Vol. 56, №4. – P. 515–548.
5. MacNee W. Oxidants/antioxidants and COPD // Chest. – 2000. – Vol. 117, №2. – P. 303–317.
6. The association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis / W.Q. Gan, S.F. Man, A. Senthilselvan, D.D. Sin // Thorax. – 2004. – Vol. 5. – P. 574–580.
7. Авдеев С.Н. Обострение хронической обструктивной болезни лёгких: современные подходы к диагностике и лечению // Терапевт. архив. – 2004. – №11. – С. 43–50.
8. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: Updated 2014. – Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, Inc., 2014. – 102 p.
9. Руководство по пульмонологии. / Под ред. Н.В. Путова и Г.Б. Федосеева. – Л., 1978. – 367 с.
10. Методы определения токсичности и опасности химических веществ. / Под ред. И.В. Саноцкого. – М., Мед-на, 1970. – 343 с.
11. Кацнельсон Б.А. Профессиональные болезни полевой этиологии. – М., 1986. – 235 с.
12. Колбасов С.Е. Использование метода определения активности сурфактанта лёгких для изучения токсичности химических веществ при ингаляционном воздействии. Гигиеническая токсикология металлов. – М., 1983. – С. 92-96.
13. Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот. Современные методы в биохимии. – М., Мед-на, 1977. – С. 62-64.
14. Novikov N.I., Preobrazjenskaya T.N. Adult respiratory distress syndrom - the necessity of differential approach to prophylaxis // Curr. Toxicol. – 1993. – Vol.1, №1. – P. 1-6.
15. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен). Под ред. М.И. Прохорова, – ЛГУ, Л., 1982. – С.183-186.
16. Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник. Под ред. В.В. Меньшикова. – М., Мед-на. 1980. – 320 с.