

© Д.М. Бойко

УДК 616.24 – 002 – 092.9

Д.М. Бойко

АНАЛІЗ МАКРО- ТА МІКРОСКОПІЧНИХ ЗМІН ЛЕГЕНЬ ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ МОДЕЛЮВАННЯМ ХРОНІЧНОГО ОБСТРУКТИВНОГО ЗАХВОРЮВАННЯ ЛЕГЕНЬ

Вищий державний навчальний заклад України

«Українська медична стоматологічна академія» (м. Полтава)

Робота є фрагментом науково-дослідної теми: «Клініко-функціональні та морфологічні особливості перебігу захворювань респіраторної системи (туберкульозу, саркоїдозу, дисемінованих процесів та ХНЗЛ) на різних етапах лікування, реабілітації та профілактики», номер держреєстрації 0110U008151.

Вступ. На сьогоднішній день проблема хронічних обструктивних захворювань легень (ХОЗЛ) залишається актуальною для переважної більшості країн світу, в тому числі і для України [6, 8, 9]. За даними ВООЗ хронічне обструктивне захворювання легень до 2020 року займе третю сходинку серед захворювань, яким притаманні провідні позиції за показниками смертності, обумовлюючи близько 4,7 млн. смертей на рік [11].

Незважаючи на те, що особливості перебігу ХОЗЛ є широко вивчені [20], все ще залишається багато відкритих запитань. Відомо, що основним етіологічним фактором виникнення ХОЗЛ є тютюнопаління [20]. У осіб з ХОЗЛ [2] розвивається ексудативне, продуктивне та склеротичне запалення в дихальних шляхах, легеневій тканині та легеневих судинах [12].

При експериментальному моделюванні ХОЗЛ [4, 5, 14] найбільш прийнятними патогенетично й етіологічно є моделі ХОЗЛ *in vivo*, що базуються на експозиції тютюнового диму [13, 23, 27, 30]. Тривале вдихання тютюнового диму морськими свинками, щурами або мишами сприяє виникненню запалення та емфіземи, характерних для ХОЗЛ [13, 16, 23].

На нашу думку застосування препаратів з проти-запальними та антифібротичними властивостями, а саме: глюкозаміну сульфат [15, 21, 22], дексаметазону [18, 24, 28, 31] і комбінації імунофану [19, 29, 32] та гіалуронідази [17, 25, 26] у щурів з тривалою експозицією тютюнового диму - матиме протективний вплив на стан локального запалення в легеневій тканині, сприятиме зменшенню темпів ремоделювання легеневої тканини.

Мета дослідження. Проаналізувати динаміку макро- та мікроскопічних змін у легенях щурів з експериментальним моделюванням хронічного обструктивного захворювання легень на фоні застосування корегуючого лікування препаратами з проти-запальними і антифібротичними властивостями.

Об'єкт і методи дослідження. Дослідження виконано на базі ЕКБ віварій Вищого державного навчального закладу України «Українська медична стоматологічна академія». Вся експериментальна частина дослідження, з використанням тварин,

проведена згідно дотримання міжнародних принципів Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілях» (Страсбург, 1985) та норм біомедичної етики, відповідно Законам України №3446-IV 21.02.2006 р., м. Київ, «Про захист тварин від жорстокого поводження» з проведенням медико-біологічних досліджень, та етичного кодексу лікаря України та ученого. Методика проведення експерименту з моделюванням ХОЗЛ за тривалої експозиції тютюновим димом базувалася на даних Joos G.F. (2005) та ряду відомих робіт [13, 23, 27, 30] у цій царині.

Тривалість експерименту склала – 16 тижнів. Щури вдихали дим зі свіжотліючих сигарет «Памир» (ТОВ «Дана-АС», Україна) із вмістом 1,2 мг нікотину та 12 мг смоли. Щодня кожна експериментальна група щурів (з 12 особин) отримувала 6 сигарет на добу, 7 днів на тиждень. До початку ініціалізації експерименту було проведено вивчення толерантності щурів до вдихання тютюнового диму з сигарет «Памир». Контрольна група контактувала лише з повітрям кімнати.

