

УДК 615.45, 615.21/26

DOI: 10.15372/ChUR2024608

EDN: WNGBSU

Моделирование острого повреждения легких мышей путем ингаляции аэрозоля липополисахарида из клеток *Salmonella typhi*

Н. А. ЖУКОВА¹, А. М. БАКЛАНОВ², М. Е. СТЕКЛЕНЕВА², С. В. АНЬКОВ^{1,2}, Т. Г. ТОЛСТИКОВА^{1,2}, С. В. ВАЛИУЛИН²¹Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск, Россия

E-mail: sergey.ankov42@gmail.com

²Институт химической кинетики и горения СО РАН, Новосибирск, Россия

(Поступила 13.02.2024; после доработки 18.03.2024; принята к печати 25.03.2024)

Аннотация

Выполнено экспериментальное моделирование острого воспаления в легких у мышей путем ингаляции аэрозоля липополисахарида из микробной клетки *Salmonella typhi*. Показано, что после ингаляционного аэрозольного введения в течение 60 мин липополисахарида (размер частиц 1.1 ± 0.1 мкм) в дозе 5.3 мкг/кг на (5–7)-е сутки наблюдается выраженное гемодинамическое и эмфизематозное обратимое изменение в легких, характерное для острого воспаления легких.

Ключевые слова: аэрозоль, воспаление, Пирогенал, гистология, мышцы, легкие

ВВЕДЕНИЕ

Повышение эффективности лекарственных средств и снижение их побочных эффектов – одна из важнейших задач, стоящая перед исследователями последние три десятилетия [1, 2]. Наиболее перспективным среди предлагаемых в настоящее время подходов является адресная доставка действующих веществ к пораженному органу [3, 4], так как такой метод позволяет локально создать необходимую действующую концентрацию и потенциально снизить общую нагрузку на организм.

В случае заболевания органов дыхания наиболее простым способом адресной доставки служит ингаляционное введение. Показано [5], что такой способ позволяет в несколько раз повысить концентрацию антибактериального вещества в тканях легких по сравнению с паренте-

ральным введением. Кроме того, введение нестероидных противовоспалительных средств (НПВС) путем ингаляции в виде аэрозольных наночастиц при сохранении прежнего терапевтического эффекта снижает дозу лекарственного вещества в 10^4 раз по сравнению с пероральным способом [6].

Как правило, исследования, посвященные ингаляционной доставке лекарственных средств, проводятся на здоровых животных. Однако в реальных условиях начало лечения происходит при наличии воспалительных процессов в легких, что может оказывать заметное влияние на эффективность применения лекарственных средств и их всасывание. Поэтому для всесторонней оценки эффективности ингаляционного метода было необходимо провести исследования на модели поврежденных легких.

Методы, представленные в литературе [7–9], позволяющие вызывать повреждение легких у лабораторных животных, как правило, требуют проведения предварительной анестезии животным и сложных манипуляций по интраназальному или интратрахеальному введению стимулятора воспаления. Цель настоящей работы – разработка простого метода создания модели острого повреждения легких у мышей путем непосредственной ингаляции аэрозоля липополисахарида, выделенного из бактерий *Salmonella typhi*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Генерация аэрозоля осуществлялась методом ультразвукового распыления раствора с помощью генератора, принципы работы которого представлены в работе [10]. Объемная скорость основного потока: $Q_1 = 0.4$ л/мин, разбавляющего потока: $Q_2 = 2.8$ л/мин. Осушитель аэрозольного потока не использовался. Объем распыляемого раствора составлял 8 мл.

Для генерации аэрозоля был использован препарат “Пирогенал” (НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи, Москва), представляющий собой липополисахарид с концентрацией 100 мкг/мл, выделенный из микробной клетки *Salmonella typhi*, в фосфатно-солевом буферном растворе (рН 6.7–7.3).

Счетную и массовую концентрацию, а также распределение по размерам образующихся аэрозольных частиц определяли с помощью оптического аэрозольного спектрометра (ОСА) [10]. Прибор позволяет измерять концентрацию частиц в диапазоне: счетную – от 10 до $3 \cdot 10^5$ см⁻³, массовую – от 0.01 до 500 мг/м³, а также размеры частиц – от 0.3 до 10 мкм.

