

*О.В.Макарова, В.Л.Ковалева, А.С.Сладкопевцев, Л.П.Михайлова,
Н.И.Веселова, Е.М.Носейкина*

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ НЕИНФЕКЦИОННОГО ГРАНУЛЕМАТОЗА ЛЕГКИХ

Российский НИИ фтизиопульмонологии МЗ и МП России,
Всероссийский научный центр БАВ, Москва

THE EXPERIMENTAL MODEL OF NONINFECTIOUS GRANULOMATOSIS IN LUNGS

O.V.Makarova, V.L.Kovaleva, A.S.Sladkoptsev, L.P.Mihailova, N.I.Veselova, E.M.Noseikina

S u m m a r y

Experimental model of noninfectious granulomatosis in lungs was elaborated by the authors. The lung granulomatosis was induced by Sefadex A-25 aerosol inspiration in Wistar rats. It was characterised by the mature macrophagal granulomas appearance in couple with acute bronchitis and alveolitis. Granulomatous reaction in lungs was accompanied by extreme hyperplasia of lymphoid bronchial folliculi. The bronchial alveolar lavage cell count, especially neutrophil, lymphocyte, and polynuclear macrophage counts, increased during the experiment. Maximally manifested changes of the mentioned parameters were noted after 7 days since Sefadex A-25 aerosol inhalation. Using the elaborated model of noninfectious pulmonary granulomatosis, it was demonstrated that the model can be used to estimate the efficiency of antiinflammatory and immunomodulating pharmacological products, as well Budesonide, which are used in pulmonology.

Р е з ю м е

Разработана экспериментальная модель неинфекционного гранулематоза легких. При аэрозольном введении сефадекса А-25 у крыс Вистар развивается гранулематоз легких, морфологически характеризующийся образованием зрелых макрофагальных гранулем в сочетании с острым бронхитом и альвеолитом. Гранулематозная реакция легких сопровождается выраженной гиперплазией лимфоидных фолликулов бронхов. В бронхоальвеолярном смыве увеличивается количество клеточных элементов, и среди них повышается процентное содержание нейтрофилов, лимфоцитов и многоядерных макрофагов. Максимально выраженные изменения указанных показателей отмечаются на 7-е сутки после аэрозольного введения сефадекса А-25. На разработанной модели неинфекционного гранулематоза легких продемонстрирована, на примере будесонида, возможность использования ее для оценки эффективности противовоспалительных и иммуномодулирующих фармакологических препаратов, используемых в пульмонологии.

Экспериментальные модели воспалительных и фиброзирующих заболеваний легких используются для изучения патогенетических механизмов и доклинической оценки эффективности фармакологических препаратов. Для изучения патогенетических механизмов развития патологических процессов в легких широко используются экспериментальные модели [3,4] блеомицинового фиброза, острого бронхита и бронхиолита, вызванного аэрозольным воздействием токсичных веществ (двуокись азота, сернистый газ, пары формалина и др.). Для оценки эффективности противовоспалительных препаратов *L.Kallstrom et al.* [5] использовали экспериментальную модель с интратрахеальным введением сефадекса А-25, который является высокомолекулярным полимером — полисахаридом. Попадая на увлажненную поверхность бронхиального дерева и альвеол, частицы сефадекса А-25 превращаются в

гель, обладающий свойствами адьюванта. По данным *Л.Йегера* [1] и *А.И.Струкова и соавт.* [2], высокомолекулярные полимеры, благодаря своему адьювантному действию, способны вызывать развитие воспалительных реакций с образованием гранулем. Однако динамика морфологических изменений в легких, обусловленных воздействием сефадекса А-25, не изучена.

Задача исследования — разработка экспериментальной модели воспалительного процесса в легких, вызванного сефадексом А-25, и выбор оптимальных сроков, морфологических и морфометрических критериев для оценки некоторых противовоспалительных фармакологических препаратов (будесонид), используемых в пульмонологии.

