



РЕЛЕВАНТНОЕ И АЛЬТЕРНАТИВНОЕ БИМОДЕЛИРОВАНИЕ

Моделирование кардиопульмонарной патологии у экспериментальных животных

П.А. Ворончихин¹, А.Н. Куликов², А.А. Карпов³, Е.Г. Сухорукова⁴,
Д.Д. Ваулина⁵, С.В. Оковитый¹, Д.Э. Коржевский⁴, Е.Б. Шустов⁶

¹ – ГБОУ ВПО СПХФА, Санкт-Петербург

² – ФГБ ВОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. Кирова», Санкт-Петербург

³ – ФГБУ «ФМИЦ им. В.А. Алмазова», Санкт-Петербург

⁴ – ФГБУ «НИИ экспериментальной медицины» СЗО РАМН, Санкт-Петербург

⁵ – ФГБУН «Институт мозга РАН», Санкт-Петербург

⁶ – ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, Московская область

Контактная информация: Ворончихин Павел Алексеевич, pavalexvor@mail.ru

Разработка фармакотерапии для пациентов, страдающих бронхиальной астмой и имеющих коморбидные заболевания, особенно патологию сердца, требует создания адекватной экспериментальной модели для доклинических исследований. Сочетанная патология у экспериментальных животных моделировалась с помощью доксорубицинового или ишемического поражения миокарда с последующим созданием овальбуминовой бронхиальной астмы.

В результате проведенного исследования установлено, что использование доксорубициновой модели сердечной недостаточности для моделирования коморбидной патологии невозможно, так как при этом подавляется аллергическая реакция, вызываемая овальбумином, и не формируется экспериментальная бронхиальная астма.

Модель окклюзии левой коронарной артерии является наиболее эффективным способом для создания поражения миокарда, на фоне которого хорошо моделируется бронхиальная астма. Эхокардиография выявила снижение основных параметров работы сердца (фракция выброса, фракция укорочения, ударный объем), при этом морфологическое исследование легких подтвердило наличие воспаления в дыхательных путях, сопровождающегося возрастанием числа эозинофилов и тучных клеток в периваскулярном и перибронхиальном пространствах.

Ключевые слова: бронхиальная астма, кардиопульмональная патология, крысы.

Введение

Одним из самых распространенных хронических заболеваний дыхательных путей является бронхиальная астма (БА). В мире насчитывается более 300 миллионов человек, страдающих этой патологией. Нередко эти пациенты име-

ют сопутствующие заболевания сердечно-сосудистой системы, что является актуальной проблемой современной медицины, так как еще в 1996 г. было выявлено увеличение риска неблагоприятного исхода у пациентов (особенно женщин) с БА и проявлениями

ишемической болезни сердца [12]. Возникновение сочетанной кардиологической патологии у пациентов с астмой не зависит от тяжести бронхиальной астмы, и частота этих возникновений соответствует общим тенденциям в обществе [7].

Целью предстоящей работы стало создание адекватной модели кардиопульмонарной патологии с целью ее использования для поиска новых подходов к лечению пациентов с сочетанной патологией сердца и легких.

Материалы и методы

Для моделирования сердечной недостаточности использованы беспородные крысы-самцы массой 220-250 г. (n=50) из питомника «Рапполово» РАМН. Содержание животных осуществлялось в

условиях вивария СПХФА на стандартном рационе со свободным доступом к воде при 12-час световом режиме в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977). Схемы экспериментов представлены в табл. 1.

Для моделирования хронической сердечной недостаточности (ХСН) были выбраны 2 модели: фармакологическая модель с использованием доксорубицина и хирургическая модель с созданием ишемического поражения миокарда путем окклюзии левой коронарной артерии.

Для создания фармакологической модели сердечной недостаточности использовали доксорубицин (Teva, Изра-

Таблица 1
Схемы экспериментов по созданию кардиопульмонарной патологии

Группа	1-30 день	31 и 37 день	60-90 дни
Контроль, эксперимент 1, n=5	-	Введение эквивалентных количеств физиологического раствора	
Группа, с патологией, эксперимент 1, n=10	в/б введение доксорубицина в кумулятивной дозе 15 мг/кг, разделенной на 6 введений в течение 14 дней	ОВА, п/к + БМ, в/б	ОВА, ингаляции каждые 3 дня
Контроль, 2 эксперимент, n=5	-	Введение эквивалентных количеств физиологического раствора	
Группа, с патологией, n=10	Окклюзия левой коронарной артерии в 1-й день	ОВА, п/к + БМ, в/б	ОВА, ингаляции каждые 3 дня

Примечание: ОВА – овалбумин; БМ – препарат «Бронхо-мунал»; в/б – внутривентральное введение; п/к – подкожное введение; инг – ингаляционное введение.