Ингаляцию аэрозоля лабораторным животным осуществляли в камере типа nose-only (“только нос”) [10], позволяющей выполнять эксперимент одновременно с 12 животными.

Исследования проводили на лабораторных мышках-самках линии CD-1 с массой тела 24 ± 2 г, полученных из вивария ФИЦ Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск), которые перед началом эксперимента проходили карантин в течение 14 суток. Животные содержались в стандартных условиях, по 6 особей в клетке, при соблюдении светового режима (день-ночь по 12 ч) при свободном доступе к воде и корму, с использованием в качестве подстилки древесных опилок. Всего в исследовании использовано 28 животных, из которых 4 мыши

представляли контрольную группу для гистологического исследования, а 24 особи были разделены на 2 группы по 12 штук: первая группа получала ингаляцию аэрозолем из раствора фосфатно-солевого буфера (рН 6.9); вторая – получала ингаляцию препаратом “Пирогенал”. Ингаляция обеим группам осуществлялась однократно в течение 60 мин.

Все манипуляции с животными проводились в соответствии с законодательством Российской Федерации (ГОСТ 33044-2014 “Принципы надлежащей лабораторной практики”), решением “Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств” от 03.11.2016 г. № 81 и положениями Директивы 2010/63/EU Парламента ЕС и Совета Европейского Союза от 22.09.2010 г. о защите животных, используемых в научных целях. Протокол исследования на животных был одобрен Этическим комитетом Института органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН (протокол № П-05-06.2022-14, утвержден 05.06.2022 г.).

Оценку развития острого воспаления проводили с помощью общего анализа крови на 5-е, 7-е и 12-е сутки на гематологическом анализаторе BC-2800 Vet (Mindray, Китай). Объем анализируемой пробы крови – 20 мкл.

Для подтверждения развития воспаления в тканях легких проводили гистологический анализ, для которого животных выводили из эксперимента на 5-е, 7-е и 12-е сутки и забирали легкие. Далее легкие фиксировали в забуференном растворе формалина и подвергали стандартной обработке на гистологическом комплексе Mikrom (Carl Zeiss, Германия) с последующей заливкой в парафиновые блоки. Срезы толщиной 3–4 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Анализ проводили методом световой микроскопии в проходящем свете на микроскопе Axioskop 40 (Carl Zeiss).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При ультразвуковом распылении раствора препарата “Пирогенал” был получен аэрозоль со счетной концентрацией частиц $70\,000 \pm 3500$ см⁻³ и средним размером частиц 1.1 ± 0.1 мкм. Концентрация частиц при распылении раствора фосфатно-солевого буфера составила $70\,000 \pm 3500$ см⁻³, а их средний размер – 0.7 ± 0.1 мкм. Одинаковые значения концентрации в обоих случаях обусловлены постоянной частотой колебаний пьезоэле-

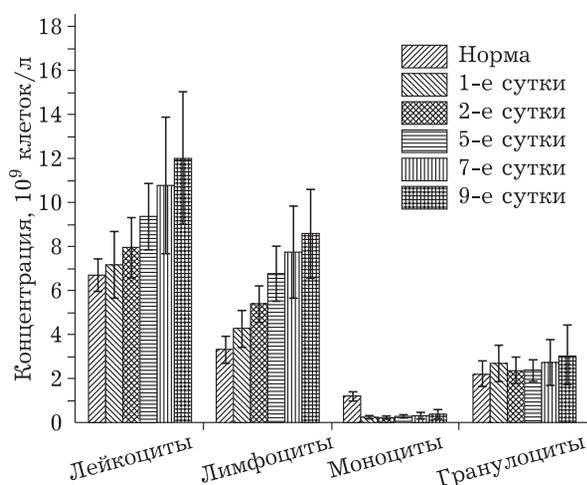


Рис. 1. Динамика изменения концентрации показателей лейкоцитарной формулы у мышей после ингаляции препарата "Пирогенал". Значение нормы приведено согласно [13].