В работе использовали крыс-самцов линии Вистар массой 180—240 г. Животным с помощью оригинального дозирующего устройства для ингаляционного

введения сухих порошков под эфирным наркозом вводили сефадекс А-25 в дозе 5 мг на 1 кг массы тела. Дозирующее устройство разработано В.А.Казначеевым (Российский НИИ пульмонологии). Исследование проводили в динамике на 1, 7, 14, 21-е сутки после введения сефадекса А-25. Для оценки противовоспалительной и иммуномодулирующей активности будесонид вводили внутривенно в высокой дозе (5 мг/кг) за 1 час до ингаляции сефадекса А-25 и затем ежедневно 6 раз. Животных опытной группы выводили из эксперимента на 7-е сутки. В каждую группу наблюдений входило 5-7 животных. Контролем служили 10 интактных крыс. Бронхоальвеолярный смыв (БАС) получали под гексеналовым наркозом. В БАС определяли число клеток в 1 мл. В мазках, окрашенных по Романовскому-Гимзе, подсчитывали эндопульмональную цитогранулу (%) и содержание многоядерных альвеолярных макрофагов (%). После процедуры БАС животных выводили из опыта, легкие с трахеей извлекали из грудной полости и макропрепарат помещали в 2% раствор уксусной кислоты. Через 18—24 ч. трахею, главный и долевыми бронхами рассекали и под лупой (методом точечного счета) оценивали объемную плотность лимфоидных фолликулов. Проводили гистологическое исследование легких. В срезах ткани легких толщиной 4 мкм в межальвеолярных перегородках подсчитывали количество нейтрофилов в поле зрения. Морфологические и морфометрические показатели обрабатывали статистически.

В ходе эксперимента различий в общем состоянии животных опытной и контрольной групп не отмечали. При гистологическом исследовании легких крыс на 1-е сутки после аэрозольного введения сефадекса А-25 была выявлена картина острого бронхита и альвеолита с нейтрофильной реакцией. По сравнению с контролем количество нейтрофилов в межальвеолярных перегородках возрастало в 6,7 раза (табл.1). При морфометрическом исследовании у крыс опытной группы достоверно возрастала объемная плотность лимфоидных фолликулов в стенках бронхов. В БАС

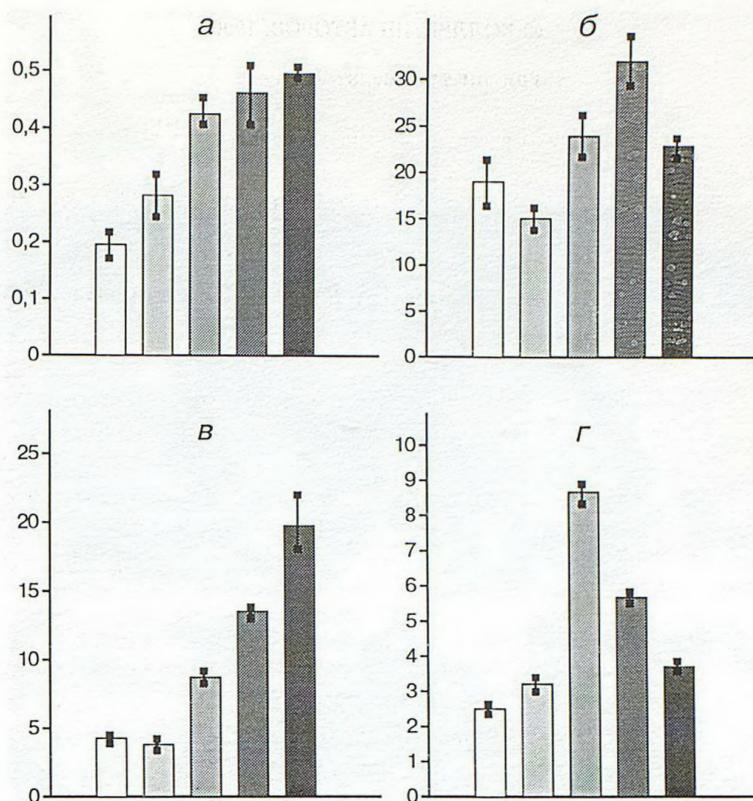


Рис.1. Цитологические показатели БАС крыс линии Вистар в норме и в разные сроки после аэрозольного введения сефадекса А-25.

Здесь и на рис.3: а — цитоз, б — нейтрофилы, в — лимфоциты, г — многоядерные макрофаги. Контроль — светлый столбец. Сутки после введения сефадекса А-25: 1-е — 2-й столбик, 7-е — 3-й столбик, 14-е — 4-й столбик, 21-е — 5-й столбик.

на 1-е сутки после введения сефадекса А-25 отмечали достоверное увеличение показателей цитоза без существенных изменений клеточного состава (рис.1). Относительное количество многоядерных макрофагов, представленных, как и в контроле, двуядерными клетками, не изменялось.

