

## РЕАКЦИЯ ПОПУЛЯЦИИ ТУЧНЫХ КЛЕТОК ЛЕГКИХ ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ У КРЫС НА ДЕЙСТВИЕ $\beta$ -АДРЕНОБЛОКАТОРОВ

© И. Л. Ерохина,<sup>1</sup> П. А. Ворончихин,<sup>2</sup> С. В. Оковитый,<sup>2</sup> О. И. Емельянова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии РАН и <sup>2</sup> Химико-фармацевтическая академия, Санкт-Петербург;

<sup>1</sup> электронный адрес: heartdev@mail.cytspb.rssi.ru

Тучные клетки (ТК) — многофункциональные гранулярные клетки, содержащие широкий спектр медиаторов, являются одной из мишеней при противовоспалительной терапии бронхиальной астмы (БА). На модели БА изучали популяцию ТК в легких крыс под действием  $\beta$ -адреноблокаторов (БАБ) как в комбинации со стандартной терапией (глюкокортикоид будесонид совместно с  $\beta$ -адреномиметиком салбутамолом), так и без нее. ТК разной степени зрелости идентифицировали на парафиновых срезах, окрашенных альциановым голубым и сафранином. У крыс с БА плотность ТК (на 1 мм<sup>2</sup> среза) увеличивается по сравнению с интактными крысами в 1.9 раза. В легких интактных и экспериментальных крыс преобладают незрелые альциан-положительные ТК. Во всех вариантах экспериментов под влиянием фармакологических препаратов плотность ТК уменьшается в 2—2.7 раза и соответствует плотности клеток у интактных крыс. При введении пероральных и ингаляционных препаратов БАБ статистически значимые различия по плотности ТК не выявляются. Таким образом, под действием всех изученных фармакологических препаратов количество ТК, играющих роль мишени при терапии БА, снижается до уровня нормы. Можно предполагать, что вследствие этого подавляется продукция многочисленных факторов, влияющих на развитие БА.

**Ключевые слова:** тучные клетки, легкие, бронхиальная астма, крысы,  $\beta$ -адреноблокаторы, терапия.

**Используемые сокращения:** БА — бронхиальная астма, БАБ —  $\beta$ -адреноблокаторы, ТК — тучные клетки.

Бронхиальная астма (БА) — хроническое воспалительное заболевание дыхательных путей, в патогенезе которого принимают участие разнообразные клетки, включая эозинофилы, Т-лимфоциты, нейтрофилы, тучные клетки (ТК), гладкомышечные элементы и др. (Bradding, 2008; Белевский, 2011). Хроническое воспаление обуславливает развитие бронхиальной гиперреактивности, проявляющейся распространенной и изменяющейся по выраженности обструкцией дыхательных путей.

Большое значение в развитии БА имеют ТК — многофункциональные гранулярные клетки, запасющие и секретирующие широкий спектр медиаторов. ТК способны проникать в слой гладкомышечных клеток и выделять медиаторы, индуцирующие пролиферацию гладкомышечных клеток и спазм бронхов, а также привлекающие и активизирующие клетки, связанные с воспалением (Nakagome, Nagata, 2011). Секретируемые клетками провоспалительные и профибротические агенты способствуют морфологическим изменениям в легких (ремоделированию воздушных путей) при астме (Margulis et al., 2009; Carter, Bradding, 2011). ТК проникают также в мукозные железы и играют важную роль в регуляции секреции этими железами (Bradding et al., 2006). Кроме того, для БА характерно взаимодействие ТК с гладкомышечными клетками (Page et al., 2001).

Препараты, используемые для контроля за течением БА, включают в себя в первую очередь средства с проти-

вовоспалительным действием (ингаляционные глюкокортикоиды, антилейкотриеновые препараты), а также препараты, потенцирующие их эффект (продолжительные  $\beta$ 2-агонисты и метилксантины). Одной из мишеней базисной противовоспалительной терапии БА являются ТК, на активность которых ингибирующее влияние оказывает, например, комбинация глюкокортикоидов и  $\beta$ 2-агонистов (Johnson, 2002; Black et al., 2009). Однако сведения о влиянии этих препаратов, а также  $\beta$ -адреноблокаторов (БАБ), представляющих большой интерес с фармакологической точки зрения при лечении БА, на популяцию ТК в легких при БА практически отсутствуют.