иль), вводимый внутривентриально в кумулятивной дозе 15 мг/кг, разделенной на 6 введений (14 дней). В такой дозе доксорубин способен снижать сократимость миокарда левого желудочка, формируя у животных ХСН через 1 мес. после последнего введения [3, 17].

Ишемическое повреждение миокарда моделировали, используя окклюзию левой коронарной артерии [6]. Крыс предварительно наркотизировали хлоралгидратом (Acros Organics, США) в дозе 450 мг/кг, фиксировали на препаровальном столике, вскрывали грудную клетку в 4-м подреберье слева, рассекали перикард и обнажали сердце. Под левую коронарную артерию подводили лигатуру, концы нити затягивали под контролем ЭКГ (Инкарт, Россия) до появления признаков ишемии миокарда: снижения вольтажа зубца R и подъема интервала ST. Затем проводили послойное зашивание мышц и кожи. В контрольной группе животных (n=5) также проводили вскрытие грудной клетки с последующим послойным ушиванием операционной раны.

Спустя 30 дней после начала экспериментов, из выживших животных формировали опытную и контрольную группы (n=10) и начинали моделирование овалбуминовой БА в течение 60 дней. Для этого подкожно вводили адсорбированный на геле $Al(OH)_3$ 1:100 овалбумин на 31-й и 37-й дни [10]. Одновременно с введением овалбумина в качестве адьюванта осуществляли внутривентриальные инъекции препарата «Бронхо-мунал», предварительно растворенного в 2 мл физиологического раствора, в дозе 2,5 мг/кг [1]. Начиная с 45-го дня, проводили ингаляции 5% раствора овалбумина в течение 15 мин ка-

ждые три дня (1 ингаляция = 10 крыс) с помощью небулайзера «F 1000» (Flaem, Италия). Контрольной группе (n=5) ингалировали физиологический раствор в эквивалентных количествах.

Спустя 90 дней после начала эксперимента проводили эхокардиографическое исследование сердца и забор крови, с последующим изъятием и фиксацией ткани легкого. Гистологическое исследование проводили, используя окраску с одновременным выявлением эозинофилов (эозин), тучных клеток и муцина (альциановый синий) по методу Сухоруковой-Ворончихина [4, 5]. Анализировали перибронхиальное пространство (ПБ), периваскулярную область (ПВ) при увеличении $\times 400$ в 10-ти полях зрения.

Для исследования сердца использовали ультразвуковую систему «Acuson Sequoia 512» (Siemens, Германия) с линейным датчиком (частота 8 МГц). Животных наркотизировали метагекситалом (Lilly, США) в дозе 90 мг/кг. В М-режиме регистрировали диаметр аорты у корня (Ao, мм), передне-задний размер левого предсердия (ЛП, мм), конечные диастолический и систолический размеры левого желудочка (КДР, КСР, мм), толщину межжелудочковой перегородки (Тмжп, мм) и толщину задней стенки левого желудочка (Тзс, мм), фракцию укорочения (ФУ, %), фракцию выброса (ФВ, %) и ударный объем (УО, мл).

Экспериментальные данные статистически обрабатывались с помощью программы BIOSTAT 4.03 [2]. Достоверность различий выявляли с помощью критерия Стьюдента и непараметрического критерия Манна – Уитни. Числовые данные приведены как среднее значение \pm ошибка среднего ($M \pm m_x$). Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

На модели сочетанной патологии, полученной путем введения доксорубина и овальбумина, в ходе 1-го эксперимента формирования сочетанной патологии не было обнаружено.

Анализ периферической крови выявил возрастание числа лейкоцитов в 2,9 раза, снижение числа эритроцитов (в 1,5 раз) и увеличение количества тромбоцитов (в 2 раза) по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

Эхокардиографически были обнаружены изменения фракции укорочения и размера левого желудочка, которые были недостоверны ($p > 0,05$). Морфологическое исследование ткани легкого достоверных отличий в числе эозинофилов, тучных клеток, бокаловидных клеток между опытными группами и контролем не выявило. Вероятно, отсутствие аллергического воспаления в дыхательных путях было связано с иммунодепрессивным действием доксорубина [11, 13]. Более того, в клинических исследованиях была обнаружена способность доксорубина даже несколько улучшать состояние пациентов с БА [14, 16] за счет подавления воспаления в дыхательных путях. Таким образом, очевидно, что доксорубиновая модель

ХСН не является оптимальной для моделирования кардиопульмональной патологии.