На 7, 14, 21-е сутки после аэрозольного введения сефадекса А-25 морфологические проявления острого бронхита и альвеолита нарастали по выраженности и распространенности. В паренхиме легких и соединительной ткани по ходу вен и венул определялись зрелые макрофагальные гранулемы, состоящие из много- и одноядерных макрофагов, лимфоцитов и единичных нейтрофилов (рис.2). На 7-е сутки эксперимента количество нейтрофилов в межальвеолярных перегородках было максимально высоким — в 9,3 раза выше, чем в контроле (см.табл.1). На 14-е и 21-е сутки показатели их снижались. На 7-е сутки выявлялась и максимально выраженная гиперплазия лимфоидных фолликулов, которая оставалась высокой и на 14-е, и на 21-е сутки эксперимента. В БАС на 7—21-е сутки после аэрозольного введения сефадекса А-25 показатели цитоза были выше, чем в контроле и в 1-е сутки (см.рис.1). На 7-е и 14-е сутки определялся рост показателя относительного количества нейтрофилов в БАС: он был максимальным на 14-е сутки ($31,2 \pm 5,9$), на 21-е сутки показатель снижался ($21,8 \pm 1,9$) и приближался к значению контрольного ($18,3 \pm 4,8$). Процентное содержание лимфоцитов в БАС на 7-21-е

Т а б л и ц а 1

Количество нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких и объемная плотность лимфоидных фолликулов в стенке бронхов в норме и в разные сроки после аэрозольного введения сефадекса А-25, ($M \pm m$)

Сефадекс А-25	Количество нейтрофилов на единицу площади среза	Объемная плотность лимфоидных фолликулов, %
Контроль	$3,1 \pm 0,6$	$39,0 \pm 1,8$
Сутки после введения		
1-е	$20,0 \pm 1,6^*$	$53,3 \pm 3,2^*$
7-е	$29,6 \pm 1,8^*$	$56,0 \pm 4,1^*$
14-е	$13,0 \pm 1,0^*$	$50,2 \pm 3,6^*$
21-е	$14,4 \pm 1,7^*$	$48,3 \pm 3,7^*$

П р и м е ч а н и е. Звездочка — различие по сравнению с контролем достоверно $p < 0,05$ — здесь и в табл.2.

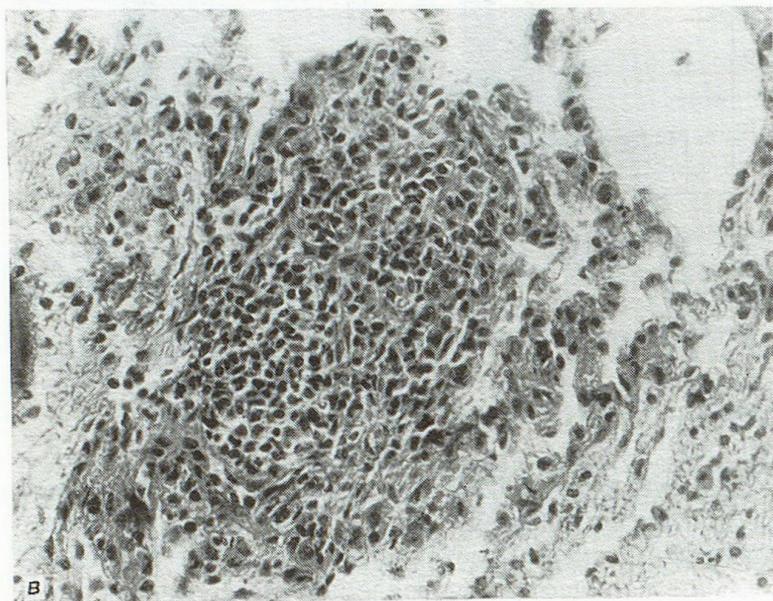
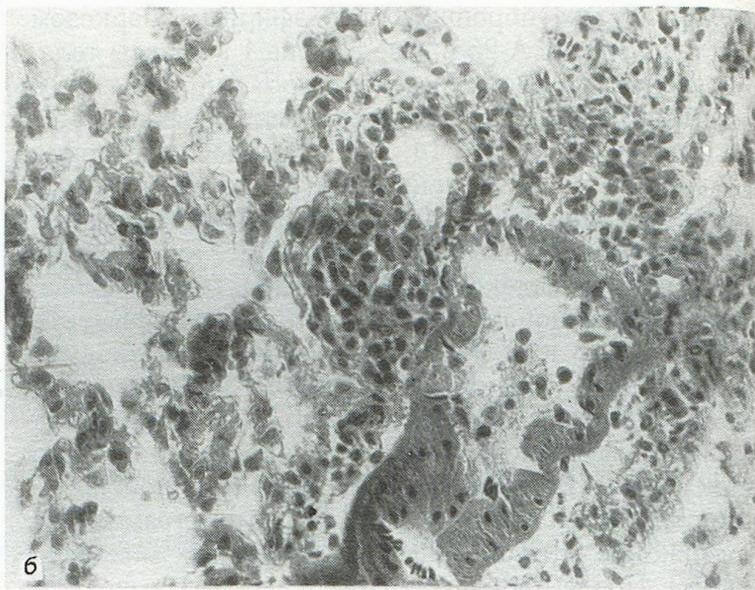
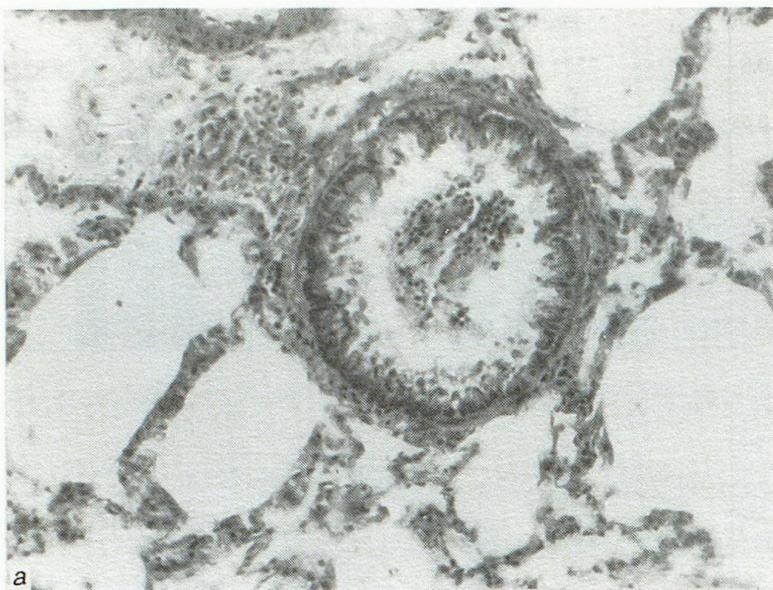