У дослідження включено 72 статевозрілих щури лінії Вістар масою 252,4 (228,2; 280,0) грамів та віком 7,1 (6,7; 7,9) місяців. З 48 щурів сформували чотири дослідницькі групи по 12 особин в кожній. Перша група щурів, у яких моделювали ХОЗЛ, знаходилась без лікування та отримала код «ХБ»; друга дослідницька група, де в якості лікувального засобу використовували дексаметазон, закодowana як «ХД»; третя була названа «ХГС» завдяки використанню, в якості лікувального засобу, глюкозаміну сульфат; четверта група в ході експерименту отримувала комбінацію ліків, а саме: імунофан та лідазу, кодувалася аббревіатурою «ХІЛ». Контрольну групу склали 24 щури, яких також розділили на 4 групи. Перша група була сформована з інтактних щурів, які не отримували ніякого лікування (КБ); друга група інтактних щурів отримувала дексаметазон (КД); третя група інтактних щурів отримувала глюкозаміну сульфат (КГС); четверта група інтактних щурів отримувала комбінацію лікарських засобів імунофану та лідази (КІЛ). Режим введення та додавання препаратів: дексаметазон (КРКА, Словенія) по 0,08 мг/кг, в/м, через 2 дні; глюкозаміну сульфат (Дона (Rottapharm Ltd.) та «Sigmar S.r.l.» для «Rottapharm S.r.l.», Ірландія/Італія)) по 5,33 мг/кг, в/м, через 2 дні; комбінація імунофану (Біонокс (Росія Москва)) по 0,67 мг/кг, в/м та гіалуронідази (Лідаза-Біофарма,