мента генератора аэрозоля. Изменение доли растворенных веществ в распыляемой жидкости обуславливает уменьшение среднего размера частиц при переходе от препарата "Пирогенал", содержащего липополисахарид (100 мкг/мл), к фосфатно-солевому буферному раствору.

Ингаляцию животных проводили аэрозолем с приведенными выше параметрами.

Для оценки ингаляционной дозы (Dose, мкг) липополисахарида, полученного животными, использовали следующую формулу:

$$\text{Dose} = \frac{CV_1 C_{\text{sol}} \varepsilon(d) v_m t}{\text{BW}} \quad (1)$$

где $C = 70\,000 \text{ см}^{-3}$ – счетная концентрация аэрозольных частиц; $V_1 = 1.4 \cdot 10^{-11} \text{ см}^3$ – объем первичной капли, образующейся при ультразвуковом распылении раствора; $C_{\text{sol}} = 100 \text{ мкг/мл}$ – концентрация липополисахарида в распыляемом

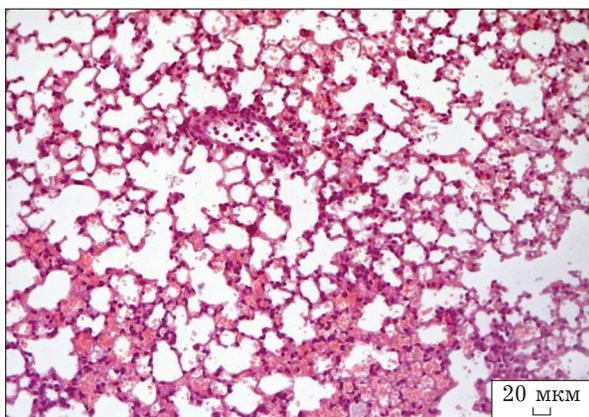


Рис. 2. Легкое без воздействия аэрозоля. В просвете малого бронха слущенные эпителиоциты. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$.

растворе; $\varepsilon(d) = 0.85 \exp \left[-\frac{1}{2} \left(\frac{\ln(d/4)}{2.2} \right)^2 \right] + 0.60 \exp \left[-\frac{1}{2} \left(\frac{\ln(d/1590)}{1.1} \right)^2 \right]$ – доля частиц данного размера (d , нм), оседающих в дыхательных путях мыши [11]; t – время ингаляции, мин; $v_m = 595(\text{BW})^{0.75}$ – минутный объем дыхания мыши [12]; $\text{BW} \approx 0.024 \text{ кг}$ – масса мыши. Учитывая, что для частиц с диаметром 1.1 мкм (1100 нм) величина $\varepsilon(d) = 0.6$, а время ингаляции $t = 60$ мин, согласно формуле (1), получаем, что полученная животными доза составляет 5.3 мкг/кг или 0.127 мкг на мышь.

На рис. 1 приведена динамика изменения показателей лейкоцитарной формулы у мышей после ингаляции аэрозолем препарата "Пирогенал" в сравнении со значениями физиологической нормы для взрослых беспородных мышей [13].

Установлено, что после воспроизведения острого воспаления препаратом "Пирогенал", начиная с 5-х суток, в крови мышей наблюдается заметное общее увеличение количества белых кровяных телец со смещением в сторону увеличения лимфоцитов и снижения моноцитов, что является свидетельством развития воспалительного процесса. У мышей, получивших ингаляцию аэрозоля фосфатно-солевого буфера, общая концентрация лейкоцитов составляла $(7.1 \pm 0.6) \cdot 10^9$ кл/л и оставалась на этом уровне весь период наблюдений (12 суток).