Цель работы — изучить влияние БАБ, а также комбинации  $\beta$ 2-адреномиметика и глюкокортикоида на плотность ТК, баланс клеток разной степени зрелости и на количество дегранулированных ТК в легких на модели экспериментальной БА у крыс.

### Материал и методика

Работа выполнена на беспородных белых крысах-самцах массой 250—270 г ( $n = 35$ ). Во время проведения эксперимента крысы содержались в стандартных условиях вивария в соответствии с правилами, утвержденными МЗ СССР 06.07.1973 г., по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических вивариев.

Тучные клетки (ТК) в легких крыс при бронхиальной астме

Экспериментальные группы	Плотность ТК на 1 мм <sup>2</sup>	Относительная доля ТК, %		
		зрелых	перибронхиальных	дегранулирующих
К	13.6 ± 5.3	3.0 ± 3.3	2.1 ± 1.5	43.9 ± 8.4
1	25.6 ± 9.6 <sup>a</sup>	3.7 ± 3.3	4.9 ± 3.8	32.8 ± 8.2 <sup>a</sup>
2	9.6 ± 5.2 <sup>b</sup>	10.7 ± 7.4	4.8 ± 3.0	26.5 ± 8.7 <sup>b</sup>
3	12.8 ± 6.5 <sup>b</sup>	5.1 ± 2.9	3.5 ± 2.9	22.0 ± 4.7 <sup>b, в</sup>
4	10.4 ± 5.4 <sup>b</sup>	17.2 ± 14.2	7.0 ± 5.4	31.8 ± 5.9 <sup>a</sup>
5	9.4 ± 2.7 <sup>b</sup>	3.7 ± 2.8	4.5 ± 4.9	43.6 ± 9.9
6	10.3 ± 6.8 <sup>b</sup>	4.7 ± 3.5	5.8 ± 4.7	39.5 ± 12.3

Примечание. Даны средние значения и их среднестатистические ошибки. К — контроль (позитивный); 1 — бронхиальная астма (БА, негативный контроль) без лечения; 2 — лечение БА введением пероральной формы β-адреноблокатора (БАБ, бисопролола); 3 — лечение БА введением ингаляционной формы БАБ (метопролола); 4 — лечение БА глюкокортикоидом будесонидом и β2-адренолимитиком салбутамолом; 5 — лечение, аналогичное группе 4 в сочетании с пероральным введением бисопролола; 6 — лечение, аналогичное группе 4 в сочетании с ингаляционным введением метопролола. Разница с контролем достоверна при <sup>a</sup>  $P < 0.05$  и <sup>b</sup>  $P < 0.01$ , с группой 1 — при  $P < 0.05$ .

Для моделирования БА применяли модифицированную методику (Ворончихин, 2012), для чего в 1-е и 7-е сут эксперимента животным подкожно вводили овальбумин (Grade V, Sigma, США) в дозе 10 мг/кг, адсорбированный на геле алюминия гидроксида (1 : 1), с одновременным внутрибрюшинным введением препарата Бронхо-Мунал (Lek, Словения) в дозе 5 мг/кг. С 14-х сут проводили ингаляции 5%-ным раствором овальбумина в течение 15 мин каждые 4-е сут с помощью небулайзера F 1000 (Flaem, Италия). На 31-е сут опытных животных разделили на 6 групп (по 5 в каждой, см. таблицу) для ежедневного введения исследуемых препаратов. Группам 2 и 5 вводили пероральную форму БАБ (бисопролол, 5 мг/кг; Мерк, Германия), группам 3 и 6 вводили ингаляционную форму БАБ (метопролол, 1 мг в 5 мл; Astra-Zeneca, Швеция), группам 4—6 проводили стандартную терапию (будесонид, 2 мл 0.05 %-ного раствора, Пульмокорт; Astra-Zeneca, Швеция, плюс салбутамол, 2.5 мл 0.1 %-ного раствора; Сальгим, Россия). Группе 1 (крысы с БА без лечения, негативный контроль) ингаляционно вводили физиологический раствор в эквивалентных количествах (соответствующий объем физиологического раствора). Группа позитивного контроля (интактные крысы, К) весь период времени лечения получала ингаляционно только физиологический раствор. На 60-е сут фрагменты легкого фиксировали в смеси Карнуа, заливали в парафин и готовили срезы толщиной 5 мкм.