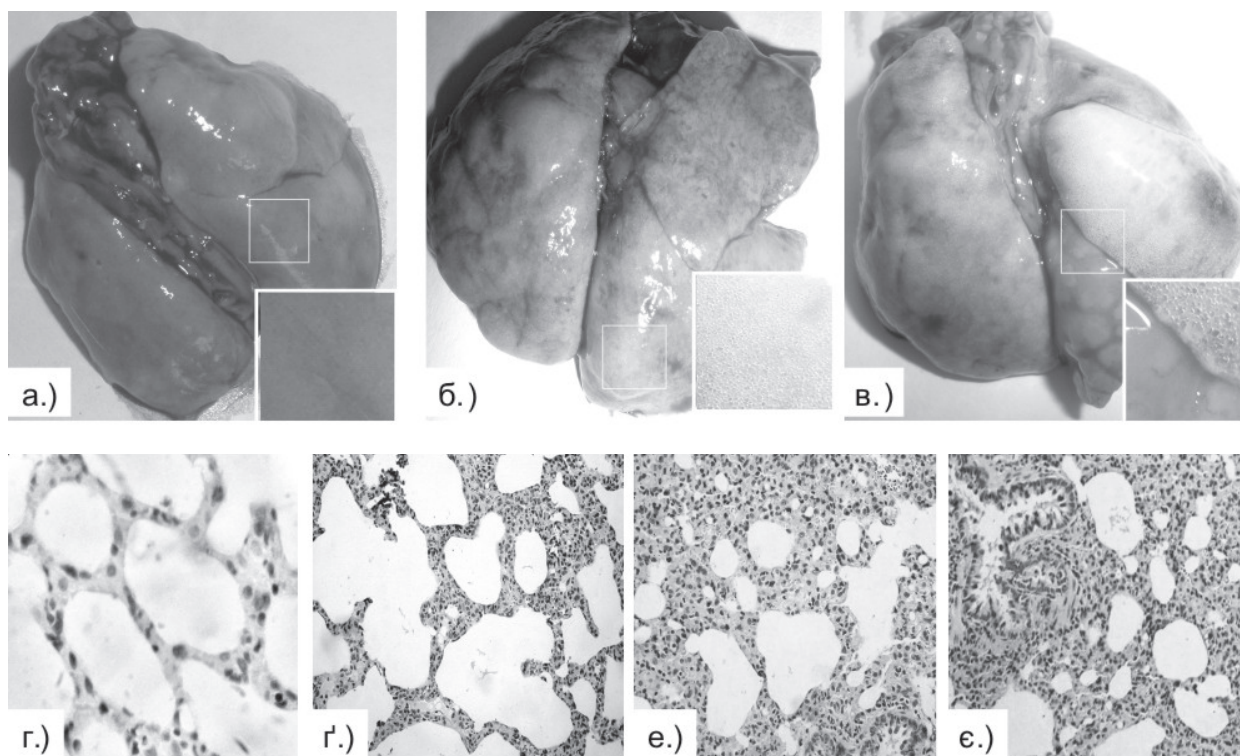


Рис. 1. Характеристика макро- (б. гіперінфляція; в. емфізематозні були) та мікроскопічних (г. емфізема; е. запальні зміни в паренхімі легень; є. запальні зміни у бронхах) змін у легенях щурів з експериментальною моделлю ХОЗЛ порівняно зі станом легень тварин контрольної групи (а.; г.).
Забарвлення гематоксилін-еозин. 3б. х 200.

ЗАТ (Україна, Київ)) по 0,85 Од/кг в/м , через 2 дні. Всі вищевказані лікарські препарати на момент їх використання у дослідженні мали державну реєстрацію та повний пакет дозвільних документів відповідно до чинного законодавства України. Тривалість лікування склала від 8 до 16 тижнів в окремих групах. Щурам проведено комплексне клініко-лабораторне, морфологічне, макроскопічне обстеження. Оцінка макро- та мікроскопічних змін легень щурів з експериментальною моделлю ХОЗЛ відбувалась на 8 та 16 тижні експерименту.

Порівняння отриманих показників проводилось з використанням непараметричних методів (таблиць 2x2 з обчисленням точного критерію Фішера) за допомогою програми Epi Info (TM) 3.5.3 (CDC, 17.07.2008) [1, 3, 7, 10]. Відмінності вважались статистично достовірними при $p \leq 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення. Під час дослідження стану легень у щурів було окреслено ряд характерних макро- та мікроскопічних ознак, як у тварин контрольної групи, так і у щурів з експериментальною моделлю ХОЗЛ (рис. 1).

У щурів, які протягом 16-ти тижнів вдихали тютюновий дим зі свіжотліючих сигарет - вибрані найбільш характерні для ХОЗЛ макроскопічні ознаки – гіперінфляція та емфізематозні були [12, 20, 30]. Вивчення стану органів дихання щурів з моделлю ХОЗЛ за допомогою світлової мікроскопії дозволило виявити, на ряду з ознаками порушення структури паренхіми легень, наявність поширеного запального

процесу з локалізацією в дихальних шляхах та легеневої тканині (рис. 1).

Надалі, враховуючі динаміку морфологічних змін у легенях експериментальних тварин, було проведено оцінку їх зміни в залежності від отриманого лікування.

Вивчаючи результати проведеного дослідження, перш за все, було досліджено наявність макро- (гіперінфляція, емфізематозні були) та мікроскопічних змін (емфізема, запальні зміни в паренхімі легень, запальні зміни у бронхах) у легенях інтактних щурів та експериментальних тварин контрольної групи, що не контактували з тютюновим димом, але вживали лікарські засоби (рис. 2).

У інтактних щурів контрольної групи та щурів, які додатково отримували лікарські препарати, значимих відмінностей у морфологічних характеристиках стану легень не виявлено (рис. 2). Дані результати свідчать про високий профіль безпечності застосованих лікарських засобів та відсутність пневмотоксичного ефекту.

Також проведено детальне співставлення макро- та мікроскопічних змін легень щурів з експериментальною моделлю ХОЗЛ на фоні корегуючої терапії та без неї зі щурами контрольної групи (рис. 3).