Для подтверждения развития острого воспаления в тканях легких мышей были проведены гистологические исследования, на основании которых показано, что в легких животных контрольной группы (без ингаляции) и в группе животных, получивших аэрозоль фосфатно-солевого буфера, патологических изменений не выявлено (рис. 2). В частности, на фоне физиологического полнокровия слизистая оболочка долевых бронхов выстлана высоким призматическим эпителием, подслизистый слой слабо выражен, мышечная оболочка образована гладкомышечными волокнами, адвентиция – плотной волокнистой соединительной тканью. Межальвеолярные перегородки тонкие. В мелких бронхах наблюдается выраженная складчатость слизистой, в просветах их выявляются слущенные эпителиоциты, единичные лейкоциты. Просветы терминальных бронхов и альвеол без признаков эмфизематозного расширения.

У животных, получивших ингаляцию препаратом "Пирогенал", на 5-е и 7-е сутки в легких наблюдаются выраженные гемодинамические на-

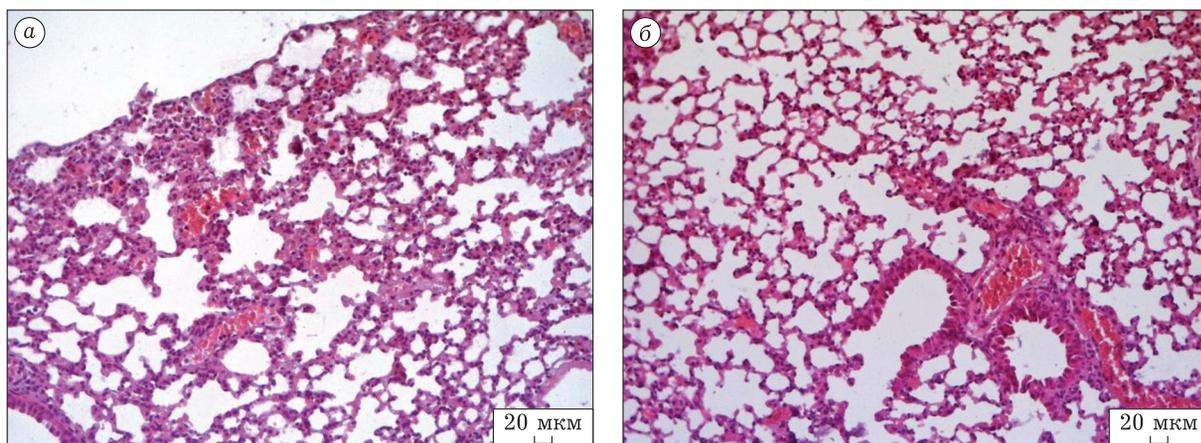


Рис. 3. Легкое (а, б) после воздействия аэрозоля препарата “Пирогенал” на 5-е сутки. Эмфизематозное расширение альвеол, полнокровные сосуды, в полости альвеол встречаются слущенные альвеолоциты, эритроциты. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$.

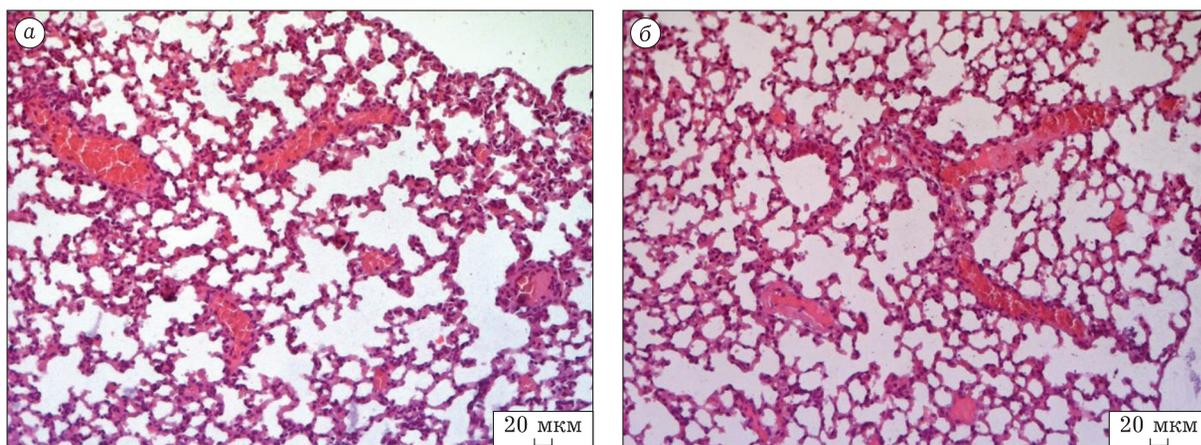


Рис. 4. Легкое (а, б) после воздействия аэрозоля препарата “Пирогенал” на 7-е сутки. Полнокровные сосудов, периваскулярный отек, утолщение межалвеолярных перегородок. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$.