Рис.2. Легкие крыс линии Вистар на 7-е сутки после аэрозольного введения сефадекса А-25.

Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$; а — в просвете бронха клеточные элементы экссудата, десквамированный эпителий. В стенке бронха слабая диффузная инфильтрация нейтрофилами; б — зрелые макрофагальные гранулы в периваскулярной соединительной ткани.

сутки прогрессирующе возрастало и было максимальным на 21-е сутки (в 5 раз больше, чем в контроле). Относительное количество многоядерных макрофагов, среди которых преобладали клетки с 3—5 ядрами, было наиболее высоким на 7-е сутки эксперимента. На 14—21-е сутки показатель снижался, но не достигал контрольных значения.

При оценке противовоспалительной активности будесонида (табл.2, рис.3) как оптимальный срок эксперимента мы выбрали 7-е сутки после аэрозольного введения сефадекса А-25, так как в этот период отмечаются максимально выраженные морфологические и цитологические изменения. На 7-е сутки в группе крыс с аэрозольным введением сефадекса А-25 и лечением будесонидом гранулематозная реакция в легких сохранялась. Воспалительные изменения в бронхах и альвеолах были менее выражены, чем в группе нелеченых животных. По сравнению с нелечеными животными на фоне лечения будесонидом отмечалось снижение (в 2,8 раза) количества нейтрофилов в межальвеолярных перегородках. Будесонид подавлял гиперплазию бронхоассоциированной лимфоидной ткани: показатели объемной плотности лимфоидных фолли-

кулов в стенке бронхов крыс, леченных будесонидом, не отличались от контроля. В БАС крыс этой группы отмечалось снижение показателей цитоза, процентного и абсолютного содержания нейтрофилов. Относительное количество лимфоцитов после лечения будесонидом не отличалось от показателей нелеченых животных, в то время как абсолютное содержание лимфоцитов у леченых животных было в 3,1 раза ниже (соответственно $40\ 000 \pm 1100$, $130\ 000 \pm 800$). Процентное и абсолютное содержание многоядерных макрофагов у леченых животных было ниже, чем в опытной группе, но не достигало контрольных значений.

Таким образом, аэрозольное введение сефадекса А-25 вызывало развитие в легких острого бронхита и альвеолита с формированием зрелых макрофагальных гранул. Гранулематозный воспалительный процесс сопровождался гиперплазией лимфоидных фолликулов бронхов, увеличением в БАС показателей цитоза, количества нейтрофилов, лимфоцитов, а также многоядерных макрофагов. Максимальная выраженность указанных изменений отмечалась на 7-е сутки после аэрозольного введения сефадекса А-25.