Для идентификации ТК применяли окраску срезов альциановым голубым 8G (Fluka, Швейцария) и сафранином O (Fisher, Science, Ed., США), как описано ранее (Ерохина и др., 2008). ТК подсчитывали в ткани легкого. Определяли плотность ТК на 1 мм<sup>2</sup> ткани. Отдельно учитывали менее дифференцированные клетки с доминирующей окраской альциановым голубым и более зрелые клетки с сафранин-положительными гранулами (Combs et al., 1965). Определяли относительную долю ТК (в %) в процессе дегрануляции. Данные, полученные на опытных крысах, сравнивали с соответствующими данными у контрольных крыс. Для гистологического изучения срезы окрашивали гематоксилином Майера и эозинном.

Значимость различий сравниваемых величин оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

## Результаты и обсуждение

В исследованных нами образцах ткани легких ТК расположены вокруг бронхов и бронхиол, в альвеолярной паренхиме, вокруг сосудов и в плевре. При БА у животных, не получавших лечения (группа 1), суммарная плотность незрелых и зрелых ТК в 1.9 раза выше, чем у контрольных животных (см. таблицу,  $P < 0.05$ ). В легких крыс группы 1, как и в норме, преобладают незрелые альциан-положительные клетки (96 %). На фоне значительной индивидуальной вариабельности значений плотности ТК при введении пероральных и ингаляционных препаратов БАБ статистически значимые различия между группами 2 и 3, как и между группами 5 и 6, не выявляются. По сравнению с группой 1 плотность всех ТК в группах 2, 3, 5 и 6 под действием препаратов снижается в 2—2.7 раза и соответствует уровню у интактных крыс. Аналогичное явление наблюдается и при лечении БА глюкокортикоидом будесонидом и β2-адренолимитиком салбутамолом в группе 4. Во всех вариантах лечения наблюдается тенденция к увеличению частоты встречаемости зрелых сафранин-положительных клеток, не достигающая, однако, статистически значимой разницы. Средние значения относительной доли перибронхиальных ТК во всех опытах значительно варьируют у отдельных животных и достоверно не отличаются от нормы.

Относительная доля ТК в процессе дегрануляции, отражающей степень активации ТК, в большинстве групп (группы 1—4) достоверно ниже, чем в контроле (см. таблицу). Полученные нами данные по относительной доле дегранулирующих ТК не позволяют делать выводы о степени влияния БА и применяемых для лечения БА фармакологических препаратов на уровень активации/деактивации ТК. Следует отметить, что оценка степени дегрануляции клеток на светооптическом уровне затруднена, и только на ультраструктурном уровне можно различать клетки в процессе дегрануляции и уже дегранулировавшие, т. е. потерявшие гранулы и не учитывающиеся на светооптическом уровне.

Значительная индивидуальная вариабельность полученных данных может объясняться как разной степенью выраженности воспалительных процессов в легких у от-

дельных животных, обусловленной индивидуальными особенностями животных, так и варьированием плотности  $\beta$ 2-адренорецепторов и(или) их генетическим полиморфизмом (Kay, Peachell, 2005; Hizawa, 2009).

Таким образом, проведенными исследованиями установлено, что при экспериментальной БА плотность ТК в легких крыс значительно возрастает по сравнению с нормой. Пополнение популяции ТК в патогенезе экспериментальной БА происходит за счет незрелых клеток, мигрирующих извне. Существенных изменений плотности зрелых сафранин-положительных ТК выявить не удалось. Относительная доля ТК вокруг бронхов и бронхиол также достоверно не изменяется. Важно отметить, что во всех изученных вариантах лечения количество ТК, играющих роль мишени при терапии БА, снижается до уровня нормы под действием как глюкокортикоидов совместно с  $\beta$ 2-адреномиметиками, так и  $\beta$ -адреноблокаторов. Можно предполагать, что одновременно ингибируется поступление в легкие ТК извне и подавляется продукция многочисленных провоспалительных факторов, влияющих на развитие и прогрессирование БА. Механизм действия  $\beta$ -адреноблокаторов в роли ингибиторов активности ТК требует дальнейшего изучения.