Найбільш значимо відрізнялась від інтактних щурів контрольної групи тварини з 16-ти тижневою експозицією тютюнового диму без лікування. У них вірогідно ($p < 0,05$) була вища кількість тварин з наявністю емфіземи і запальних змін у паренхімі легень

КЛІНІЧНА ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

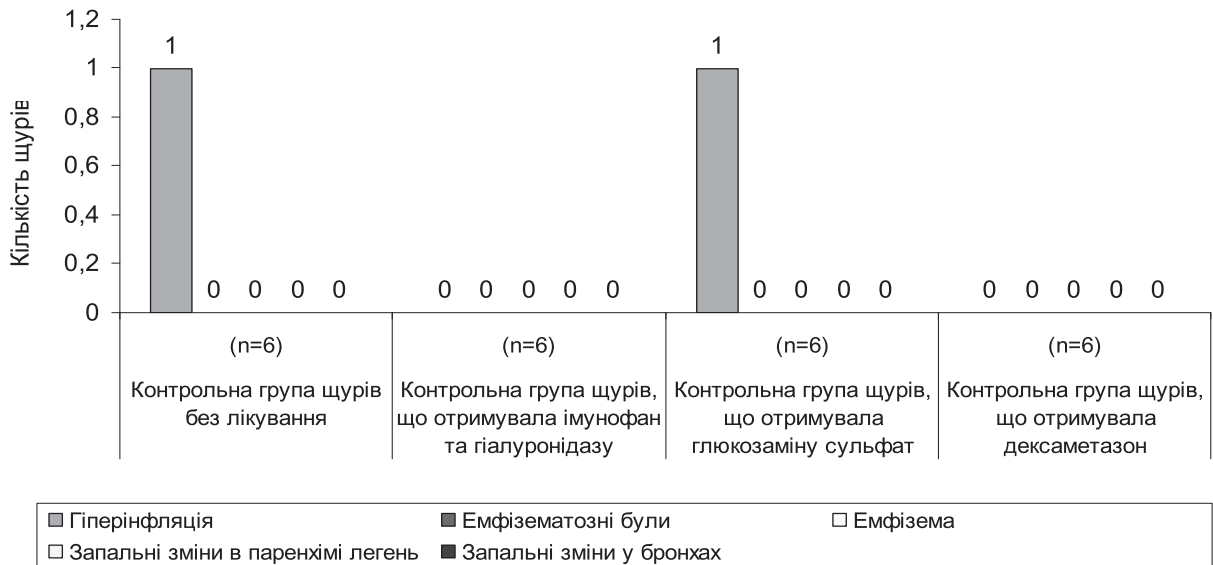


Рис. 2. Порівняння морфологічних змін у щурів з груп контролю.

Примітка: 1. * – $p < 0,05$ при порівнянні з контрольною групою щурів без лікування; 2. † – $p < 0,05$ при порівнянні груп щурів, які отримували глюкозаміну сульфат і комбінацію Т-активну з гіалуронідазою із групою, де застосовували дексаметазон; 3. # – $p < 0,05$ при порівнянні груп щурів, які отримували глюкозаміну сульфат і комбінацію Т-активну з гіалуронідазою.