рушения: лейкоцитарная инфильтрация периваскулярных и перибронхиальных пространств, утолщение межалвеолярных оболочек (рис. 3, 4). Стенки бронхов утолщены, отечны. Бронхиальный эпителий характеризуется складчатостью, что служит косвенным признаком бронхоспазма. В полости альвеол встречаются слущенные альвеолоциты, эритроциты.

На 12-е сутки наблюдается прогрессирующее развитие гемодинамических, эмфизематозных и выраженных воспалительных процессов. На фоне выраженного полнокровия усиливаются периваскулярный, перибронхиальный отек и полиморфноклеточная лейкоцитарная инфильтрация (рис. 5). В респираторном отделе легких эмфизематозные изменения носят распространенный характер и наблюдаются как в терминальных альвеолах и бронхиолах, так и в терминаль-

ных бронхах. Выявленные патологические изменения носят обратимый характер, однако могут быть причиной развития гипоксических процессов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан и опробован метод создания острого воспалительного процесса в легких мышей. Для этого была выполнена ингаляция аэрозодем с размером частиц 1.1 ± 0.1 мкм, содержащим липополисахарид, выделенный из микробной клетки *Salmonella typhi*, в камере типа nose-only (“только нос”). Доставленная ингаляционная доза липополисахарида в дыхательную систему мышей составила 5.3 мкг/кг. В результате такой ингаляции на (5–7)-е сутки гистологическое исследование показало развитие гемодина-

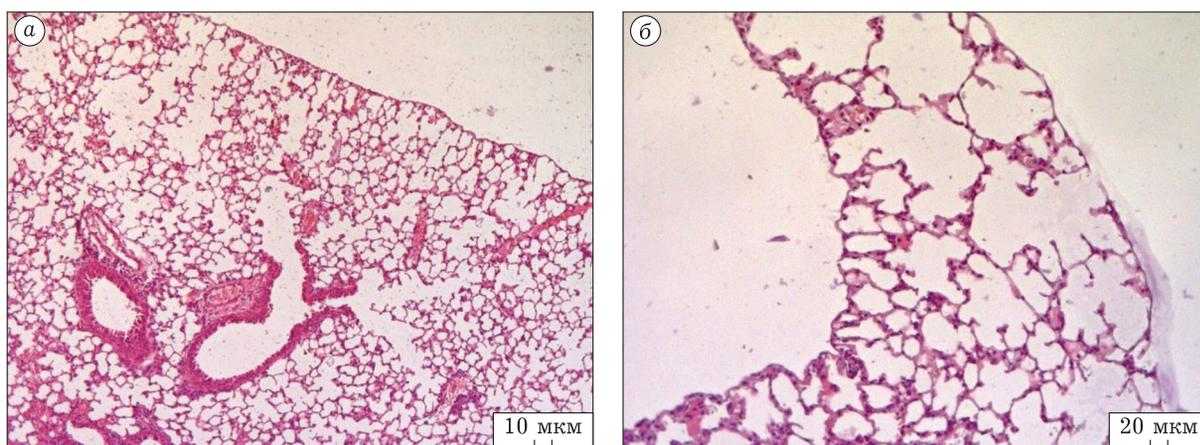


Рис. 5. Легкое после воздействия аэрозоля препарата “Пирогенал” на 12-е сутки. Полнокровные сосуды, периваскулярный отек, эмфизематозное расширение альвеол в респираторном отделе легких. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 100$ (а), $\times 200$ (б).