#### Список литературы

Белевский А. С. (Ред.). 2011. Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы (GINA). М.: Рос. респират. об-во. 108 с.  
 Ворончихин П. А. 2012. Модифицированная модель бронхиальной астмы у аутбредных крыс. Мед. акад. журн. Приложение: 114—116.  
 Ерохина И. Л., Оковитый С. В., Куликов А. Н., Казаченко А. А., Мартынова М. Г., Моисеева О. М., Шуленин С. Н., Емельянова О. И. 2008. Плотность тучных клеток в миокарде и

перикарде крыс при сердечной недостаточности, индуцированной изопроterenолом. Цитология. 50 (2) : 113—117.

Black J. L., Oliver B. G., Roth M. 2009. Molecular mechanisms of combination therapy with inhaled corticosteroids and long-acting beta-agonists. Chest. 136 : 1095—1100.

Bradding P. 2008. Asthma: eosinophil disease, mast cell disease, or both? Allergy, Asthma, and Clin. Immunol. 4 : 84—90.

Bradding P., Walls A. F., Holgate S. T. 2006. The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma. J. Allergy Clin. Immunol. 117 : 1277—1284.

Carter R. J. F., Bradding P. 2011. The role of mast cells in the structural alterations of the airways as a potential mechanism in the pathogenesis of severe asthma. Curr. Pharmaceut. Design. 17 : 685—698.

Combs J. W., Lagunoff D., Benditt E. P. 1965. Differentiation and proliferation of embryonic mast cells of the rat. J. Cell Biol. 25 : 577—592.

Hizawa N. 2009. Beta-2 adrenergic receptor genetic polymorphisms and asthma. J. Clin. Pharmacy and Therapeutics. 34 : 631—643.

Johnson M. 2002. Effects of beta 2 — agonists on resident and infiltrating inflammatory cells. J. Allergy Clin. Immunol. 110 (Suppl. 6) : S282—S290.

Kay L. J., Peachell P. T. 2005. Mast cell beta2-adrenoceptors. Chem. Immunol. Allergy. 87 : 145—153.

Margulis A., Nocka K. H., Brennan A. M., Deng B., Fleming M., Goldman S. J., Kasaian M. T. 2009. Mast cell-dependent contraction of human airway smooth muscle cell-containing collagen gels: influence of cytokines, matrix metalloproteases, and serine proteases. J. Immunol. 183 : 1739—1750.

Nakagome K., Nagata M. 2011. Pathogenesis of airway inflammation in bronchial asthma. Auris Nasus Larynx. 38 : 555—563.

Page S., Ammit A. J., Black J. L., Armour C. L. 2001. Human mast cell and airway smooth muscle cell interactions: implications for asthma. Amer. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 281 : L1313—L1323.

Поступила 12 IV 2013

#### REACTION OF POPULATION OF PULMONARY MAST CELLS IN RAT BRONCHIAL ASTHMA UNDER THE EFFECT OF $\beta$ -ADRENORECEPTOR ANTAGONISTS

I. L. Erokhina,<sup>1</sup> P. A. Voronchikhin,<sup>2</sup> S. V. Okovityy,<sup>2</sup> O. I. Emelyanova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology RAS and <sup>2</sup> Chemical Pharmaceutical Academy, St. Petersburg;

<sup>1</sup> e-mail: heartdev@mail.cytspb.rssi.ru

Multifunctional granular mast cells (MCs) are among targets in bronchial asthma (BA) therapy. We studied pulmonary MC population in a rat model of BA under the effect of  $\beta$ -adrenoreceptor antagonists and of the latter combined with the standard therapy (glucocorticoid budesonide +  $\beta$ 2-adrenergic agonist salbutamol). MCs of different degrees of maturity were identified on paraffin section of lung stained with Alcian blue and Safranin. MC density in the lung of rats with BA increased 1.9 times. Alcian blue-positive immature cells predominated in the lungs of both intact rats and rats with BA. In response to pharmacological agents, the mean MC densities were reduced in 2—2.7 times in all the variants of experiments and were close to the norm. It allows us to suppose that MCs migration from the outside was suppressed and, in consequence of the decline of MC densities, the release of the mediators involved in the progression of BA may be diminished.

Key words: mast cells, lungs, bronchial asthma, rats,  $\beta$ -adrenoreceptor agonists, therapy.