При моделировании сочетанной патологии (ХСН и БА), с использованием окклюзии коронарной артерии и последующего введения овальбумина, в периферической крови наблюдалось статистически достоверное возрастание всех субпопуляций лейкоцитов. Так, количество эозинофилов при этой патологии увеличивалось, в среднем, в 7 раз, а нейтрофилов – в 4,5 раза ($p < 0,05$) (табл. 2). В клинических исследованиях у пациентов с БА также было отмечено возрастание числа эозинофилов в периферической крови [8].

Эхокардиографическое исследование миокарда продемонстрировало достоверное ($p < 0,05$) увеличение конечного диастолического размера (КДР) в 1,3 раза, конечного диастолического объема (КДО) – в 1,75 раз, конечного систолического размера (КСР) левого желудочка – в 2,1 раза и конечного систолического объема (КСО) – в 8 раз по сравнению с контрольной группой (табл. 3). Одновременно снижалась фракция выброса (ФВ) в 3 раза, фракция укорочения (ФУ) – в 4,3 раза и ударный объем (УО) – в 2,1 раза по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

Таблица 2
Показатели периферической крови у животных с экспериментальной ишемической ХСН и БА

Группа	Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	Лимфоциты, $10^9/\text{л}$	Эозинофилы, $10^9/\text{л}$	Нейтрофилы, $10^9/\text{л}$
Контроль	$7,2 \pm 0,6$	$5,3 \pm 0,5$	$0,21 \pm 0,03$	$1,5 \pm 0,4$
Группа с патологией	$15,3 \pm 1,3^*$	$6,4 \pm 0,4^*$	$1,85 \pm 0,35^*$	$7,0 \pm 0,9^*$

Примечание: * – значимое отличие от контрольной группы, $p < 0,05$.

Таблица 3

Результаты эхокардиографического исследования

Параметр	Контроль	Группа с патологией
Масса тела	320,0±10,0	320,0±20,0
Аорта, см	0,38±0,03	0,36±0,02
Левое предсердие (ЛП), см	0,41±0,05	0,44±0,07
Параметры левого желудочка		
Конечный диастолический размер (КДР), см	0,68±0,06	0,86±0,04*
Конечный диастолический объем (КДО), мл	0,8±0,05	1,4±0,2*
Конечный систолический размер (КСР), см	0,37±0,03	0,77±0,09*
Конечный систолический объем (КСО), см	0,13±0,02	1,05±0,04*
Фракция укорочения (ФУ), %	47,5±2,3	11,2±6,3*
Ударный объем (УО), мл	0,63±0,05	0,3±0,1*
Частота сердечных сокращений (ЧСС), уд/мин	384±15	386±49
Фракция выброса (ФВ), %	83,2±6	27,0±15*

Примечание: * – значимое отличие от контрольной группы, $p < 0,05$.

Наблюдаемые изменения работы сердца характеризуют ухудшение сократительной способности миокарда в результате проведенной хирургической операции.

При морфологическом исследовании легких наблюдали инфильтрацию стенок бронхов и сосудов тучными клетками и эозинофилами (рис. 1). Количество тучных клеток и эозинофилов возрастало (табл. 4) в перибронхиальном пространстве в 2 и в 2,8 раза, а в периваскулярном пространстве – в 1,6 и 11 раз, соответственно по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

В клинических исследованиях, при биопсии легких больных с БА, также описано увеличение количества тучных клеток. Есть предположение, что число тучных клеток и их активность коррелирует с уровнем гиперреактивности дыхательных путей [9, 15].

Таким образом, полученные нами данные позволяют утверждать, что при использовании окклюзии левой коронарной артерии и модифицированной модели БА может быть смоделирована кардиопульмональная патология.

Таблица 4

Тучные клетки и эозинофилы в тканях легкого

Клетки	Тучные клетки		Эозинофилы	
	ПБ	ПВ	ПБ	ПВ
Область				
Контроль	2,1±0,2	3,0±0,6	2,5±0,5	0
Группа с патологией	4,2±1,2*	4,8±0,4*	7,1±3,0*	11,0±3,4*

Примечание: * – значимое отличие от значений контрольной группы, $p < 0,05$.