мических, эмфизематозных и выраженных воспалительных процессов распространенного характера. На 12-е сутки наблюдался прогресс развития воспалительного процесса в легких животных, что подтверждают гистологическое и гематологическое исследования.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-73-10143, <https://rscf.ru/project/19-73-10143/>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Langer R. New methods of drug delivery // *Science*. 1990. Vol. 249, No. 4976. P. 1527–1533.
- Ezike T. C., Okpala U. S., Onoja U. L., Nwike C. P., Ezeako E. C., Okpara O. J., Okoroafor C. C., Eze S. C., Kalu O. L., Odoh E. C., Nwadike U. G., Ogbodo J. O., Umeh B. U., Ossai E. C., Nwanguma B. C. Advances in drug delivery systems, challenges and future direction // *Heliyon*. 2023. Vol. 9, No. 6. Art. 17488.
- Nanotechnology for Drug Delivery and Pharmaceuticals / R. P. Singh, K. RB Singh, J. Singh, C. O. Adetunji (Eds.). Elsevier, 2023. P. 29–42.
- Aguilar Z. P. Nanomaterials for Medical Applications. Elsevier, 2013. P. 181–234.
- Valiulin S. V., Onischuk A. A., Baklanov A. M., An'kov S. V., Dubtsov S. N., Alekseev A. A., Shkil N. N., Nefedova E. V., Plokhotnichenko M. E., Tolstikova T. G., Dolgov A. M., Dultseva G. G. Aerosol inhalation delivery of ceftriaxone in mice: generation procedure, pharmacokinetics, and therapeutic outcome // *Antibiotics*. 2022. Vol. 11, No. 10. Art. 1305.
- Onischuk A. A., Tolstikova T. G., An'kov S. V., Baklanov A. M., Valiulin S. V., Khvostov M. V., Sorokina I. V., Dultseva G. G., Zhukova N. A. Ibuprofen, indomethacin and diclofenac sodium nanoaerosol: generation, inhalation delivery and biological effects in mice and rats // *J. Aerosol Sci.* 2016. Vol. 100. P. 164–177.
- Puig F., Herrero R., Guillamat-Prats R., Gómez M. N., Tijero J., Chimenti L., Stelmakh O., Blanch L., Serrano-Mollar A., Matthay M. A., Artigas A. A new experimental model of acid- and endotoxin-induced acute lung injury in rats // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2016. Vol. 311, No. 2. P. 229–237.
- Пугач В. А., Тюнин М. А., Ильинский Н. С., Левчук Е. В., Строкина Е. И., Ельцов А. А. Экспериментальная модель прямого острого повреждения легких у крыс, вызванного интратрахеальным введением липополисахарида *Salmonella enterica* // *Биомедицина*. 2021. Т. 17, № 3. С. 84–89.
- Mizgerd J. P., Skerrett S. J. Animal models of human pneumonia // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2008. Vol. 294, No. 3. P. 387–398.
- Valiulin S. V., Onischuk A. A., Baklanov A. M., Dubtsov S. N., Dultseva G. G., An'kov S. V., Tolstikova T. G., Rusinov V. L., Charushin V. N. An integrated aerosol setup for therapeutics and toxicological testing: generation techniques and measurement instrumentation // *Measurement*. 2021. Vol. 181. Art. 109659.
- Valiulin S. V., Onischuk A. A., Baklanov A. M., Dubtsov S. N., Dultseva G. G., An'kov S. V., Tolstikova T. G., Belogorodtsev S. N., Schwartz Ya. Sh. Studies of the specific activity of aerosolized isoniazid against tuberculosis in a mouse model // *Antibiotics*. 2022. Vol. 11, No. 11. Art. 1527.
- Arms A. D., Travis C. C. Reference Physiological Parameters in Pharmacokinetic Modeling. Washington, 1988.
- Ермакова А. В., Кудряшов А. Г. Изменчивость гематологических показателей у разных видов лабораторных мышей // *Изв. Коми науч. центра УрО РАН. Сер. “Эксперим. биология и экология”*. 2021. № 5 (51). С. 13–19.