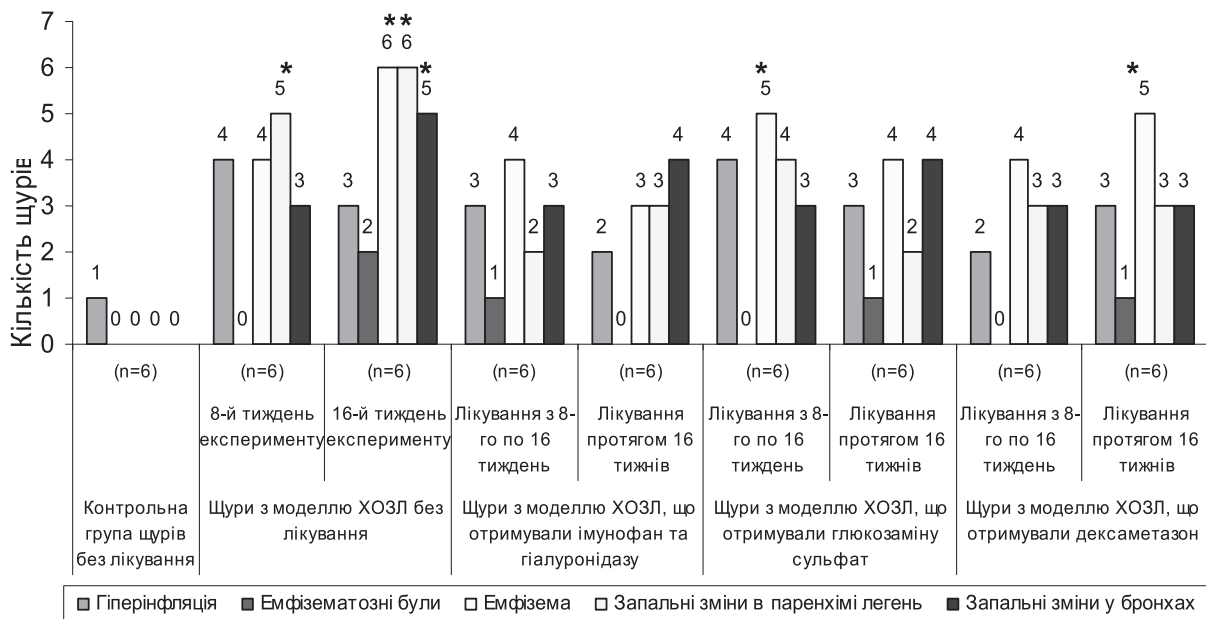


Рис. 3. Співставлення макро- та мікроскопічних змін в легенях щурів з експериментальним моделюванням ХОЗЛ в залежності від отримуваного лікування порівню з контрольною групою.

Примітка: 1. * – $p < 0,05$ при порівнянні з контрольною групою щурів без лікування; † – $p < 0,05$ при порівнянні між групами щурів з моделлю ХОЗЛ без лікування на 8-му та на 16-му тижні експерименту; 2. † – $p < 0,05$ при порівнянні з групою щурів з моделлю ХОЗЛ без лікування на 8-му тижні експерименту; 3. † – $p < 0,05$ при порівнянні з групою щурів з моделлю ХОЗЛ без лікування на 16-му тижні експерименту; 4. ¶ – при порівнянні груп щурів з моделлю ХОЗЛ, які отримували глюкозаміну сульфат і комбінацію Т-активну з гіалуронідазою з групою, де застосовували дексаметазон під час лікування з 8-го по 16-ти тиждень експерименту; 5. § – при порівнянні груп щурів з моделлю ХОЗЛ, які отримували глюкозаміну сульфат і комбінацію Т-активну з гіалуронідазою з групою, де застосовували дексаметазон під час лікування протягом 16 тижнів експерименту; 6. # – $p < 0,05$ при порівнянні між групами щурів з моделлю ХОЗЛ, які отримували глюкозаміну сульфат та комбінацію Т-активну з гіалуронідазою, під час лікування з 8-го по 16-ти тиждень експерименту; 7. ¶ – $p < 0,05$ при порівнянні між групами щурів з моделлю ХОЗЛ, які отримували глюкозаміну сульфат і комбінацію Т-активну з гіалуронідазою під час лікування протягом 16 тижнів експерименту; 8. † – $p < 0,05$ при порівнянні між групами щурів з моделлю ХОЗЛ, що отримували медикаментозну корекцію з 8-го по 16-ти тиждень та протягом 16-ти тижнів експерименту.

та дихальних шляхах, виявлених за допомогою світлової мікроскопії. Між групами щурів без лікування на 8-му та 16-му тижні відмінностей не відмічено, що говорить про наявність певних змін у легенях уже на ранніх етапах формування патології.