Количество нейтрофилов в ткани легких и объемная плотность лимфоидных фолликулов в стенке бронхов на 7-е сутки после аэрозольного введения сефадекса А-25 и лечения будесонидом ($M \pm m$)

Показатель	Количество нейтрофилов на единицу площади среза	Объемная плотность лимфоидных фолликулов, %
Контроль	$3,1 \pm 0,6$	$38,0 \pm 1,8$
7-е сутки после введения сефадекса А-25	$29,6 \pm 1,8^{*,**}$	$56,0 \pm 4,1^{*,**}$
7-е сутки после введения сефадекса А-25 и лечения будесонидом	$11,4 \pm 1,4^*$	$32,1 \pm 6,6^*$

Примечание. Две звездочки — различие по сравнению с лечеными животными достоверно $p < 0,05$.

Разработанная модель экспериментального гранулематоза легких может быть использована для оценки эффективности противовоспалительных и иммуномодулирующих препаратов, используемых в пульмонологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Клиническая иммунология и аллергология / Под ред. Л.Йегера. — М.: Медицина, 1990. — Т.1. — С.61—67.
2. Струков А.И., Кауфман О.Я. // Гранулематозное воспаление и гранулематозные болезни. — М.: Медицина, 1989. — С.180.
3. Good M.E.P., Tryka A.F., Witschi H.P. // Toxicol. Appl. Pharmacol. — 1987. — Vol.90. — P.70—72.
4. Hillam R.P., Bicet E., Hahn F.F., Schnitzlein C.T. // Environ. Lab. Res. — 1983. — Vol.31. — P.201—211.
5. Kallstrom L., Brattsand R., Lovgren U. et al. // Agents and Action. — 1985. — Vol.17, № 3—4. — P.355—357.

Поступила 26.09.95.

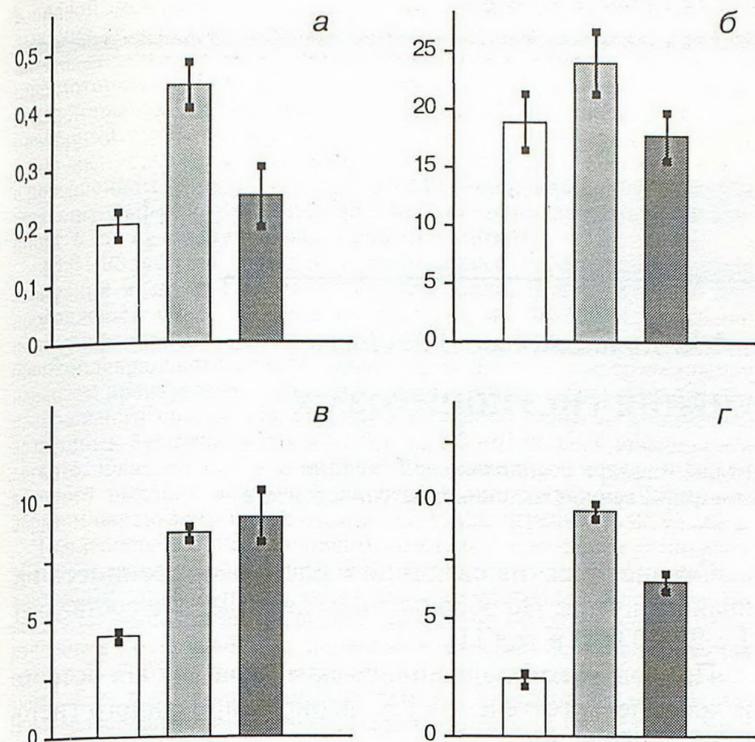


Рис.3. Цитологические показатели БАС крыс линии Вистар в норме (1-й столбик) и на 7-е сутки после введения сефадекса А-25 (2-й столбик) и 7-е сутки после лечения будесонидом (3-й столбик).

На разработанной модели неинфекционного гранулематоза легких у крыс показан противовоспалительный и иммуномодулирующий эффект будесонида. При ежедневном внутрибрюшинном введении высоких доз будесонида на 7-е сутки после аэрозольного введения сефадекса А-25 гранулематозная воспалительная реакция в легких была менее выражена, чем в группе нелеченых животных. Будесонид подавлял гиперплазию бронхоассоциированной лимфоидной ткани. У леченых животных нормализовались показатели цитоза БАС, снижалось содержание нейтрофилов и лимфоцитов.