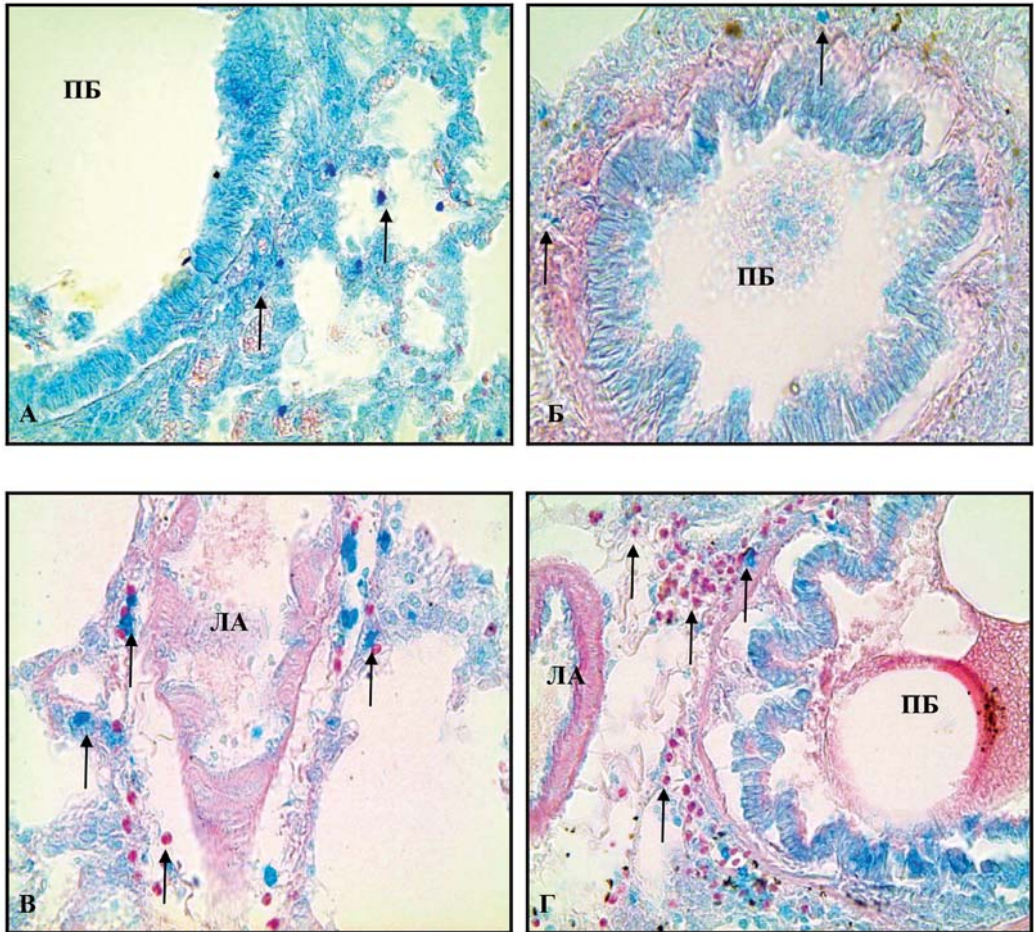


Рис. 1. Гистологический срез легких контрольных животных (А, Б) и животных с кардиопульмональной патологией (В, Г). При моделировании сочетанной патологии в легких наблюдается возрастание числа эозинофилов, тучных клеток и повышение содержание слизи в просвете бронхов. Тучные клетки и муцин окрашены в ярко-синий цвет, эозинофилы в малиновый цвет. Клетки обозначены стрелками (↑), ЛА – легочная артерия, ПБ – просвет бронха. Комбинированная окраска альциановым синим и эозином. Увел. об. х400.

Выводы

1. Для моделирования кардиопульмональной патологии наиболее оптимальной для создания сердечной недостаточности является окклюзия левой коронарной артерии с последующим моделированием овальбуминовой БА.

2. Наиболее эффективным методом функциональной диагностики

поражения миокарда у экспериментальных животных является эхокардиография.

3. Используя метод комбинированного окрашивания и одновременного выявления эозинофилов, тучных клеток и муцина можно быстро определить основные морфологические критерии БА.