У щурів з моделлю ХОЗЛ, які отримували комбінацію імунофану та гіалуронідази протягом 8-ми або 16 тижнів експерименту - вірогідних відмінностей з контрольною групою не знайдено, проте спостергалась відносно висока частота виявлення макро- та мікростопічних змін у легенях (**рис. 3**). Між собою групи не відрізнялись. Дані результати свідчать про високі протективні властивості комбінації імунофану та гіалуронідази у щурів з тривалою експозицією тютюнового диму як при ранньому, так і при призначенні на більш пізніх етапах.

Застосування глюкозаміну сульфату та дексаметазону виявилось менш ефективним у щурів з моделлю ХОЗЛ. Так, глюкозаміну сульфат був більш ефективний лише при тривалому застосуванні (протягом 16-ти тижнів) на відміну від дексаметазону, де

16-ти тижневий прийом асоціювався з досить високою частотою емфіземи, виявленої за допомогою світлової мікроскопії.

Висновки. Результати аналізу макро- та мікроскопічних змін легень у щурів контрольних груп засвідчили високий профіль безпечності по відношенню до легеневої тканини дексаметазону, глюкозаміну сульфату, комбінації імунофану та гіалуронідази.

Найбільш «універсальні» протективні властивості стосовно стану легень у щурів з тривалою експозицією тютюнового диму виявила комбінація імунофану та гіалуронідази, незалежно від термінів призначення.

Застосування глюкозаміну сульфату та дексаметазону виявилось менш ефективним у щурів з моделлю ХОЗЛ.

Перспективи подальших досліджень. Подальша робота у даному напрямку дозволить вдосконалити стратегію застосування протизапальної терапії при ХОЗЛ.

Список літератури

1. Банержи А. Медицинская статистика понятным языком : вводный курс / А. Банержи ; [пер. с англ. под ред. В.П. Леонова]. — М.: Практическая медицина, 2007. — 287 с.
2. Баур К. Бронхиальная астма и хроническая обструктивная болезнь легких / К. Баур, А. Прейсер ; [пер. с немецкого языка под. ред. И. В. Лещенка]. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. — 192 с.
3. Герасимов А.Н. Медицинская статистика: Учебное пособие / Герасимов А.Н. — М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2007. — 480 с.
4. Моделирование заболеваний легких (Пособие для научных работников) / Л. Н. Данилов, Е. С. Лебедева, Ю. А. Кирилов СПб : НИИ пульмонологии, 2005. — 31 с.
5. Морфологічні зміни легень при експериментальній моделі хронічних неспецифічних захворювань та його корекція дексаметазоном / М. Г. Бойко, Д. М. Бойко, Г. А. Ярошенко [та ін.] // Світ медицини та біології. — 2006. — № 3. — С. 11-16.
6. Обструктивные заболевания легких: образовательная программа для врачей / Ю.И. Фещенко, Л.А. Яшина, А.М. Полянская, А.Н. Туманов. -Київ, 2004. - 287 с.
7. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. — М.: МедиаСфера, 2002. —312 с.
8. Фещенко Ю.И. Проблемы хронических обструктивных заболеваний легких // Укр. пульмонолог. журн. - 2002. - №1. - С. 5 - 10.
9. Фещенко Ю.И., Яшина Л.А., Горовенко Н.Г. Хронические обструктивные заболевания легких. - К.: Морион, 2001. - 79 с.
10. Халфарян А.А. STATISTICA 6. Математическая статистика с элементами теории вероятностей : Учебник / А. А. Халфарян. — М.: Издательство Бином, 2010. — 496 с.
11. Хроническая обструктивная болезнь легких : Монография / Под ред. А. Г. Чучалина (Серия монографий Российского респираторного общества). - М.: Издательский дом «Атмосфера», 2008.— 568 с.
12. Черняев А. Л. Патологическая анатомия легких: атлас / А. Л. Черняев, М. В. Самсонова; под ред. Чучалина А. Г. — М.: Издательство «Атмосфера», 2004. — 112 с.
13. Экспериментальное моделирование хронической обструктивной болезни легких с табакокурением и проявлениями сосудистой дисфункции / Т. А. Бродская, В. А. Невзорова, Б. И. Гельцер // Бюллетень СО РАМН. — 2009. — № 1 (135). — С. 60–65.
14. Яценко В.П. Моделирование хронического неспецифического заболевания легких и гипертензии малого круга кровообращения на лабораторных животных / В.П. Яценко, Л.Ф. Блоская, Н.А. Колесова // Укр. пульм. журнал. — 1998. — №3.— С. 62–66.
15. Anti-inflammatory action of sulfated glucosamine on cytokine regulation in LPS-activated PMA-differentiated THP-1 macrophages / J.A. Kim, B.N. Ahn, C.S. Kong [et al.] // Inflamm. Res. — 2011. — Vol. 60(12). — P. 1131-1138.
16. Chung K.F. Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction / K.F. Chung, I.M. Adcock // Eur. Respir. J. — 2008. — Vol. 31. — P. 1334–1356.
17. Cytokine regulation of human lung fibroblast hyaluronan (hyaluronic acid) production. Evidence for cytokine-regulated hyaluronan (hyaluronic acid) degradation and human lung fibroblast-derived hyaluronidase / P.M. Sampson, C.L. Rochester, B. Freundlich [et al.] // J. Clin. Invest. — 1992. — Vol. 90(4). — P. 1492-1503.
18. Dexamethasone pretreatment provides antiinflammatory and myocardial protection in neonatal arterial switch operation / R. Heying, E. Wehage, K. Schumacher [et al.] // Ann. Thorac. Surg. — 2012. — Vol. 93(3). — P. 869-876.
19. Disturbance of immune status and cytokine profile caused by chronic intoxication with organophosphorus compounds and their correction by administration of imunofan / [No authors listed] // Eksp. Klin. Farmakol. — 2012. — Vol. 75. — № 1. — P. 35-37.
20. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global strategy for the diagnosis, management and prevention of obstructive pulmonary diseases: NHLBI / WHO Workshop, 2011. — 90 p.
21. Glucosamine improved atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice by inhibition of Th2 cell development / C.H. Kim, K.A. Cheong, C.D. Park [et al.] // Scand. J. Immunol. — 2011. — Vol. 73(6). — P. 536-545.

22. Glucosamine suppresses interleukin-8 production and ICAM-1 expression by TNF-alpha-stimulated human colonic epithelial HT-29 cells / S. Yomogida, J. Hua, K. Sakamoto [et al.] // *Int. J. Mol. Med.* — 2008. — Vol. 22(2). — P. 205-211.
23. Hele D. First Siena International Conference on Animal Models of Chronic Obstructive Pulmonary Disease : Meeting report [Электронный ресурс] / Certosa di Pontignano. - University of Siena, Italy : 2001. — Режим доступа : <http://respiratory-research.com/content/3/1/12>.
24. Hill G.E. Cardiopulmonary bypass-induced inflammation: is it important? / G.E. Hill // *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* — 1998. — Vol. 12. — Suppl. 1. — P. 21-25.
25. Hyaluronidase expression and activity is regulated by pro-inflammatory cytokines in human airway epithelial cells / M.E. Monzón, D. Manzanares, N. Schmid, S.M. Casalino-Matsuda [et al.] // *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* — 2008. — Vol. 39(3). — P. 289-295.
26. Lennon F.E. Role of hyaluronan and hyaluronan-binding proteins in lung pathobiology / F.E. Lennon, P.A. Singleton // *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* — 2011. — Vol. 301(2). — P. 137-147.
27. Nicotine and cigarette smoking: effects on the ultrastructure of aortic endothelium. / R.M. Pittilo, H.A. Bull, S. Gulati, et al. // *Int. J. Exp. Pathol.* — 1990. — Vol. 71. — P. 573-586.
28. Resveratrol impairs the release of steroid-resistant cytokines from bacterial endotoxin-exposed alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease / J. Knobloch, H. Hag, D. Jungck [et al.] // *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.* — 2011. — Vol. 109(2). — P. 138-143.
29. Shilov V.A. Comparative study of the effectiveness of immunomodulating preparations in combined therapy of chronic obstructive bronchitis / V.A. Shilov, V.S. Shirinskiĭ // *Klin. Med.* — 1995. — Vol. 73(4). — P. 88-90.
30. Simvastatin inhibits cigarette smoking-induced emphysema and pulmonary hypertension in rat lungs / J.-H. Lee, D.-S. Lee, E.-K. Kim, et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* — 2005. — Vol. 172. — P. 987-993.
31. Steroids induce a disequilibrium of secreted interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 β synthesis by human neutrophils / J.D. Langereis, E.J. Oudijk, R.C. Schweizer [et al.] // *Eur. Respir. J.* — 2011. — Vol. 37(2). — P. 406-415.
32. Typical immune system responses to differential monotherapy with immune-correcting drugs / A.M. Zemsko, B.M. Zemskov, V.I. Zolodov [et al.] // *Fiziol. Cheloveka.* — 2001. — Vol. 27(4). — P. 97-103.