Список литературы

1. **Ворончихин П.А., Сырцова М.А., Талантов С.В. и др.** Влияние метопролола и бисопролола на течение экспериментальной бронхиальной астмы // Биомедицина. 2013. № 2. С.48-57.
2. **Гланц С.** Медико-биологическая статистика. Перевод с англ. М.: Практика. 1999. 459 с.
3. **Казаченко А.А., Оковитый С.В., Куликов А.Н. и др.** Сравнительная характеристика некоторых фармакологических моделей хронической сердечной недостаточности // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2008. Т. 71. № 6. С.16-19.
4. **Коржевский Д.Э., Григорьев И.П., Отеллин В.А.** Применение обезвоживающих фиксаторов, содержащих соли цинка, в нейрогистологических исследованиях // Морфология. 2006. Т.129. Вып.1. С.85-86.
5. **Коржевский Д.Э., Гилерович Е.Г., Кирик О.В. и др.** Морфологическая диагностика. СПб.: СпецЛит. 2013. 127 с.
6. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1 / Под ред. Миронова А.Н.- М.: Гриф и К. 2012. 944 с.
7. **Cazzola M., Calzetta L., Bettoncelli G. et al.** Asthma and comorbid medical illness // ERJ. 2011. Vol.38. № 1. P.42-49.
8. Global strategy for asthma management and prevention (updated 2012). 110 p.
9. **Holgate S., Kay A.B.** Mast cells, mediators and asthma // J. Clinical Allergy. 1985. Vol. 15., № 3. P.221-234.
10. **Kamachi A., Munakata M., Nishimura Y. et al.** Enhance of goblet cell hyperplasia and airway hyperresponsiveness by salbutamol in a rat model of atopic asthma // J. Thorax. 2001. Vol. 56. №1. P.19-24.
11. **Lee, V., Randhawa A.K., Singal P.K.** Adriamycin-induced myocardial dysfunction in vitro is mediated by free radicals // Am. J. Physiol. 1991. Vol.261. № 4. P.989-995.
12. **Toren K., Lindholm N.B.** Do patients with severe asthma run an increased risk from ischaemic heart disease? // Int. J. Epidemiol. 1996. Vol. 25. №3. P.617-620.
13. **Toyoda Y., Okada M., Kashem A.M.** A canine model of dilated cardiomyopathy induced by repetitive intracoronary doxorubicin administration // J. Thorac Cardiovasc. Surg. 1998. Vol. 115. № 6. P.1367-1373.
14. **Reed C.** The natural history of asthma in adults: the problem of irreversibility // J. Allergy Clin. Immunol. 1999. Vol. 103. № 4. P. 539-547.
15. **Robinson D.S.** The role of the mast cell in asthma: induction of airway hyperresponsiveness by interaction with smooth muscle // J. Allergy Clin. Immunology. 2004. Vol. 114. № 1. P. 58-65.
16. **Weigel S., Schmidt S.M., Bernig T. et al.** Intensive chemotherapeutic regimens against acute leukemia transiently suppress asthma symptoms but do not lead to long-term relief // Pediatr. Hematol. Oncol. 2000. Vol. 17. № 8. P. 659-665.
17. **Weinberg L.E., Singal P.K.** Refractory heart failure and age-related differences in adriamycin-induced myocardial changes in rats // Can. J. Physiol. Pharmacol. 1987. Vol. 65. № 9. P. 1957-1965.

Model of cardiopulmonary disease on rats

**P.A. Voronchikhin, A.V. Kulikov, A.A. Karpov, E.G. Sukhorukova,
D.D. Vaulina, S.V. Okovityi, D.E. Korzhevskii, E.B. Shustov**

Development of methods of therapy in the case of patients with asthma and have a comorbid diseases, especially heart disease, requires an adequate animal model. In our design were selected Doxorubicin heart failure model and myocardial injury model. After heart damage followed by the creation of ovalbumin asthma. As a result of this work it became clear that the use of doxorubicin model of heart failure would not be suppressed because the allergic reaction caused by ovalbumin. In the course of the experiment revealed that the use of the model left coronary artery occlusion is the most effective way to create a comorbidity. Ultrasound heart investigation revealed a decrease in the basic parameters of the heart (ejection fraction, FI, SV) with a morphological study confirmed the inflammation in the airways, accompanied by an increase in the number of eosinophils and mast cells in the perivascular and peribronchial spaces.

Key words: experimental bronchial asthma, experimental heart failure, rats.