УДК 616.24 – 002 – 092.9

АНАЛІЗ МАКРО- ТА МІКРОСКОПІЧНИХ ЗМІН ЛЕГЕНЬ ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ МОДЕЛЮВАННЯМ ХРОНІЧНОГО ОБСТРУКТИВНОГО ЗАХВОРЮВАННЯ ЛЕГЕНЬ

Бойко Д.М.

Резюме. У даному науковому дослідженні проаналізовано динаміку макро- та мікроскопічних змін у легенях щурів з експериментальним моделюванням хронічного обструктивного захворювання легень на фоні застосування корегуючого лікування препаратами з протизапальними і антифібротичними властивостями.

Результати дослідження свідчать про високі протективні властивості комбінації імунофану та гіалуронідази, стосовно стану легень у щурів з тривалою експозицією тютюнового диму, незалежно від термінів призначення. Застосування глюкозаміну сульфату та дексаметазону виявилось менш ефективним у щурів з моделлю ХОЗЛ.

Ключові слова: експеримент, хронічне обструктивне захворювання легень, емфізема, гіперінфляція.

УДК 616.24 – 002 – 092.9

АНАЛИЗ МАКРО- И МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ЛЕГКИХ КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ МОДЕЛИРОВАНИЕМ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ

Бойко Д.Н.

Резюме. В данном научном исследовании проанализирована динамика макро-и микроскопических изменений легких крыс с экспериментальным моделированием хронической обструктивной болезни легких на фоне применения коррегирующего лечения препаратами с противовоспалительными и антифибротическими свойствами.

Результаты исследования свидетельствуют о высоких протективных свойствах комбинации иммунофана и гиалуронидазы, относительно состояния легких у крыс с длительной экспозицией табачного дыма, независимо от сроков назначения. Применение глюкозамина сульфата и дексаметазона оказалось менее эффективным у крыс с моделью ХОБЛ.

Ключевые слова: эксперимент, хроническая обструктивная болезнь легких, эмфизема, гиперинфляция.

UDC 616.24 – 002 – 092.9

Analysis Of Macro-And Microscopic Changes In Lungs Of Rats With Experimental Modeling Of Chronic Obstructive Pulmonary Disease

Boyko D.M.

Summary. This research study analyzed the dynamics of macro-and microscopic changes in lungs of rats with experimental modeling of chronic obstructive pulmonary disease during corrective treatment by drugs with anti-inflammatory and anti-fibrotic properties.

The findings suggest that the high protective properties of the combination of immunofan and hyaluronidase, on the state of the lungs in rats with long-term exposure to tobacco smoke, regardless of the terms of appointment. The use of glucosamine sulfate and dexamethasone was less effective in the rat model of COPD.

Key words: experiment, chronic obstructive pulmonary disease, emphysema, hyperinflation.

Стаття надійшла 28.05.2012 р.

Рецензент – Гольденберг Ю.М.